

Л.В.Деримедвідь
О.В.Цулун

Національний фармацевтичний університет,
Харків

Ключові слова: мазь, морфологія, антиоксиданти, рановий процес.

Надійшла: 12.05.2014
Прийнята: 18.06.2014

УДК 615.322:615.262.1:615.454.1:577.127.4

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ НОВОЇ РАНО-ЗАГОЮВАЛЬНОЇ МАЗІ НА МОРФОГЕНЕЗ ПОВНОШАРОВИХ ВИРІЗАНИХ РАН ШКІРИ У ФІЗІОЛОГІЧНО ЗДОРОВИХ ЩУРІВ ТА НА ТЛІ ДІАБЕТОГЕННОГО СТАНУ

Реферат. Порушення загоєння ран є одним із ускладнень діабетогенних станів. Метою даної роботи було морфологічне дослідження впливу нової мазі, яка містить дигідрокверцетин, коензим Q10 та сухий екстракт солодки голої, на загоєння повношарових ран у фізіологічно здорових щурів та щурів із діабетогенним станом. Для морфологічного дослідження брали зразки тканини, що містили рану з прилеглою неушкодженою шкірою. Отримані результати показали, що нова досліджувана мазь в певній мірі оптимізує репаративну регенерацію тканин при загоєнні повношарових шкірних ран у щурів з попередньо змодельованим діабетогенним станом. Характер течії репаративних процесів у цих щурів в цілому відповідав такому у фізіологічно здорових щурів.

Morphologia. – 2014. – Т. 8, № 2. – С. 20-29.

© Л.В.Деримедвідь, О.В.Цулун, 2014

✉ elena_culun@mail.ru

Derymedvid L.V., Tsulun O.V. Influence of a new wound-healing ointment on morphogenesis of full-thickness excision wounds in healthy rats and rats with diabetic state.

ABSTRACT. Background. Impaired wound healing is a complication of diabetic state and is a serious medical and social problem. It occurs as a consequence of disequilibrium in reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defense system. Therefore local treatment with antioxidants is promising in this type of pathology. **Objective.** The aim of this study was morphological evaluation of the influence of a new wound-healing ointment containing licorice extract, coenzyme Q10 and dihydroquercetin on the model of natural and delayed wounds in rats. **Methods.** For morphological evaluation on Day 6 and 12 we took specimens of tissues with wound and surrounding intact skin. Prepared histological slides and stained with haematoxylin, eosin and picrofuchsin by Van Gieson. **Results.** It was noted that process of excision wound healing in rats with diabetic state had prolonged inflammatory phase. Thus, on the Day 6 of observation during wound-healing in a physiologically healthy rats fibrinoid-necrotic layer in the surface layers of the defect was quite dense, with a limited number of leukocyte cells. Young newly formed granulation tissue in the bottom areas also purified from neutrophil leukocytes. Inflammatory reaction in the boundary to the defect areas of skin was extinguished. And in rats with diabetic state same fibrinoid-necrotic layer was markedly attenuated, full of polymorphonuclear leukocytes, granulation cells also contained many white blood cells in the boundary areas of healthy skin observed exocytosis of epithelial layer, a marked inflammation and destruction of the dermis. All this led to decrease in speed of development and maturation of granulation tissue on the 12th day of observation in these animals compared with physiologically healthy rats. **Conclusion.** The results showed that the studied ointment optimizes reparative tissue regeneration in the healing of skin excision wounds in rats with pre-modeled diabetogenic state. Nature of reparative processes in these rats generally followed that of the physiologically healthy rats.

Key words: ointment, morphology, antioxidants, wound process.

Citation:

Derymedvid LV, Tsulun OV. [Influence of a new wound-healing ointment on morphogenesis of full-thickness excision wounds in healthy rats and rats with diabetic state]. *Morphologia*. 2014;8(2):20-9. Ukrainian.

Вступ

Загоєння – це складний біологічний процес, що характеризується послідовністю реакцій організму, які направлені на відновлення анатомічної цілісності та фізіологічних функцій пошкодженого органу та тканин [1]. Поглиблене вивчення даного процесу дало можливість встановити, що під час загоєння ран відбувається активація вільнорадикальних процесів [2]. Також

відомо, що патогенез багатьох захворювань, зокрема цукрового діабету, пов'язаний із надмірною генерацією активних форм кисню (АФК) і недостатністю антиоксидантної системи (АОС). Це в свою чергу призводить до пригнічення процесу регенерації та затримки загоєння ран [3]. Стіяка гіперглікемія викликає аутоокиснення глюкози і зростання рівня вільних радикалів. Було встановлено, що високий рівень глюкози пригнічує

проліферацію фібробластів та робить їх нечутливими до деяких факторів росту, наприклад IGF-1, EGF [4]. Крім того, глюкоза дозозалежно інгібує біосинтез колагену [5]. Враховуючи стрімке зростання захворюваності на цукровий діабет та супутні метаболічні порушення а також важливий вплив антиоксидантів на процес загоєння, на кафедрі заводської технології ліків Національного фармацевтичного університету під керівництвом професора Рубан О.А. була розроблена нова комбінована мазь, яка містить дигідрокверцетин, коензим Q10 та сухий екстракт солодки голої (далі мазь СКД). Компоненти даної мазі здатні пригнічувати процеси перекисного окиснення ліпідів та попереджувати утворення вільних радикалів. А також чинять протизапальну та репаративну дію [6].

Метою даної роботи було морфологічне дослідження впливу нової мазі на загоєння повношарових ран у фізіологічно здорових щурів та щурів із діабетогенним станом.

Матеріали та методи

Експеримент проводили на білих безпородних щурах масою 250-320 г. Всіх тварин було розподілено на чотири групи по 5 тварин у кожній: 1-а група – контрольна патологія (природне загоєння); 2-а група – контрольна патологія (ускладнене загоєння); 3-я група – тварини ліковані маззю СКД; 4-а група – тварини, ліковані препаратом порівняння (маззю метилурациловою). Тварини 2, 3 та 4 груп перед відтворенням повношарових ран протягом двох тижнів (14 днів) отримували 20% фруктози у питній воді [7] та внутрішньом'язово дексаметазон із розрахунку 0,125 мг/кг [8]. Повношарові рани відтворювали згідно з методикою [9].

Усі втручання та евтаназія тварин проводились згідно біоетичних норм поводження з лабораторними тваринами (Страстбург, 1986) та I-го Національного конгресу з біоетики (Київ, 2001).

Для морфологічного дослідження брали зразки тканини, що містили рану з прилеглою неущкодженою шкірою. Стан ранового дефекту у всіх щурів досліджували на 6-й та 12-й день після відтворення травми. Лікування досліджуваними маззями починали з другого дня після нанесення травми.

Всі зразки для подальшого світлооптичного дослідження фіксували у 10% розчині формаліну, зневоднювали у спиртах зростаючої міцності, заливали у целоїдин-парафін. Зрізи фарбували гематоксиліном та еозином, пікрофуксином за Ван Гізон для виявлення колагенових волокон [10]. Огляд мікропрепаратів проводили під мікроскопами Micros 400 та Granum. Мікрофотографування мікроскопічних зображень здійснено цифровим фотоапаратом Nikon Col Pix 4500, цифровою відеокамерою Granum ДСМ 310. Фотознімки обробляли на комп'ютері Pentium 2,4GHz за допомогою програм Nikon View 5 та Tour

View.

Результати та їх обговорення

Як показало мікроскопічне дослідження морфогенезу повношарових вирізаних ран шкіри у фізіологічно здорових щурів при природному загоєнні на 6 день досліду: поверхня рани покрита струпом, під ним видно доволі щільний фібриноідно-некротичний шар, який займав майже ½ дефекту. Решту рани (дно) виповнювала незріла грануляційна тканина, що містила численні макрофаги, гістіоцити, недиференційовані клітини та незначну кількість новоутворених кровеносних судин капілярного виду. Зустрічалися поодинокі тонкі колагенові фібрили, які не мали орієнтованого виду.

У межових з дефектом ділянках шкіри ще помітні залишкові ознаки травматичного запалення. Епідерміс по краю рани гіпертрофований, втрачав диференціювання шарів, спостерігали дистрофію клітин, початкові ознаки крайової регенерації – один ряд клітин, що мали направленість зросту під струп (рис. 1).

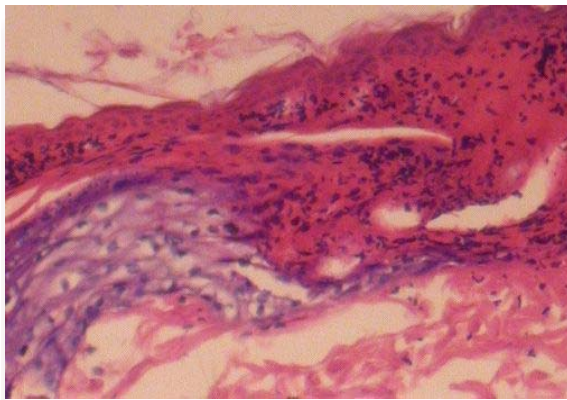


Рис. 1. Межова з рановим дефектом ділянка шкіри контрольного щура на 6-й день спостереження. Гіпертрофія, дедиференціювання епідермісу, вакуольна дистрофія клітин, початок крайової епітелізації під струпом (стрілка). Гематоксилін-еозин. $\times 250$.

На 12-й день з початку загоєння у поверхневих зонах дефекту ще видно різний за об'ємом струп (у деяких доволі крихкий), розмитий демаркаційний лейкоцитарний вал, до якого прилягала грануляційна тканина. У центральних ділянках грануляції мали ще багатоклітинний характер, але серед клітин мали місце фібробласти, що часто орієнтовані були паралельно поверхні рани, нечисленні нерегулярно орієнтовані тонкі колагенові волокна. Васкуляризація була більш виразна, ніж у попередній строк спостереження. У самих донних зонах новоутвореної тканини виявлені більш зрілі і регулярно орієнтовані колагенові волокна. По краю дефекту новоутворена тканина мала значно більш виразні ознаки волокноутворення. Епітелізація поверхні дефекту продовжувалася (рис. 2).

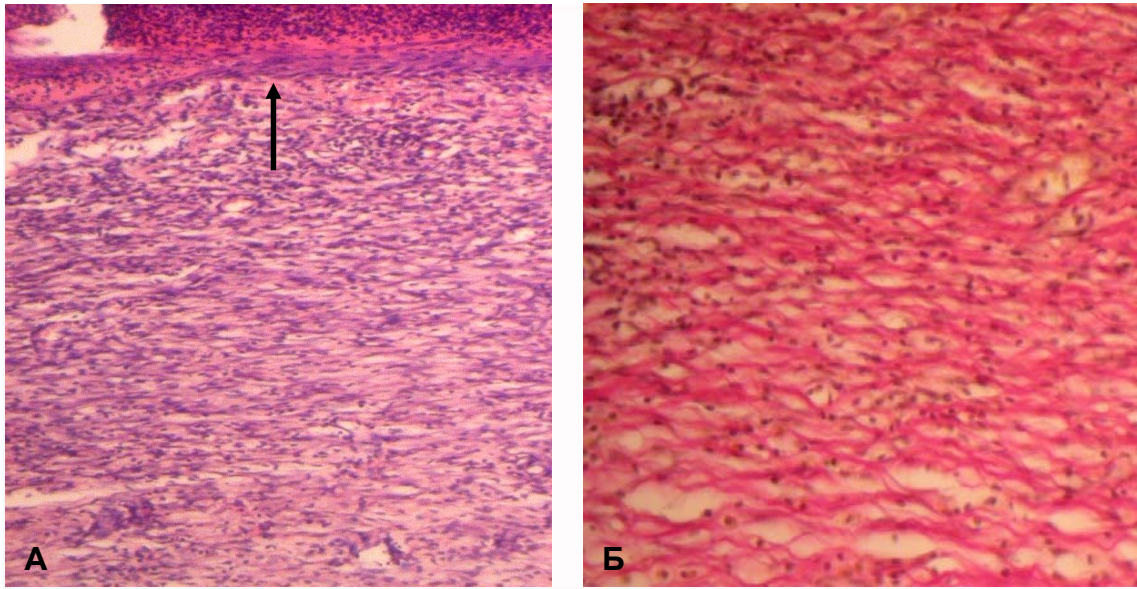


Рис. 2. Крайова ділянка ранового дефекту шкіри контрольного щура на 12-й день спостереження: а – під деструктивним шаром-струпом видно клин регенованого епітелію, волокнисту тканину (гематоксилін-еозин); б – достатньо потужно фуксифільні жмутки колагенових волокон (пікрофуксин за Ван-Гізон). ×200.

Морфогенез повношарових вирізаних ран шкіри у щурів з попередньо змодельованим діабетогенним станом.

Контрольна патологія. 6-й день загоєння.

На поверхні рани видно масивний шаруватий струп, тісно спаяний з лейкоцитарним демаркаційним валом. На більшій протяжності гісто-зрізу під ним видно виразно розріджений фібриноідно-некротичний шар, в якому містилося ба-

гато поліморфно-ядерних лейкоцитів. Самі донні зони дефекту представлені залишками підшкірно-жирової клітковини, у якій подекуди зустрічалися дрібні осередки густоклітинної грануляційної тканини, в якій наряду з моноцитами/макрофагами у значній кількості були присутні нейтрофільні гранулоцити. У складі позаклітинного матриксу відсутні колагенові фібрили (рис. 3).

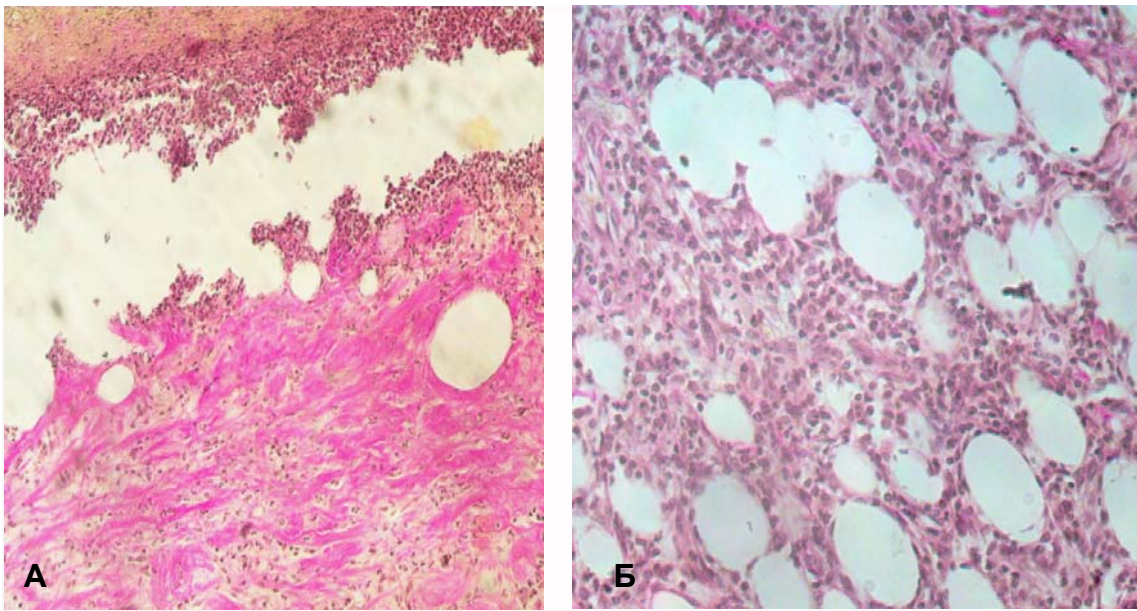


Рис. 3. Рановий дефект шкіри контрольного щура з попередньо змодельованим діабетогенним станом на 6-й день спостереження. Відсутність колагенових фібрил у різних зонах дефекту: а – поверхневих; б – донних. Пікрофуксин за Ван-Гізон. ×100, ×250.

По краях дефекту на межі з здоровою шкірою епідерміс потовщено, гістоархитектоніка

шарів порушена, відмічали виразний екзоцитоз (інфільтрацію лейкоцитами), ознак крайової епі-

телізації не виявлено. Волокна підлеглої дерми «розплавлені», жирова та м'язова тканини, що

розміщалися нижче, містили багато клітин запального інфільтрату (рис. 4).

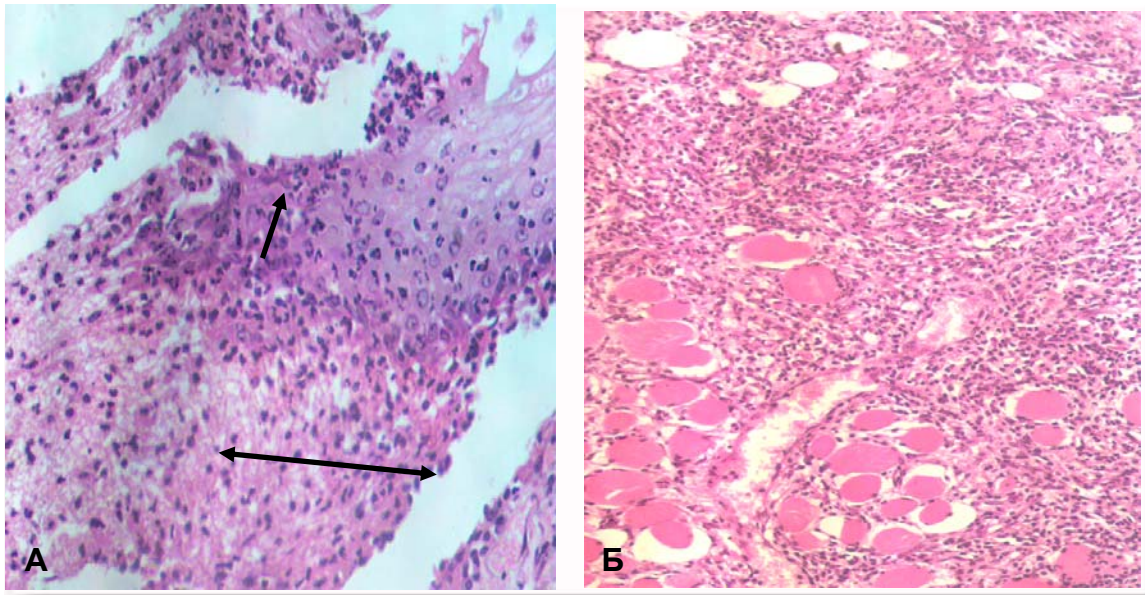


Рис. 4. Межова з рановим дефектом ділянка шкіри контрольного щура з попередньо змодельованим діабетогенним станом на 6-й день спостереження: а – екзоцитоз епідермісу, «розплавлення» волокон дерми ($\times 250$); б – густий запальний інфільтрат жирової та м'язової тканини ($\times 200$). Гематоксилін-еозин.

12-й день з початку загоєння. Поверхневі зони значної частини (по протяжності) ранового дефекту ще вповнені фібринозно-некротичними масами з густою домішкою деградованих клітин. Вони безпосередньо «переходять» у незрілу грануляційну тканину. Виразність васкуляризації, насиченість фібробластами новоутвореної тканини збільшувалася у напрямку донних ділянок

(рис. 5), як і поява орієнтованих тонких колагенових волокон. По краях дефекту клітинна насиченість новоутвореної тканини була ще доволі виразною, регулярно орієнтовані колагенові волокна тонкі, у регенованому епітеліальному кліні спостерігали ознаки диференціювання шарів (рис. 6).

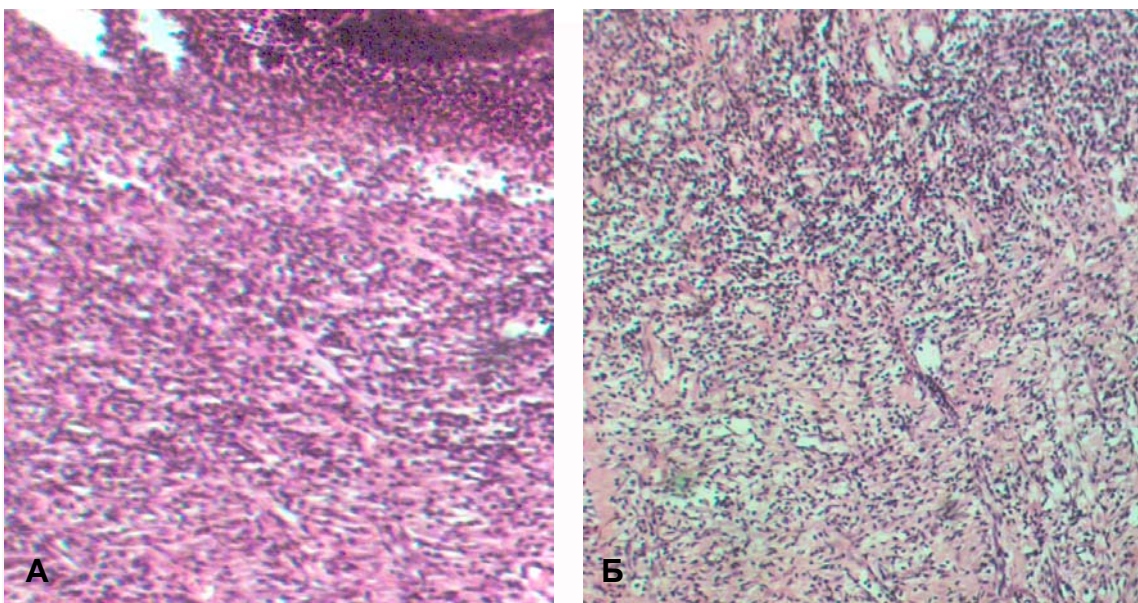


Рис. 5. Рановий дефект шкіри контрольного щура з попередньо змодельованим діабетогенним станом на 12-й день спостереження: а – фібринозно-сукровичні маси з густою домішкою деградованих клітин, незріла грануляційна тканина ($\times 200$); б – збільшення васкуляризації, насиченості фібробластами новоутвореної тканини у напрямку донних ділянок ($\times 100$). Гематоксилін-еозин.

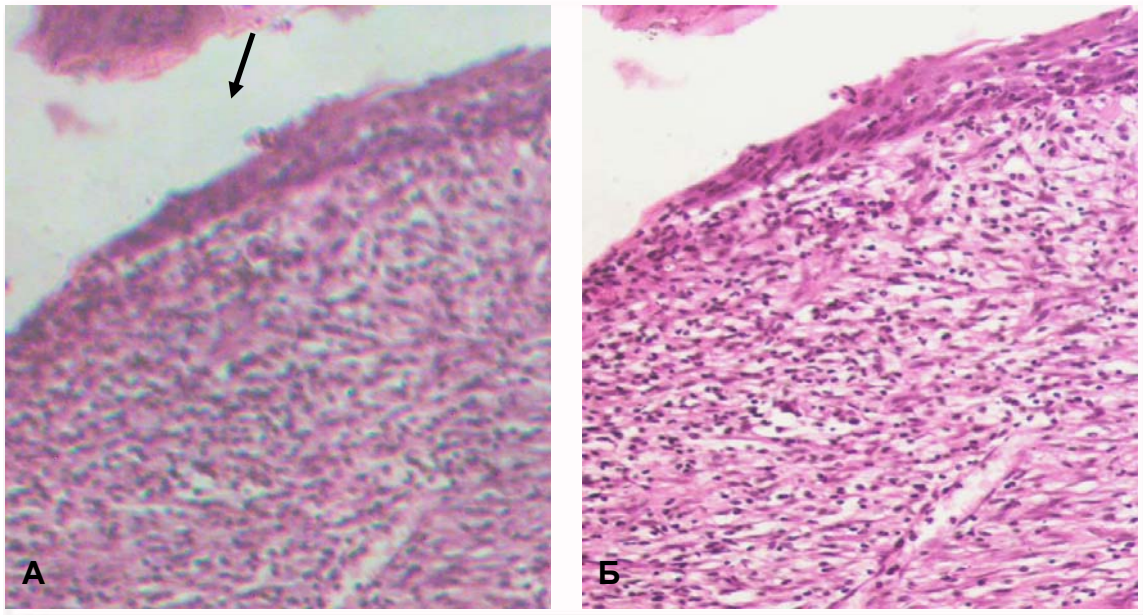


Рис. 6. Крайова ділянка ранового дефекту шкіри контрольного щура з попередньо змодельованим діабетогенним станом на 12-й день спостереження: а – клітинна насиченість грануляційної тканини підвищена, у епітеліальному кліні видно диференціювання шарів (гематоксилін-еозин); б – регулярно орієнтовані жмутки колагенових фібрил тонкі (пікрофуксин за Ван-Гізон). ×200.

Після лікування маззю СКД на 6-й день спостереження у щурів під струпом фібриноідно-сукровичо-деструктивний шар значно менший за об'ємом та виразністю лейкоцитарної інфільтрації ніж у щурів відповідної контрольної патології. У різних ділянках дефекту серед залишків мас фібрину чітко видні осередки грануляційної тканини, що формується. Частина цих осередків підвищено клітинна, серед клітин гематогенного походження вже багато клітин фібробластичного

ряду. В ряді інших осередків видні вже новоутворені кровоносні судини, що мають вертикальну орієнтацію (рис. 7). Ближче до дну таких осередків більше, в деяких видні доволі хаотичні тонкі колагенові волокна (рис. 8). На крайових ділянках дефекту також виявлені зони грануляцій, з великим вмістом орієнтованих паралельно поверхні фібробластами, з доволі слабкими ознаками волокноутворення, початком регенерації епітелію (рис. 9).

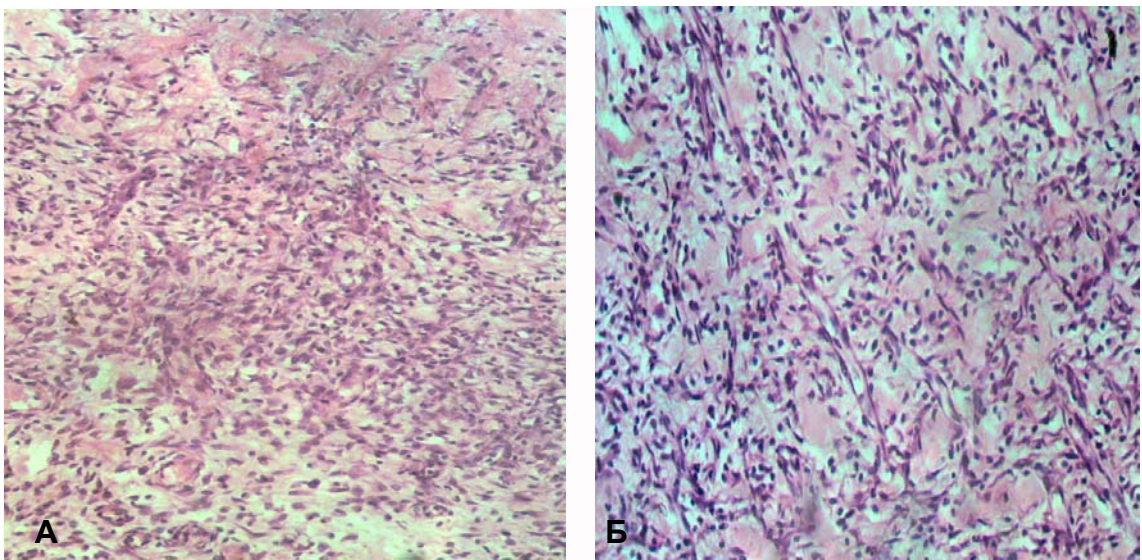


Рис. 7. Рановий дефект шкіри щура з попередньо змодельованим діабетогенним станом, якого лікували маззю СКД на 6-й день спостереження: а – багатоклітинний осередок грануляційної тканини серед залишків мас фібрину; б – поява серед клітин грануляційної тканини новоутворених кровоносних судин. Гематоксилін-еозин. ×200.

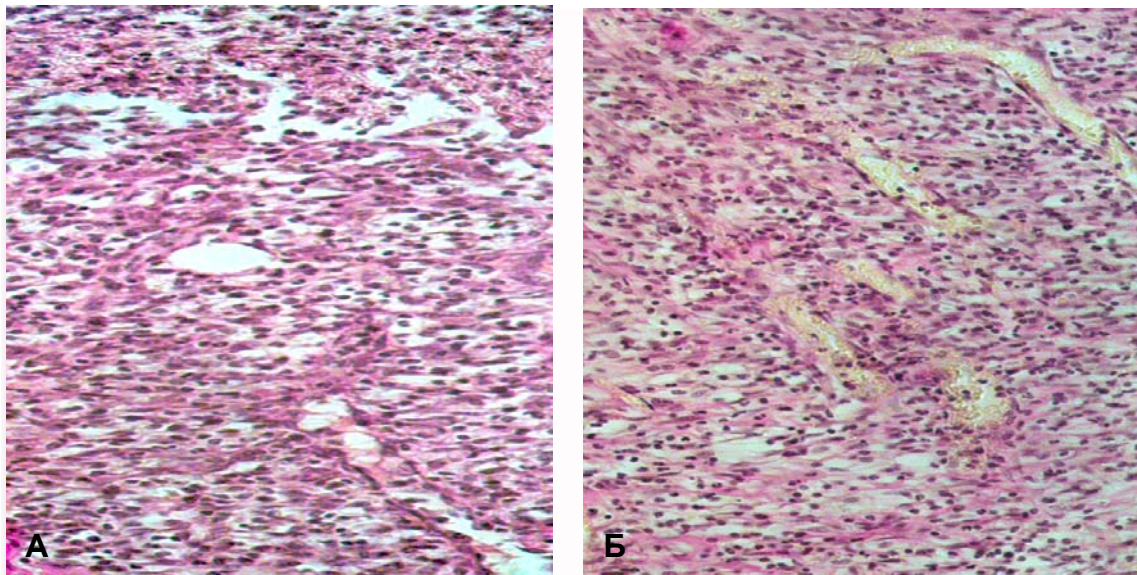


Рис. 8. Рановий дефект шкіри щура з попередньо змодельованим діабетогенним станом, якого лікували маззю СКД на 6-й день спостереження: а – початок регенерації епітелію, у грануляції під епітеліальним клином багато фібробластів (гематоксилін-еозин. $\times 200$); б – слабкі ознаки волокноутворення у тканині (пікрофуксин за Ван-Гізон, $\times 250$).

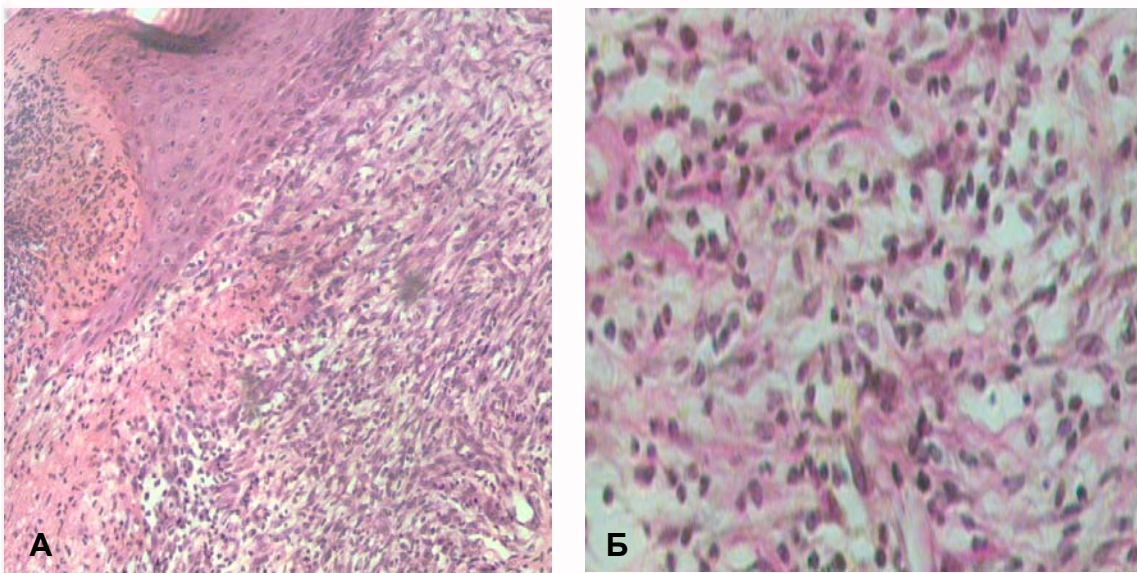


Рис. 9. Крайова зона ранового дефекту шкіри щура з попередньо змодельованим діабетогенним станом, якого лікували маззю СКД на 6-й день спостереження: а – початок регенерації епітелію, у грануляції під епітеліальним клином багато фібробластів (гематоксилін-еозин. $\times 200$); б – слабкі ознаки волокноутворення у тканині (пікрофуксин за Ван-Гізон, $\times 250$).

На 12-й день спостереження значна область ранового дефекту заповнена грануляційною тканиною. Поверхневі зони тканини ще багатоклітинні та васкуляризовані, а решта тканини ($\frac{2}{3}$ об'єму) мала виразне волокноутворення. Доволі часто грануляцію вкривав епітеліальний клин, в якому вже видні певні ознаки диференціювання шарів (рис. 10).

Крайові ділянки дефекту мали вигляд волокнистого рубця, прикритого потовщеним епідермісом (рис. 11).

Лікування повношарових шкірних ран маззю метилурациловою, 6-й день спостереження. Під струпом розташована фібриноідно-сукровично-некротична маса, об'єм якої варіював. Під нею видна видозмінена жирова клітковина, в якій простежені осередки грануляційної тканини, які, в залежності від області дефекту (крайова-центральна) доволі виразно коливалися за розміром, насиченістю клітинним вмістом та судинами (рис. 12). У зоні дна крайових ділянок видні нечисленні нерегулярно орієнтовані тонкі

колагенові фібрили, у центральних ділянках вони відсутні (рис. 13). Епідермальний пласт країв рани був у стані гіпертрофії без помітних ознак

зросту. Запальні явища у дермі навколо рани помірні.

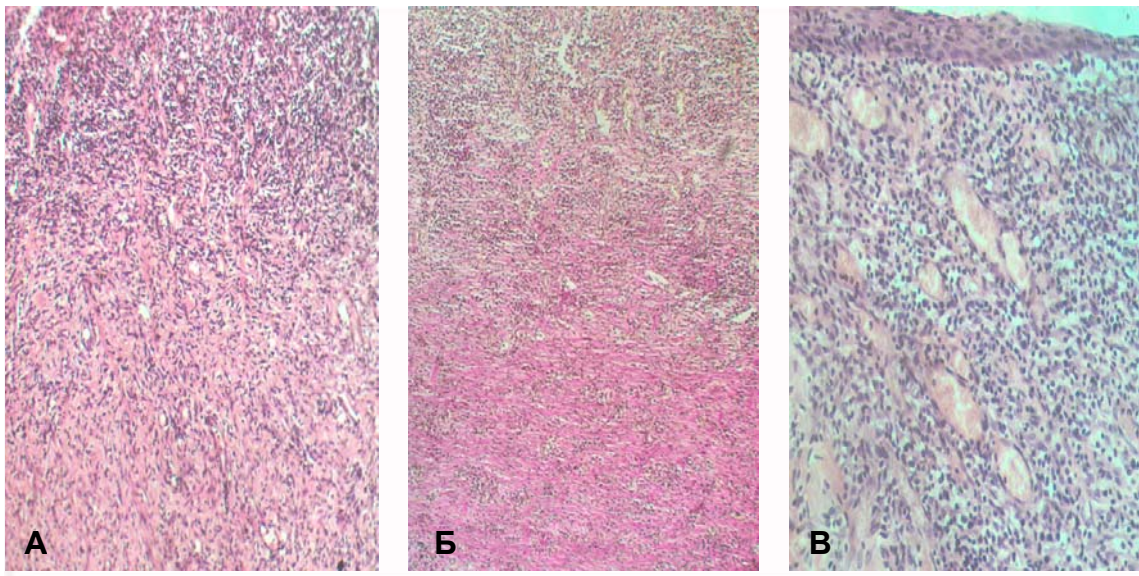


Рис. 10. Рановий дефект шкіри щура з попередньо змодельованим діабетогенним станом, якого лікували маззю СКД на 12-й день спостереження: а – грануляційна тканина, що заповнює дефект, має незрілий у поверхневих зонах характер, та з виразними ознаками волокнутворення у донних ($\times 200$); б – нормальна фуксинофілія волокон ($\times 100$); в – епітеліальний клин поверх грануляційної тканини незрілого типу ($\times 250$). А, В – гематоксилін-еозин, Б – пікрофуксин за Ван-Гізон.

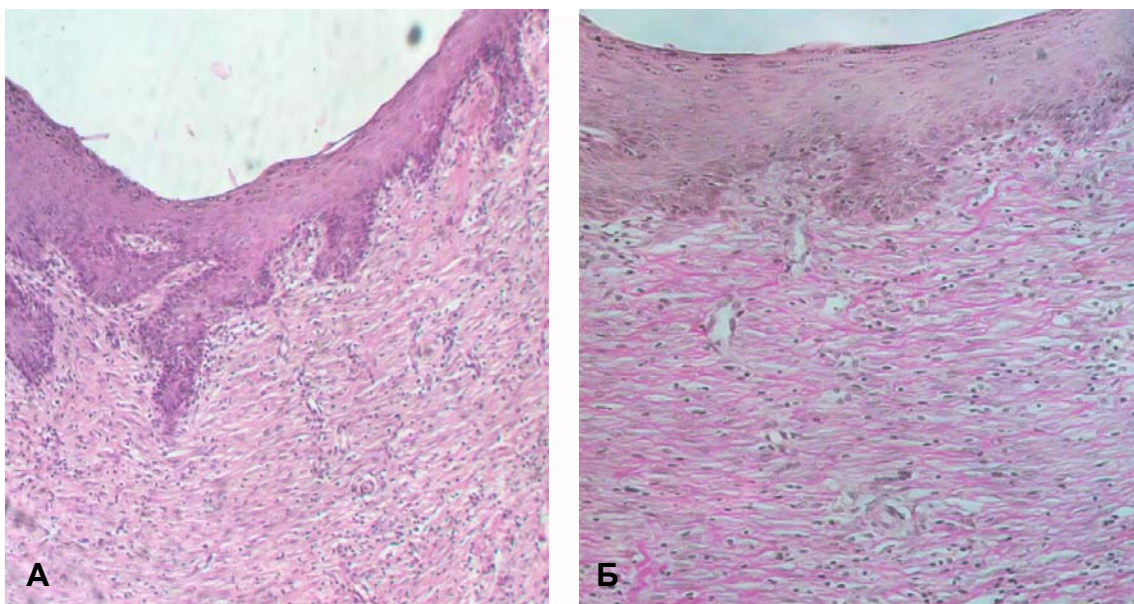


Рис. 11. Крайова зона ранового дефекту шкіри щура з попередньо змодельованим діабетогенним станом, якого лікували маззю СКД на 12-й день спостереження: а – волокнистий рубець прикритий потовщеним епідермісом (гематоксилін-еозин.); б – зрілі, регулярно орієнтовані колагенові волокна у новоутвореній тканині (пікрофуксин за Ван-Гізон). $\times 200$.

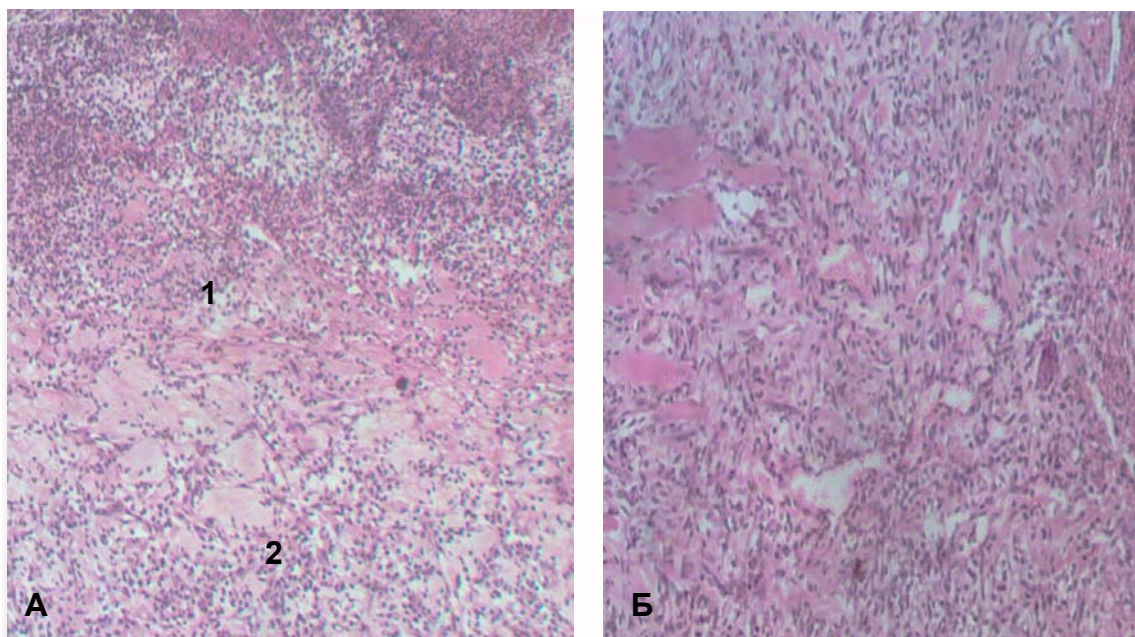


Рис. 12. Рановий дефект шкіри щура з попередньо змодельованим діабетогенним станом, якого лікували маззю метилурациловою на 12-й день спостереження: а – під фібриноідно-сукровично-некротичною масою (1) у центральній ділянці невелика за об'ємом дуже незріла грануляційна тканина (2); б – більш васкуляризована грануляційна тканина у крайовій ділянці. Гематоксилін-еозин. $\times 200$.

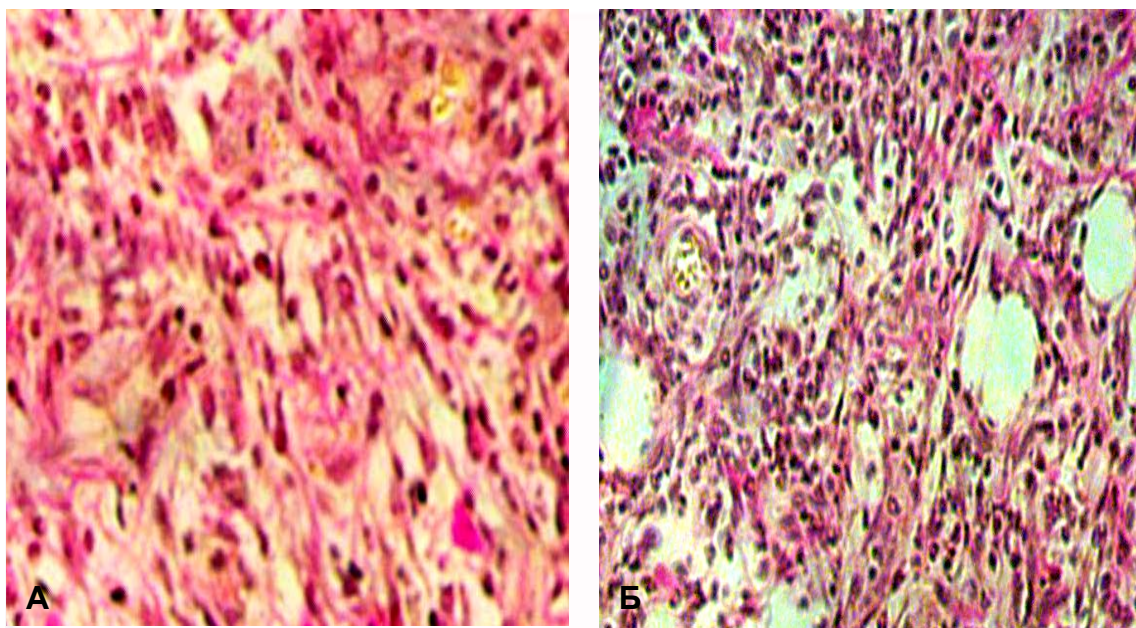


Рис. 13. Рановий дефект шкіри щура з попередньо змодельованим діабетогенним станом, якого лікували маззю метилурациловою на 12-й день спостереження: а – відсутність колагенових фібрил у центральній ділянці; б – нерегулярно орієнтовані нечисленні колагенові фібрили у крайовій ділянці. Пікрофуксин за Ван-Гіззон. $\times 250$.

На 12-й день лікування маззю метилурациловою у 66,6% щурів грануляційна тканина у центральній ділянці ранового дефекту у поверхневих зонах зберігала ще незрілий характер, втім приблизно на $\frac{2}{3}$ глибше вже мала волокнистий характер (рис. 14). Поверхня рани не вільна від

струпа та залишків некротичних мас, але добре видна контракція, за рахунок якої відбувається виразне зменшення площини дефекту.

У решти 33,3% тварин область пошкодження представляла собою повністю епітелізований сполучнотканинний рубець (рис. 15).

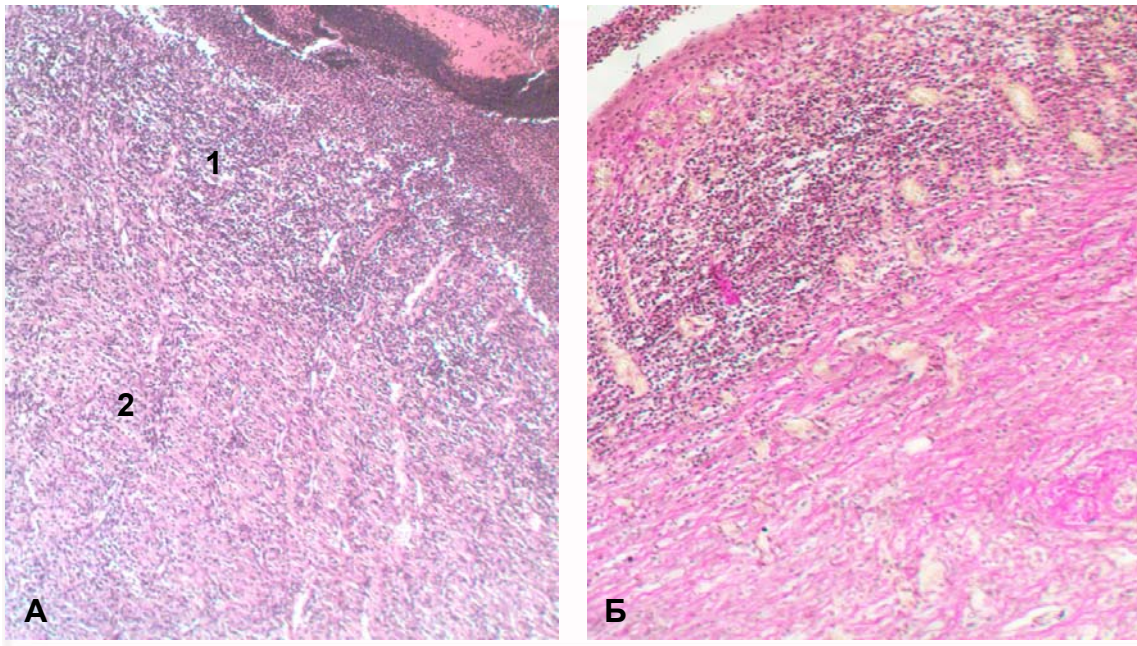


Рис. 14. Рановий дефект шкіри щура з попередньо змодельованим діабетогенним станом, якого лікували маззю метилурациловою на 12-й день спостереження: а – незрілий (1) та волокнистий (2) характер грануляційної тканини (ге-матоксилін-еозин); б – орієнтовані фуксинофільні волокна заповнюють більшу половину дефекту (пікрофуксин за Ван-Гізон). ×100.

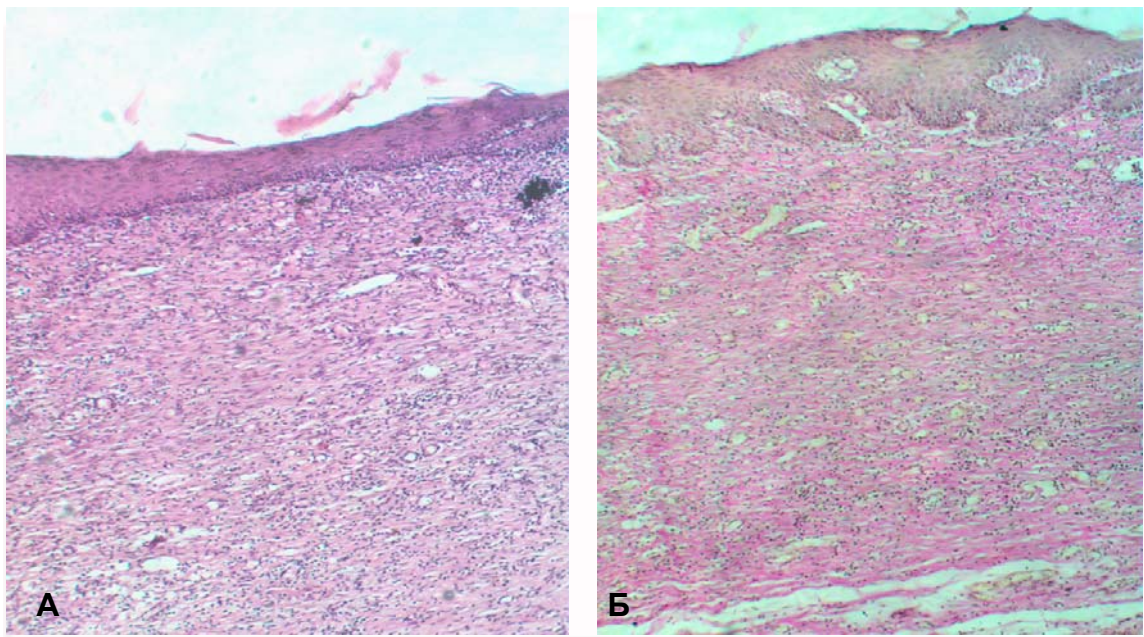


Рис. 15. Рановий дефект шкіри щура з попередньо змодельованим діабетогенним станом, якого лікували маззю метилурациловою на 12-й день спостереження. Епітелізований сполучнотканинний рубець на місці колишнього дефекту (а – гематоксилін-еозин, б – пікрофуксин за Ван-Гізон). ×100.

Висновки

Підводячи підсумок отриманим у різних се-рїях експерименту даним можна зробити такі узагальнення.

При загоєнні повношарових шкірних ран у щурів з попередньо змодельованим діабетоген-

ним станом спостерігали затримку запальної стадії загоєння. Так, на 6-й день спостереження при загоєнні ран у фізіологічно здорових щурів фібриноідно-некротичний шар у поверхневих шарах дефекту був доволі щільний, з обмеженою кількістю лейкоцитарних клітин. Молода ново-

утворена грануляційна тканина у донних зонах також вже достатньо очистилася від нейтрофілних лейкоцитів. Запальна реакція у межових з дефектом ділянках шкіри згасала. А у шурів з попередньо змодельованим діабетогенним станом той же фібриноідно-некротичний шар був виразно розріджений, насичений поліморфно-ядерними лейкоцитами, осередки грануляції також містили багато лейкоцитів, у межових з здоровою шкірою ділянках спостерігали екзоцитоз епітеліального пласту, виразне запалення та деструкцію дерми. Все це призводило до сповільнення швидкості формування та дозрівання грануляційної тканини на 12-й день спостереження у цих тварин порівняно з фізіологічно

здоровими щурами.

Досліджувана мазь в певній мірі оптимізує репаративну регенерацію тканин при загоєнні повношарових шкірних ран у шурів з попередньо змодельованим діабетогенним станом. Характер течії репаративних процесів у цих шурів в цілому відповідав такому у фізіологічно здорових шурів.

Перспективи подальших досліджень

Перспективним є подальше поглиблене фармакологічне вивчення мазі, яка містить дигідрокверцетин, коензим Q10 та сухий екстракт солодки голої, із метою впровадження її в клінічну практику.

Літературні джерела References

1. Tsala DE, Amadou D, Habtemariam S. Natural wound healing and bioactive natural products. *Phytopharmacology*. 2013;4(3):532-60.
2. Yakovleva LV, Laryanovska YuB, Tkachova OV. [Morphological study of wound healing effect of "Lipovit" ointment in rats]. *Clinical pharmacology*. 2003;7(1):50-2. Ukrainian.
3. Hossam E, Osama MA, Ayman MM, Rasha RA. Limiting prolonged inflammation during proliferation and remodeling phases of wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats supplemented with camel unadureted whey protein. *BMC Immunology*. 2013;14(31):3-13.
4. Anamika M, Shukla R, Shukla A. Antioxidant status in delayed healing type of wounds. *Int J Exp Path*. 2000;81:257-63.
5. Lien YH, Stern R, Fu JC, Siegel R. Inhibition of collagen fibril formation in vitro and subsequent crosslinking by glucose. *Science*. 1984;225:1489-94.
6. Tsulun OV, Derymedvid LV, Gaman DV. [Efficacy of a new combines ointment with dihydro-
- quercetin, coenzyme Q10 and licorice extract on UV-erythema in rats]. *Problems of ecological and medical genetics and clinical immunology*. 2013;5(119):262-72. Ukrainian.
7. Shalam Md, Harish MS, Farhna SA. Prevention of dexamethasone- and fructose-induced insulin resistance in rats by SH-01D, a herbal preparation. *Indian Journal of Pharmacology*. 2013;38(6):419-22.
8. Stefanov OV. *Doklinichne doslidjennia li-karskix zasobiv: metodychni rekomendatsii* [Preclinical study of drugs: methodological recommendations]. Avitsena Publ; 2001. 528 p. Ukrainian.
9. Yakovleva LV, Tkachova OV, Butko YaO, Laryanovska YuB. [Methodical recommendations "Experimental study of new preparations for local treatment of wounds"]. Kharkiv: NUPh Publ; 2013. 52 p. Ukrainian.
10. Merkulov GA. [Course of pathologohistological thechnics]. Moscow: Medicina; 1969. 424 p. Russian.

Деримедведь Л.В., Цулун Е.В. Исследование влияния новой ранозаживляющей мази на морфогенез полнослойных вырезанных ран кожи у физиологически здоровых крыс и на фоне диабетического состояния.

Реферат. Нарушение заживления ран является одним из осложнений диабетических состояний. Целью данной работы было морфологическое исследование влияния новой мази, содержащей дигидрокверцетин, коензим Q10 и экстракт солодки голой, на процесс заживления полнослойных ран у физиологически здоровых крыс и крыс с диабетическим состоянием. Для морфологического исследования брали образцы тканей, которые содержали рану с прилегающей неповрежденной кожей. Полученные результаты показали, что исследуемая мазь в определенной степени оптимизирует репаративную регенерацию тканей при заживлении полнослойных ран кожи у крыс с предварительно смоделированным диабетическим состоянием. Характер течения репаративных процессов у данных крыс в целом соответствовал такому у физиологически здоровых крыс.

Ключевые слова: мазь, морфология, антиоксиданты, раневой процесс.