

УДК 615.322

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ КАМЕДИ «CERAVUL» НА ПРОЦЕСС РАНОЗАЖИВЛЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VIVO

Нетьлько Г.И., Румакин В.П., Божкова С.А., Полякова Е.М.

*ФБГУ Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии
им. Р.Р. Вредена, Санкт-Петербург, e-mail: ekaterinapolyakova@rambler.ru*

Камедетечение является защитным механизмом растений в ответ на старение, стресс или повреждение, при этом в области раны сосуды ксилемы закрываются камедью, что предохраняет растение от потери воды и инвазии патогенов. В данной работе изучено влияние камеди *Prunus cerasus* на процесс ранозаживления в эксперименте *in vivo* на модели свежей контаминированной раны. Оценку репаративных процессов проводили на 5, 7 и 10 сутки после операции на основании результатов морфологических исследований. В результате было установлено отсутствие раздражающего действия вишневой камеди на окружающие ткани. Показано, что местное применение порошка камеди позволило достичь к 10-м суткам полной эпителизации раневой поверхности с восстановлением зональности эпидермиса и отслойкой струпа.

Ключевые слова: камедь вишни, заживление ран

CHARACTERIZATION OF EFFECT OF «CERAVUL» GUM ON THE WOUND REPAIR PROCESS IN EXPERIMENT IN VIVO

Netylko G.I., Rumakin V.P., Bozhkova S.A., Polyakova E.M.

*Vreden Russian Research Institute of Traumatology and Orthopedics of Minzdrav of Russia,
Saint-Petersburg, e-mail: ekaterinapolyakova@rambler.ru*

Gum exudation is the defense mechanism of the plant in response to ageing, stress or damage. In the damage area the xylem vessels are sealed off by gum that protects the plant from water loss and pathogen invasion. The effect of *Prunus cerasus* gum on wound repair process was studied on *in vivo* experimental model of open contaminated wound. Evaluation of repair processes was carried out on days 5, 7 and 10 based on results of morphological analysis. According the obtained results tested gum had not irritant effect on surrounding tissues. On 10 day the local application of gum powder allowed to reach the complete epithelialization. with epidermis zonation and crust separation.

Keywords: *Prunus cerasus* gum, wound repair process

Камеди – вещества, выделяемые растениями, и представляющие собой высокомолекулярные углеводы, полимеры глюкозы, арабинозы, галактозы, рамнозы и уроновых кислот. Камедетечение является защитным механизмом растений в ответ на старение, стресс или повреждение, при этом в области раны сосуды ксилемы закрываются камедью, предохраняя растение от потери воды и инвазии патогенов.

Являясь гидрофильными соединениями, камеди растворяются в воде с образованием очень вязких растворов. В силу этого и ряда других свойств камеди широко применяют в различных отраслях промышленности, а также в качестве вакцинных адъювантов и компонентов систем доставки лекарственных препаратов [1, 2, 7].

Композиция конкретной камеди сильно варьирует по соотношению моносахаров полисахаридных компонентов не только от вида растения, но и от сезона года, в котором произошло камедетечение [6]. Полисахаридные компоненты исследованной в данной работе камеди вишни (*Prunus cerasus/Cerasus vulgaris*) в основном представлены соединениями группы арабино-

галактанов [6]. Арабиногалактан представляет собой полимер галактозы и арабинозы, обладающий биологической активностью, в том числе иммуномодулирующей активностью [4, 8]. Данная активность арабиногалактана предположительно обусловлена структурой его молекулы, сходной по строению с полисахаридом бактериальной клеточной стенки. Согласно данным ряда исследований арабиногалактан обладает антибактериальной активностью [5, 9].

Вышесказанное позволяет предположить, что за счет своего состава и свойств камеди способны оказывать влияние на развитие раневого процесса.

Цель данного исследования – оценка особенностей заживления инфицированной раны после ее обработки камедью вишни в первой фазе раневого процесса.

Материалы и методы исследования

Исследуемую нами камедь «Ceravul» (камедь Вишни обыкновенной, *Cerasus vulagris/Prunus cerasus*) заготавливали в экологически чистых зонах – Государственное природоохранное учреждение Национальный парк «Браславские озера» Республики Беларусь.

Полученную камедь измельчали на бытовой мельнице (предварительно обработанной АХД 2000) и просеивали через стерильное металлическое сито (ГОСТ 3924-47).

Измельченную камедь выдерживали под УФ-лучами в течение 15 мин (ламинарный шкаф MSC9, Jouan, Thermo Electron Corporation, США). Для оценки стерильности 50 мг обработанной УФ камеди инкубировали в 2 мл триптон-соевого бульона в течение суток.

Влияние камеди на репаративные процессы *in vivo* изучали на 20 беспородных белых мышках-самцах массой 18-20 г (питомник «Рапполово» РАНН), разделенных на две одинаковые группы (опыт и контроль). В экспериментальные группы были отобраны животные без признаков отклонений внешнего вида, так, чтобы индивидуальное значение массы не отклонялось от среднего значения в группе более чем на $\pm 10\%$. Животные находились в идентичных условиях кормления и содержания. Мышей содержали в клетках по 5 особей в условиях искусственного освещения (по 12 часов темного и светлого времени), принудительной 12-кратной в час вентиляции, при температуре 18-26°C и относительной влажности 30-70%.

Содержание и использование лабораторных животных соответствовало правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей, а также Приказу МЗ РФ № 708Н от 23 августа 2010 г. Все манипуляции над животными проводили в условиях чистой операционной вивария ФГБУ «РНИИТО им. Р.Р. Вредена» Минздрава России с соблюдением правил асептики и антисептики под внутривенным наркозом. Все процедуры с животными были рассмотрены и утверждены Локальным этическим комитетом по использованию животных на предмет соответствия этическим принципам.

Условия содержания животных соответствовали стандартам, указанным в руководстве «The Guide for Care and Use of Laboratory Animals» (ILAR publication, National Academy Press, 1996) [10].

Влияние камеди на процесс ранозаживления изучали на модели свежей контаминированной раны. Оперативное вмешательство проводили под кета-

миновым наркозом (0,1 мл 5% раствора). Животное фиксировали в специальном станке в положении на животе. Предварительно проводили эпиляцию места вмешательства и обработку операционного поля раствором АХД. Осуществляли разрез по паравертебральной линии длиной 3 см., на всю толщю кожи. Производили обработку ран: в опытной группе – порошком камеди, в контрольной – раствором фурацилина. Далее рану вели открыто. Эвтаназию животных производили путём передозировки тиопентала натрия – 100 мг внутривенно.

Морфологические исследования проводили на 5, 7 и 10 сутки. Для их проведения выделяли макропрепарат, содержащий область раны и блок окружающих его тканей. Материал фиксировали 10% нейтральным формалином в течение 24 часов. Мягкие ткани в дальнейшем обезживали в водных растворах этанола восходящей концентрации с использованием станции проводки гистологического материала Microm STP-120 (США) с последующей заливкой в парафин на заливочной станции Leica (Германия). Срезы, толщиной 5 мкм, получали на санном микротоме Leica (Германия). Окраску гематоксилином и эозином («Бивитрум», Россия) выполняли с использованием станции окраски «Рафаэлло» (Италия). Патоморфологический анализ гистологических препаратов и фотодокументацию проводили на микроскопе Nikon E-50i (Япония).

Результаты исследования и их обсуждение

В результате анализа макропрепаратов, соответствующих пятым суткам исследования, у мышей контрольной группы отмечалась слабая краевая эпителизация в области дефекта (рис. 1, Б). Дефект поверхностно выполнен гнойно-некротическими массами, на дне дефекта – молодая грануляционная ткань с густой лейкоцитарной инфильтрацией. В некротических массах и грануляционной ткани было выявлено большое количество кокков, расположенных диффузно и скоплениями (рис. 1, А).

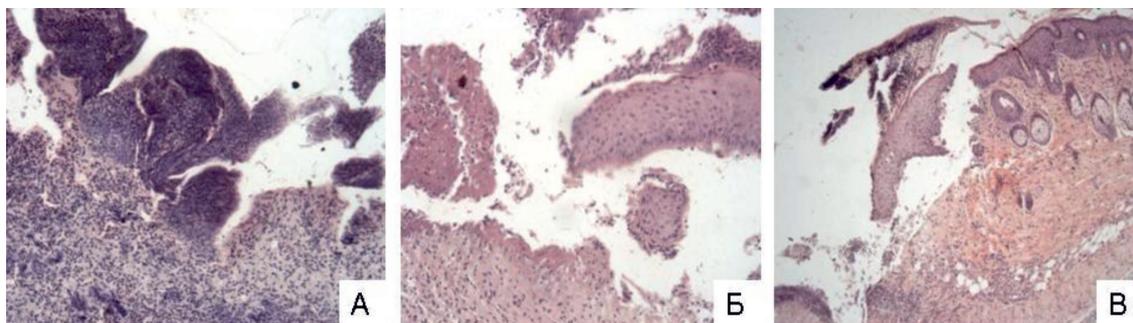


Рис. 1. Фотографии срезов микропрепаратов контроля (А и Б) и опыта (В) на 5 сутки (окраска гематоксилин и эозин, ув. А и Б x200, В x100). А (контроль) – дно дефекта, выполненное гнойно-некротическими инфицированными массами; Б (контроль) – неэпителизованный участок раневой поверхности (слева), краевая эпителизация слабо выражена; В (опыт) – более выраженная эпителизация раневой поверхности под струпом из слабоэозинофильных масс и тканевого детрита

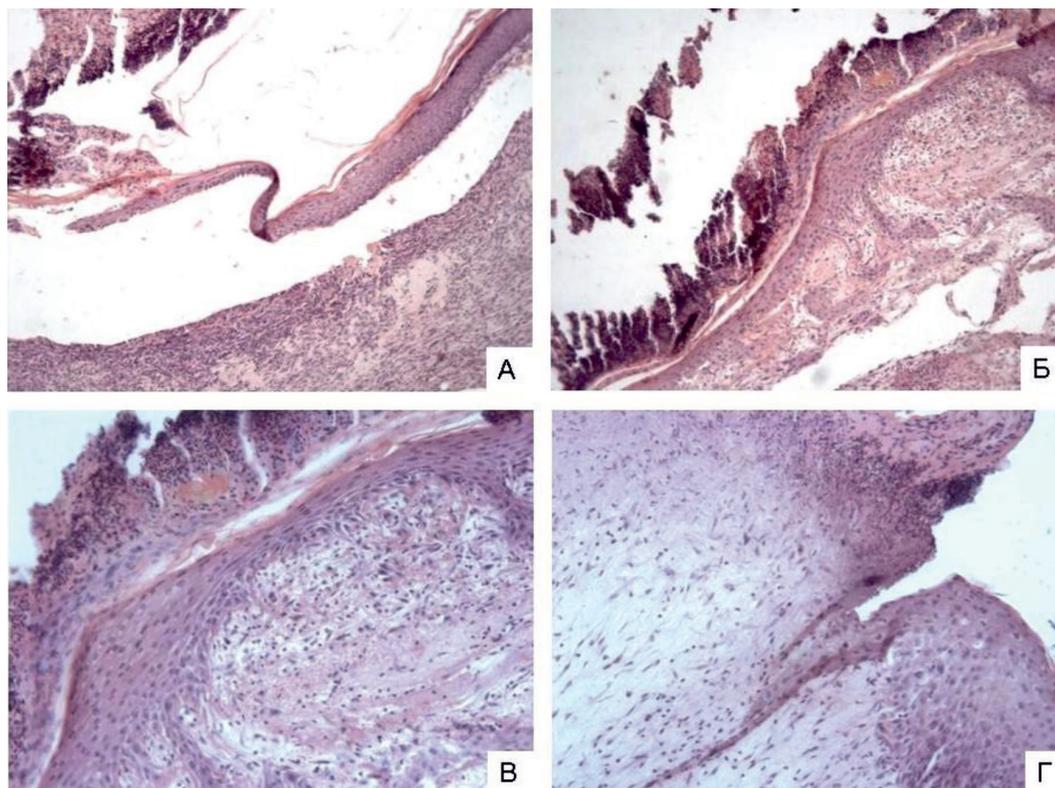


Рис. 2. Фотографии срезов микропрепаратов контроля (А и Б) и опыта (В и Г) на 7 сутки (окраска та же, ув. А – $\times 100$, Б – $\times 200$, В и Г – $\times 400$). А и Б – эпителизация раневой поверхности на большом протяжении, уменьшение воспалительной инфильтрации грануляционной ткани, частичная отслойка струпа; В и Г – эпителизация раневой поверхности на всем протяжении, субэпителиально слабо выраженная воспалительная инфильтрация, частичная отслойка струпа

По сравнению с контролем у мышей опытной группы на пятые сутки краевая эпителизация области дефекта была более выражена, и наблюдалось частичное закрытие эпидермисом значительной части дефекта под струпом из слабоэозинофильных масс и тканевого детрита. Среди грануляций, заполняющих раневую дефект микробных тел не наблюдалось (рис. 1, В).

На седьмые сутки у мышей контрольной группы наблюдалась эпителизация раневой поверхности на значительном протяжении и частичная отслойка струпа, представленного тканевым детритом со скоплениями лейкоцитов. Поверхность раневого дефекта на 4/5 была покрыта эпидермисом, подрастающим под струп. Отмечалось нарушение стратификации новообразованного эпидермиса в результате истончения шиповатого и зернистого слоев. Между пластом новообразованного эпидермиса и заполняющей дефект созревающей грануляционной тканью присутствовали скопления белковых масс и эритроцитов с единичными лимфоцитами и лейкоцитами среди них. Было отмечено

уменьшение воспалительной инфильтрации грануляционной ткани, в толще грануляций были выявлены единичные безядерные мышечные волокна (рис. 2, А, Б).

У мышей опытной группы на седьмые сутки также наблюдалась частичная отслойка струпа. Однако в отличие от контроля раневая поверхность была эпителизирована полностью, а под струпом, представленным тканевым детритом с примесью лейкоцитов, расположен пласт новообразованного эпидермиса, полностью покрывающий площадь раневого дефекта. Вертикальная зональность пласта новообразованного эпидермиса была нарушена в результате истончения шиповатого и зернистого слоев, также как и у контрольных животных. Под эпидермисом была расположена грануляционная ткань с очагами ослизнения, отека, капиллярного полнокровия и скоплениями фибрина. Субэпителиально отмечалась слабо выраженная воспалительная инфильтрация, а также слабая, но более выраженная, чем в контроле, лейкоцитарная инфильтрация созревающей грануляционной ткани (рис. 2, В, Г).

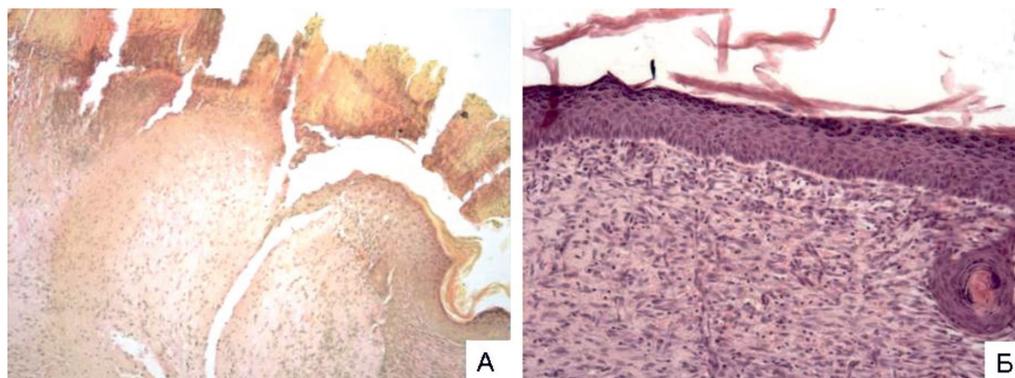


Рис. 3. Фотографии срезов микропрепаратов контроля (А) и опыта (Б) на 10 сутки (окраска А – по Ван Гизону, Б – гематоксилин и эозин, ув. А х100, Б х200. А (контроль) – субтотальная эпителизация раневой поверхности, в центре сохраняется гранулирующая рана под струпом (на рисунке слева), в зрелой грануляционной ткани слабо выраженная воспалительная инфильтрация субэпителиально, частичная отслойка струпа; Б (опыт) – эпителизация раневой поверхности на всем протяжении, субэпителиальный фиброз и слабо выраженная воспалительная инфильтрация в поверхностных слоях, полная отслойка струпа

На десятые сутки у мышей контрольной группы отмечалась субтотальная эпителизация: с обоих краев раневой дефект был покрыт эпидермисом. Наблюдалась частичная отслойка струпа, а в центре дефекта под струпом сохранялся очаг неэпителизированной поверхности мягких тканей, заполненный белковыми массами с растаивающей в них грануляционной тканью разной степени зрелости. В дне дефекта была выявлена слабо выраженная лейкоцитарная инфильтрация детрита и молодых грануляций. Субэпителиально располагалась зрелая грануляционная ткань со слабо выраженной воспалительной инфильтрацией (рис. 3, А).

В отличие от контроля для мышей опытной группы на десятые сутки была показана полная эпителизация раневой поверхности с восстановлением зональности эпидермиса, а также полная отслойка струпа. Отмечались субэпителиальный фиброз и слабо выраженная воспалительная инфильтрация в поверхностных слоях. Наблюдалось созревание грануляционно-фиброзной ткани, заполняющей дефект.

Представленные результаты свидетельствуют об отсутствии раздражающего действия вишневой камеди на окружающие ткани, что согласуется с данными других авторов по оценке влияния гуаровой камеди на мышечные ткани лабораторных животных [2]. Кроме того, согласно полученным данным применение вишневой камеди способствует более ранней элиминации микробных клеток из раны, вероятно, за счет иммуномодулирующих и антибактериальных свойств камеди, продемонстрированных ранее рядом авторов [4, 5, 8, 9].

Заключение

В целом, по результатам исследования можно заключить, что применение вишневой камеди в первой фазе раневого процесса приводит к ускорению процесса заживления, что, по-видимому, обусловлено биоактивными веществами, входящими в ее состав.

Список литературы

1. Архипов А.Н. и др. Сравнительное исследование микроструктуры и состава стабилизаторов растительного происхождения // Техника и технология пищевых производств. – 2011. – Т. 4, № 23. – С. 14–19.
2. Липатов В.А. и др. Оценка реакций тканей лабораторных животных на внутримышечное введение оболочек микрокапсул на основе полимеров альгината натрия, гуаровой камеди, поливинилпирролидона как носителя лекарственных веществ для лечения и профилактики хирургических заболеваний // Верхневолжский медицинский журнал. – 2015. – № 1. – С. 22–26.
3. Медведева Е.Н. и др. Получение высокоочищенного арабиногалактана лиственницы и исследование его иммуномодулирующих свойств // Химия растительного сырья. – 2004. – № 4. – С. 17–23.
4. Оводов Ю.С. Полисахариды цветковых растений: структура и физиологическая активность // Биоорганическая химия. – 1998. – Т. 24, № 7. С. 483–501.
5. Alam Md. J. and Barua R. In vitro regeneration and antibacterial activity of *Prunus domestica* L. // J. BioSci. Biotechnol. – 2015. – V. 4, № 1. P. 9–15.
6. Amarioarei G., Lungu M., Cioviță S. Molar mass characteristics of cherry tree exudate gums of different seasons. // Cellulose Chem. Technol. – 2012. – V. 46, № 9-10. P. 583–588.
7. Bacelo K.L. et al. Xanthan gum as an adjuvant in a subunit vaccine preparation against leptospirosis. // Biomed Res Int. – 2014 – 2014:636491.
8. Xuan N.T. et al. Stimulation of mouse dendritic cells by Gum Arabic. // Cell Physiol Biochem. – 2010. – V. 25, № 6. P. 641–648.
9. Yao X.C., Cao Y., Wu S.J. Antioxidant activity and antibacterial activity of peach gum derived oligosaccharides. // Int J Biol Macromol. – 2013. – V. 62: P. 1–3.
10. <https://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>.