

Т.В.Звягінцева, І.В.Халія

Вплив церебролізину на імуноморфологічні показники загоювання хронічної рани

Харківський національний медичний університет

Актуальність проблеми ефективного лікування хронічних ран є зумовленою постійним зростанням кількості хворих із судинною патологією (атеросклероз, венозний стаз, васкуліти), травмами (опіки, відмороження, радіаційний вплив), цукровим діабетом, онкологічними захворюваннями [1–3]. Незважаючи на безліч етіологічних факторів, простежується спільність механізмів хронізації ран, головним з яких є порушення взаємозв'язків між запальними й репаративними процесами [4]. Першорядна роль у регуляції ранового процесу відводиться цитокінам [5], серед них протизапальним – IL-1 β і TNF- α , регуляторним факторам ангиогенезу – IL-8 [6]. Ці цитокіни, разом із трансмембранним білком ендотеліоцитів судин CD34, що є об'єктивним показником ступеня розвитку судинної сітки, вважають одними з ключових маркерів, що характеризують рановий процес.

Сучасні консервативні методи лікування не розв'язують проблеми загоювання ран із хронічним перебігом. Недоліки мазевих препаратів є зумовленими короткочасністю дії (іруксол), монотропністю (солкосерил, метрогил), слабким вивільненням речовини, що діють (левомеколь), алергічними реакціями у вигляді дерматиту, подразнення тканини, свербіжу (левосин, мефенат) [1, 7].

Наші дослідження показали високу фармакотерапевтичну ефективність церебролізину при внутрішньом'язовому й, особливо, паравульнарному введенні [8]. Ранозагоюючий ефект церебролізину супроводжувався зниженням рівня прозапальних цитокінів IL-1 β , TNF- α у периферичній крові.

Питання про вплив церебролізину на ключові маркери перебігу хронічної рани у вогнищі становить самостійний інтерес, оскільки кров тільки інтег-

рально відбиває процеси, що відбуваються у вогнищі.

Мета роботи – вивчення впливу церебролізину на рівень прозапальних цитокінів і ступінь розвитку ангиогенезу у вогнищі в динаміці хронічного ранового процесу.

Матеріали та методи. Хронічний рановий процес викликали однократним локальним рентгенівським опроміненням у дозі 60 Гр задньої частини стегна морських свинок масою 500–800 г (30 тварин). Усіх тварин було розподілено на 3 групи. I група – морські свинки з хронічною раною без лікування. У II групі тваринам для лікування рани застосовували мазь «Метилурацилова» (препарат порівняння). III групі тварин вводили церебролізін. Досліджувалися також інтактні тварини. Лікування розпочинали на 45-ту добу після опромінення (з появою хронічної виразки) і проводили протягом 20 діб. Мазь наносили на всю поверхню рани щодня. Церебролізін вводили паравульнарно через день, по периметру вогнища на межі між ушкодженою та здоровою тканиною, у дозі 1 мл/кг. Тварин усіх груп виводили з експерименту одночасно, у строк, відповідний закінченню лікування, з урахуванням принципів Гельсінської декларації, прийнятою Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації (1964–2000 рр.). З периферичних відділів вогнища хронічної рани забирали шматочки тканини, робили зрізи товщиною 5–6 мкм, фарбували гематоксиліном і еозином. У ті ж строки у вогнищі визначали вміст IL-1 β , TNF- α і IL-8 методом імуноферментного аналізу, використовуючи тест-системи для кількісного визначення IL-1 β , TNF- α і IL-8 (ТОВ «Укрмедсервіс», Донецьк, Україна) [9]. Вивчення вмісту CD34 виконували з використанням кролячих моноклональних антитіл виробництва НПЦ «Медбіоспектр» (Москва, Росій-

ська Федерація). Візуалізацію комплексів антиген-антитіло проводили за допомогою пероксидази хрому. Препарати вивчали на світловому мікроскопі Axiostar plus (Zeiss) і фотографували цифровою фотокамерою ProgRes C10 plus [10]. Статистичну обробку матеріалу проводили на IBM-Pentium III, з використанням пакета прикладної програми «Stadia-6» [11, 12].

Результати та обговорення. У тварин із хронічним рановим процесом без лікування у вогнищі відзначалося достовірне збільшення IL-1 β , TNF- α і IL-8, порівняно з інтактними тваринами (табл. 1), що підтверджує дані літератури про підвищення рівня прозапальних цитокінів при хронічному рановому процесі [5] і співпадає з нашими власними даними про вміст цитокінів у крові [8].

Зіставлення цитокінового профілю з морфологічними даними виявило наявність ділянки шкіри без епідермісу (рис. 1). Ближче до дефекту епідермоцити базального шару розташовуються горизонтально, за відсутності епідермоцитів шиповатого шару. Ці клітини мають пікнотичне ядро, що відповідає стану некробіозу. Базальна мембрана епідермісу в цих ділянках є відсутньою. Дерма, що розташовується нижче, ущільнена, капілярів у сосочковому шарі мало, макрофаги й лімфоцити поодинокі. Дно виразки представлене ушкодженим колагеном: набряклий, що зливається в загальну масу.

Після лікування маззю «Метилурацилова» у вогнищі хронічної рани морських свинок спостерігалось зниження рівня IL-1 β до 58 % і TNF- α – до 65 %. Рівень IL-8, навпаки, підвищувався й

становив 141 % щодо групи без лікування (таблиця).

Зміни у вогнищі, під впливом мазі «Метилурацилова», характеризувалися вираженою гіперпроліферацією епітеліоцитів епідермісу. При цьому, як видно на мікропрепараті, він легко відшаровується від підлягаючої дерми (рис. 2), що можна пояснити недостатньою диференційовкою епітеліоцитів і відсутністю продукції ними колагену II типу й інших білків, що є необхідними для побудови базальної мембрани епідермісу. З іншого боку, це є можливим внаслідок відсутності нормального кровопостачання епітелію, через недостатню васкуляризацію сосочкового шару дерми. Безпосередньо в зоні виразки колаген у поверхневих шарах щільний, гомогенний, компактний, що є властивим для стану коагуляційного некрозу. У нижніх шарах дерми колаген був набряклим. Клітинні елементи в дермі були відсутніми.

На межі дефекту поверхневі шари дерми мають макрофаги в дещо більшій кількості, ніж у групі порівняння. Ці клітини розташовуються навколо поодиноких капілярів, які мають ендотеліоцити з гіперхромними, дуже сплюсненими ядрами. При постановці імуногістохімічної реакції з моноклональними антитілами до CD34 відзначена невелика кількість ендотеліоцитів з експресією CD34 (рис. 3).

Таким чином, під впливом мазі «Метилурацилова» відзначено активацію проліферативного процесу епітеліоцитів епідермісу, однак морфофункціональний стан дерми, некротизованого колагену змінюється мало, тому що немає стимуляції новоутворення капілярів, а значить, надходження макрофагів, не-

Таблиця

Рівень цитокінів у вогнищі хронічної рани морських свинок у динаміці загоєння при лікуванні хронічного ранового процесу церебролізином (M \pm m, n = 6)

Група	Цитокіни		
	IL-1 β , пг/мл	TNF- α , пг/мл	IL-8, пг/мл
Інтактні	0	0,27 \pm 0,09	0
Без лікування	66,30 \pm 3,99 [^]	120,00 \pm 3,50 [^]	19,20 \pm 1,12 [^]
Мазь «Метилурацилова»	38,20 \pm 1,77 ^{^*}	78,20 \pm 2,98 ^{^*}	27,10 \pm 1,77 ^{^*}
Церебролізін	51,30 \pm 2,91 ^{^*#}	87,50 \pm 1,95 ^{^*#}	10,60 \pm 0,47 ^{^*#}

Примітки: [^] – вірогідність розходжень порівняно з інтактними (p \leq 0,05);

* – вірогідність розходжень порівняно з групою без лікування (p \leq 0,05);

– вірогідність розходжень порівняно з маззю «Метилурацилова» (p \leq 0,05).

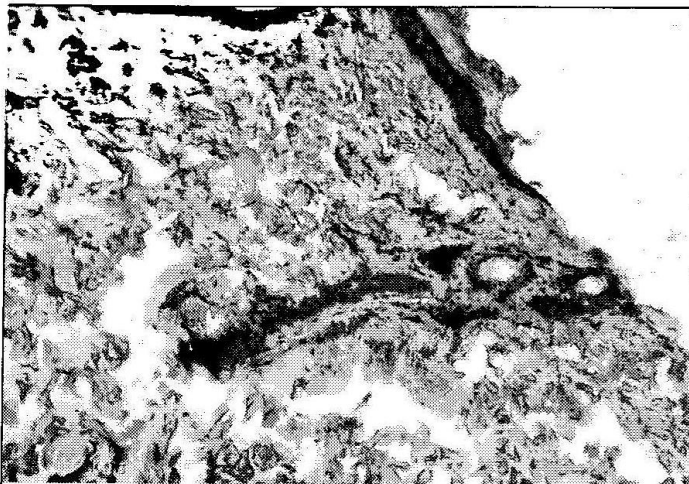


Рис. 1. Ділянка рани морської свинки без лікування. Епідермісу немає. Дерма набрякла, колаген некротизований. 65-доба після опромінення. Фарбування гематоксиліном та еозином. Зб. $\times 100$.



Рис. 2. Ділянка рани морської свинки після лікування маззю «Метилурацилова». Ділянка новоствореного епідермісу, що відшарується. Фарбування гематоксиліном і еозином. Зб. $\times 100$.

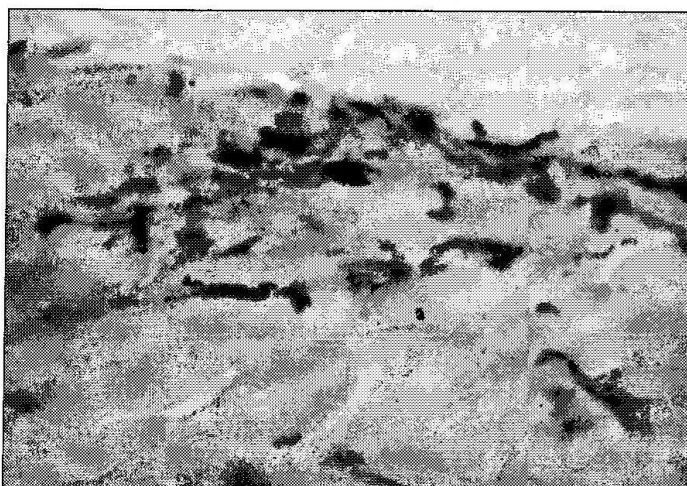


Рис. 3. Ділянка дерми, що регенерує, з поодинокими ендотеліоцитами з експресією CD34. Імунопероксидазна реакція із МКА CD34, виявлення імунних комплексів кролячими антитілами до Ig морських свинок, мічених флюоресцеїнізоціанатом. Зб. $\times 400$. Морська свинка після застосування мазі «Метилурацилова», 21-а доба.

обхідних для утилізації некротичних мас, і живлення епітелію.

Після курсу паравульнарного застосування церебролізину рівень досліджуваних цитокінів у вогнищі вірогідно знизився, порівняно з групою без лікування: IL-1 β – на 23 %, TNF- α – на 27 %, а IL-8 – на 45 % (див. табл. 1). Однак кількість прозапальних цитокінів була вищою, ніж при лікуванні маззю «Метилурацилова».

При мікроскопії препаратів шкіри виявлено ознаки гіперпроліферації епітелію з формуванням товстого шару. Базальна мембрана сформована, за винятком невеликих вогнищ (рис. 4). Субепітеліальна дерма має характерні для сосочкового шару ознаки: багато судин мікроциркуляторного русла, в тому числі артеріол, венул, представлені тонкі звиті колагенові волокна, відзначається також наявність рясних клітинних елементів: макрофаги, лімфоцити, тканинні базофіли.

Відзначається сильна експресія CD34 при постановці імуногістохімічної реакції із МКА CD34, що маркує новостворені артеріоли й венули (рис. 5).

Таким чином, під впливом церебролізину відзначається проліферація епідермісу, утилізація старого колагену, синтез нового й активація ангиогенезу.

На підставі отриманих даних можна констатувати, що при хронічному рановому процесі, викликаному місцевим опроміненням шкіри, основними клітинами-продуктантами прозапальних цитокінів є епідермоцити. Адекватна запальна відповідь на ушкодження є можливою тільки за рахунок міграції клітин із прилеглих тканин (через повну відсутність резидентних клітин у вогнищі). Відсутність запальної реакції – наслідок нездатності цитокінів досягати мети й/або їхнє руйнування у вогнищі відразу після експресії. В результаті, дефект ушкодження, що, по суті, є некротичною масою, не



Рис. 4. Ділянка рани морської свинки після лікування церебрוליном. Змикання епітеліальних шарів, що ростуть із протилежних сторін виразки. Фарбування гематоксиліном і еозином.. Зб. $\times 100$.

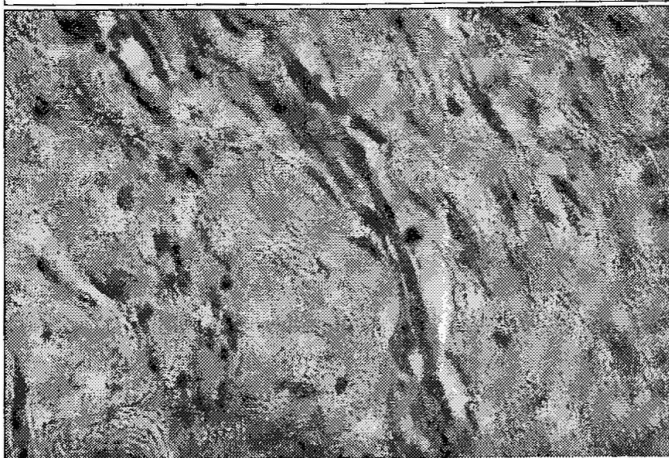


Рис. 5. Експресія CD34 в артеріолах і венулах після паравульнарного введення церебрוליну (21-а доба). Імунопероксидазна реакція із МКА CD34, виявлення імунних комплексів кролячими антитілами до Ig морських свинок, мічених флюоресцеїнізоціанатом. Зб. $\times 400$.

лізується та не відривається, але продовжує стимулювати експресію прозапальних цитокінів, викликати метаболічні порушення.

При лікуванні маззю «Метилурацилова» епідермоцити також є основними продуцентами цитокінів. Для активізації проліферації ці клітини вимушені компенсаторно зменшувати експресію прозапальних цитокінів і активно синтезувати цитокіни, що є необхідними для проліферативних процесів. Це підтверджується високим рівнем IL-8 у вогнищі. На моделі хронічної рани було показано, що місцеве застосування більших доз IL-8 призвело до гіперпроліферації епідермісу, за абсолютної відсутності будь-яких змін у самій дермі [13]. Високий рівень хемокину IL-8 також свідчить про наявність гіпоксії у вогнищі. Через

недостатню васкуляризацію клітини не в змозі синтезувати колаген, необхідний для побудови базальної мембрани, чим обумовлені повторні виразки. Отже, мазь «Метилурацилова» дійсно має ранозагоюючу дію, але очевидна неспроможність цього загоєння, обумовлена проліферацією одного тільки епітелію.

Лікування променевої виразки шкіри церебрוליном знижує рівень IL-1 β , TNF- α і IL-8 у вогнищі на 21-у добу від початку лікування. Підвищення рівня цитокінів, порівняно з маззю «Метилурацилова», при зіставленні гістологічних даних свідчить про залучення до процесу загоєння не тільки епідермоцитів, але й дерми. Таким чином, збільшується загальна кількість клітин-продуцентів цитокінів. Більш високий ранозагоюючий ефект церебрוליну, порівняно з маззю «Метилурацилова», підтверджується загальним зниженням цитокінів у крові [8]. Зниження рівня IL-8 у вогнищі на тлі підвищеної експресії глікопротеїду мембрани ендотеліоцитів CD34 характеризує активний ангіогенез і зниження рівня гіпоксії в рані. При цьому, відзначається стимуляція епітелізації з базальною мембраною й синтезу колагену. Таким чином, отримані дані підтверджують перехід рани зі стадії персистоючого запалення у фазу проліферації, що завершиться подальшою репарацією.

Висновки

1. Хронічний рановий процес, викликаний у морських свинок місцевим радіаційним ушкодженням шкіри, супроводжується підвищенням у вогнищі рівня прозапальних цитокінів і хемокину IL-8, джерелом яких є епідермоцити. Мікроскопічно клітинні елементи відсутні, мікросудини виявляються в незначній кількості, колаген некротизований.
2. Застосування мазі «Метилурацилова», при хронічному рановому процесі, на 21-у добу призводить до зниження у вогнищі (щодо контролю) рівня IL-1 β і TNF- α (на 35–42 %), збільшення рівня IL-8 на

43 %, джерелом яких також є епідермоцити. Морфологічно визначається помірна стимуляція проліферації епітелію без базальної мембрани, новий колаген не синтезується.

3. Застосування церебролізину паравульнарно при хронічному рановому процесі призводить до зниження рівня IL-1 β , TNF- α і IL-8 у вогнищі (щодо контролю) на 21-у добу. Джерелом цитокінів є не стільки епідермо-

цити, скільки клітини дерми. При цьому, реєструється позитивна морфологічна динаміка: утворення товстого шару епітелію зі сформованою базальною мембраною, поновлення нормальної структури колагену в поверхневих і глибоких шарах дерми, активний ангиогенез (висока експресія CD34), що свідчить про більш виражений ранозагоювальний ефект, ніж у мазі «Метилурацилова».

1. Раны и раневая инфекция. Руководство для врачей / Под ред. М.И.Кузина, Б.М.Костюченок. – М.: Медицина, 1990. – 592 с.
2. Menke N.B., Ward K.R., Witten T.M. et al. // Clinics in Dermatology. – 2007. – V.25. – P. 19–25.
3. Harding K.G., Morris H.L., Patel G.K. // BMJ. – 2002. – V.324. – P. 160–163.
4. Nathan B.M., Kevin R.W., Tarynn M.W. et al. // Clinics in Dermatology. – 2007. – V.25. – P. 19–25.
5. Werner S., Grose R. // Physiol. Rev. – 2003. – V.83. – P. 835–870.
6. Амчиславский Е.И., Соколов Д.И., Старикова Э.А., Фрейдлин И.С. // Медицинская иммунология. – 2003. – № 5. – С. 493–506.
7. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – М.: ООО «Новая Волна», Издание 15-е. – 2008. – 1200 с.
8. Звягинцева Т.В., Губина-Вакулик Г.И., Халин И.В., Горбач Т.В. // Вісник Вінницького держ. мед. університету. – 2007. – № 11(2/1). – С. 592–596.
9. Современные методы в биохимии / Под ред. акад. АМН СССР В.Н.Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 63–66.
10. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники. – Ленинградское отделение: Медицина, 1969. – 422 с.
11. Славин М.Б. Методы системного анализа в медицинских исследованиях. – М.: Медицина, 1989. – 304 с.
12. Кулаичев А.П. Методы и средства анализа данных в среде Windows. STADIA 6.0 – Изд. 2-е пер. и доп. – М.: Информатика и компьютеры, 1998. – 270 с.
13. Rennekampff H.O., Hansbrough J.F., Kiessig V. et al. // J. Surg. Res. – 2000. – V.93. – P. 41–54.

Т.В.Звягинцева, И.В.Халин

Влияние церебролизина на иммуноморфологические показатели заживления хронической раны

В патогенезе хронической раны важную роль играют провоспалительные цитокины IL-1 β и TNF- α и регуляторы ангиогенеза: IL-8 и трансмембранный белок CD34. На модели местного лучевого повреждения кожи морских свинок изучали ранозаживляющее действие церебролизина, содержащего комплекс аминокислот и полипептидов из головного мозга свиньи. Препаратом сравнения была мазь «Метилурациловая». Показано, что паравульнарное введение церебролизина при хроническом раневом процессе приводит к снижению уровня IL-1 β , TNF- α и IL-8 в раневом очаге на 21-е сутки. При этом регистрируется положительная морфологическая динамика: образование толстого слоя эпителия со сформированной базальной мембраной, образование нормальной структуры коллагена, высокая экспрессия CD34, что свидетельствует о более выраженном ранозаживляющем эффекте, чем у мази «Метилурациловая».

T.V.Zvyagintseva, I.V.Khalin

Influence of Cerebrolysine on immune and morphological indices of chronic wound healing

The proinflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) and regulators of angiogenesis (IL-8 and CD34) play the main role in chronic wounds pathogenesis. On the model of radiation skin injury of guinea pigs were studied healing effects of Cerebrolysine, which consist of amino acids and polypeptides complex from pig's brain. The methyluracil ointment was the comparative drug. It was shown under chronic wound process that the paravulnar introduction of Cerebrolysine causes increasing of cytokines level in wound focus on 21st day. Histological studies examined the thick layer of epithelium with basal membrane, full-blown angiogenesis and normalization of collagen and cell structure, that confirm more intensive effect of Cerebrolysine than methyluracil ointment.

Надійшла: 05.08.2008 р.

Контактна особа: Звягинцева Тетяна Володимирівна, д.м.н., професор, Харківський національний медичний університет, б. 4, пр. Леніна, м. Харків, 61022. Тел. (057) 707-72-01