УДК 616-092.9:615.454.1:616.5-002

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ НОВИХ РАНОЗАГОЮВАЛЬНИХ МАЗЕЙ, ЩО МІСТЯТЬ ФІТО- І АПІКОМПОНЕНТИ НА РІВЕНЬ ПРОЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ КРОВІ У ЩУРІВ ПІСЛЯ ОПІКОВОЇ ТРАВМИ

Ткачова О.В., Яковлєва Л.В.
Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна
tkachevaov@gmail.com

Лікування ранового процесу (РП) залишається однією з актуальних проблем в хірургії та комбустіології, не зважаючи на досягнення сучасної медицини [1, 2]. Сучасна хірургія, ґрунтується на застосуванні лікарських засобів (ЛЗ) в залежності від фази РП. На фармацевтичному ринку України більшість препаратів для місцевого лікування РП не відповідають медико-біологічним вимогам щодо спектру фармакологічної дії, складу основи та кількості діючих компонентів, що потребує розширення асортименту ефективних мазей, розроблених за медико-біологічними вимогами та з використанням сучасних технологій, як для лікування ран у І фазі (гнійно-некротичній), так у ІІ (фазі грануляції) і ІІІ фазах (епітелізації).

Лікарська рослинна сировини та продукти апітерапії привертають увагу багатьох вчених, при розробці нових ранозагоювальних ЛЗ. Поєднання широкого спектру фармакологічної дії фітокомпонентів та відсутність токсичного впливу на організм людини дозволяють створювати на їх основі високоефективні та безпечні препарати. Враховуючи потребу фармацевтичного ринку у комбінованих препаратах для місцевого лікування РП, вченими НФаУ було проведено низку досліджень по виділенню природних субстанцій, що мають комплекс БАР з широким спектром фармакологічної активності. Широке застосування в традиційній та нетрадиційній медицині прополісу спонукало вчених НФаУ до виділення фенольного гідрофобного препарату прополісу (ФГПП), що містить фенольні сполуки – 81,33 % від усієї маси фракції. У доклінічних дослідженнях було встановлено антиоксидантну, протизапальну, протимікробну і репаративну активності ФГПП [3]. Лікувальний спектр ФГПП став підґрунтям для створення нової ранозагоювальної мазі «Пролідоксид» розробленої на гідрофільній поліетиленоксидній основі з включенням до складу місцевого анестетика лідокаїну [4, 5, 6].

Дослідниками НФаУ і ПАТ ХФЗ «Червона Зірка» з кори дуба був отриманий густий екстракт (ГЕКД), що виявляє в’яжучі, протимікробні та протизапальні властивості за рахунок катехінів, галової кислоти та її похідних, що складають 13 % у складі ГЕКД в перерахунку на пірогалол [7, 8]. Доклінічні дослідження ГЕКД показали його безпечність і широкий спектр фармакологічної активності (протизапальну, репаративну, антиоксидантну, в’яжучу, мембраностабілізувальну), що забезпечило розробку на основі ГЕКД нової ранозагоювальної мазі «Біофлорин», призначеної у ІІ-ІІІ фазах РП [9, 10]. З метою посилення активності ГЕКД до складу мазі був включений другий діючий компонент – ефірна олія коріандру, що містить ліналоол (65-90 %), ліналілацетат

(3-5 %), гераніол і геранілацетат (до 3%), камфору (до 4 %), монотерпенові вуглеводи: α-пінен, камфен, дипентен і γ-терпінен (до 20 %), які забезпечили їй протимікробну, протизапальну, антиоксидантну, репаративну, мембраностабілізувальну дії [11, 12]. Враховуючи призначення мазі «Біофлорин» для застосування у II-III фазах РП, її розроблено на емульсійній основі I роду з помірною осмотичною активністю – 100 % [13, 14].

Опікова травма III ступеня відноситься до поширених пошкоджень шкіри з розвитком неспецифічної запальної реакції з переходом в структурно-метаболічні порушення органів, тканин і систем. У реалізації запалення важливе місце займають прозапальні цитокіни: IL1α і фактор некрозу пухлини (TNFα), які стимулюють розвиток запальної реакції [15]. Місцева консервативна терапія опікових ран – одна зі складових фармакотерапії опіків.

Метою даної роботи стало експериментальне вивчення впливу нових ранозагоювальних мазей «Пролідоксид» і «Біофлорин» на рівень прозапальних цитокінів крові у щурів після опікової травми.

Матеріали та методи. Експеримент проводили на 84 білих безпородних щарах самцях масою 200-240 г, вирощених у розпліднику віварію ЦНДЛ НФаУ. Роботу з тваринами виконували відповідно до принципів Європейської конвенції з захисту лабораторних тварин із дотриманням норм GLP.

Тваринам під тіопенталовим наркозом на депільованій ділянці шкіри спини, відступивши від хребта 1,5 см моделювали опік. Для цього використовували прилад зі встановленою температурною шкалою і електропаяльником, на кінці якого кріпиться кругла металева пластина діаметром 2,5 см. Час експозиції нагрітої до 200 ^{0}С контактної пластинки становив 10 сек, що дозволило отримати стандартні за площею і глибиною ураження опіки шкіри IIIA ступеня [16]. Експериментальні тварини були розділені на 5 груп: I – інтактний контроль (ІК), II – позитивний контроль (ПК), III і IV групи лікували мазями «Пролідоксид» і «Біофлорін», а V групу – препаратом порівняння маззю «Альгофін» (" Червона зірка"). Визначення рівня прозапальних цитокінів в крові щурів проводили на аналізаторі «Libline-90» (Австрія) на 2-й, 9-й і 18-й дні.

Результати. Отримані результати динаміки біохімічних показників на моделі опікової травми IIIA ступеня у щурів наведені в таблиці 1.

Згідно з отриманими результатами, розвиток ранового процесу на 2-й день супроводжувалося багатократним підвищенням рівня цитокінів: IL1α – в 32-35 разів, а TNFα – в 15 разів, що свідчить про значну активацію імунної відповіді. Значний цитокіновий стрибок свідчив про важкість стану тварин та активацію імунної відповіді, пов’язану з каскадом послідовних реакцій: гіперактивацією фагоцитуючих клітин та із залучення епітеліальних і ендотеліальних клітин, пов'язаних з деструкцією тканин [17]. При «класичному» запаленні основним джерелом цитокінів є лейкоцити і макрофаги запального інфільтрату, а при системному запаленні, що лежить в основі опікової травми III-A ступеня – активовані ендотеліоцити і судинні макрофаги, що визначає більш високий рівень цитокінемії.

Вивчення рівня прозапальних цитокінів в динаміці показало, що на 9 день спостерігали зниження IL1a і TNFα в 1,6 разу, а на 18 день рівень IL1α знизився в 5,4-5,7 разу, а TNFα – в 8,4-9,5 разу по відношенню до піку патології на 2 день. Незважаючи на значне зниження рівня цитокінів у крові, їх показники достовірно перевищували рівень показників тварин ІК.

Таблиця 1

Динаміка біохімічних показників на моделі опікової травми ІІІА ступеня у щурів, ($\overline{X} \pm S_{\overline{X}}$)

Показники	Термін	Інтактний контроль	Позитивний контроль	Мазь «Пролідоксид»	Мазь «Біофлорин»	Мазь «Альгофін»
Інтерлейкін-1α, пкг/л	2 день	2,05± 0,31	72,48± 1,51*	–	–	–
	9 день		46,84± 1,81*	32,83± 1,48*,**	30,02± 1,02*,**,***	49,78± 1,03*
	18 день		12,84± 0,92*	6,18± 0,37*,**	4,40± 0,17**,***	8,86± 0,32*
Фактор некрозу пухлин-α, пкг/л	2 день	15,69± 1,62	229,38± 10,63*	–	–	–
	9 день		145,91± 6,41*	133,26± 7,41*	115,14± 5,39*	164,71± 2,75*
	18 день		28,51± 1,56*	16,83± 0,89**, ***	15,20± 0,87**,***	21,17± 0,52*

Примітки:
1. * – відхилення вірогідне щодо інтактного контролю, p<0,05;
2. ** – відхилення вірогідне щодо позитивного контролю, p<0,05;
3. *** – відхилення вірогідне щодо мазі «Альгофін», p<0,05.

Лікування опіків фітомазями «Біофлорин» і «Пролідоксид» сприяло позитивній динаміці цитокінів, достовірному зниженню їх значень по відношенню до групи позитивного контролю і препарату порівняння – мазі «Альгофін» на 18-й день. Рівень IL1α на 9-й день під дією мазей «Пролідоксид» і «Біофлорин» знизився у 2,2-2,4 разу, на 18-й – в 11,7-16,5 разу, а при лікуванні препаратом порівняння на 9-й день – у 1,5 разу, на 18-й – у 8,2 разу по відношенню до 2-го дня. Рівень TNFα під впливом досліджуваних мазей на 9-й день знизився в 1,7-2 разу, на 18-й – у 13,6-15,1 разу, а при лікуванні маззю «Альгофін» – на 9-й день – в 1,4 разу, на 18-й – в 10,8 разу по відношенню до 2-го дня.

Повного пригнічення запалення на 18-й день під впливом мазей «Пролідоксид» і «Альгофін» не відбулося, про що свідчили вірогідно більші рівні показників цитокінів IL1α і TNFα (в групі, що отримувала мазь «Альгофін»).

Мазь «Біофлорин» більш активно, порівняно з маззю «Пролідоксид», вплинула на відновлення рівня біохімічних показників, оскільки на 18-й день вірогідно, щодо 2-го дня знижувала рівні IL1α та TNFα.

Більш виражена протизапальна активність мазі «Біофлорин» вплинула на скорочення термінів загоєння опікових ран у тварин на 5 діб порівняно з тваринами групи ПК, на 2 та на 3 доби відповідно – порівняно з мазями «Пролідоксид» і «Альгофін». Таким чином, мазь «Біофлорин» активніше мазь за «Пролідоксид» і за препарат порівняння впливала на прискорення процесів репарації як за біохімічними показниками, так і за швидкістю процесу загоєння. При лікуванні маззю «Біофлорін» загоєння відбулося на 21-й день, при лікуванні маззю «Пролідоксид» – на 23-й день, під впливом мазі «Альгофін» – на 24-й день, в групі позитивного контролю – на 26 день.

Висновки:

1. Достовірне зниження рівнів прозапальних цитокінів – IL1α і TNFα на 18 день лікування опікової травми IIIA ступеня під впливом мазей «Біофлорін» і «Пролідоксид» свідчить про ефективність місцевого лікування опіків шкіри у щурів. За вираженістю ранозагоювальної дії нові фітопрепарати перевищують ефективність препарату порівняння – мазі "Альгофін".

2. В механізмі лікувальної дії мазі «Біофлорин» провідною є антиоксидантна, мембраностабілізувальна й протимікробна дія комплексу дубильних речовин ГЕКД та біологічно-активних речовин ефірної олії коріандру, біодоступність яких забезпечена емульсійною основою мазі, що містить ПЕГ-провідники.

3. Механізм ранозагоювальної дії мазі «Пролідоксид» реалізується за рахунок мембраностабілізувальної активності фенольних сполук ФГПП та їх здатності впливати на макрофагальну ланку запально-репаративної реакції, в результаті чого посилюється хемотаксис в рану макрофагів, проліферація і диференціювання фібробластів, відновлюються міжклітинні утворення, відбувається дозрівання грануляційної тканини.

Список літератури:

1. Wound healing in the 21st century / S. Schreml, R. M. Szeimies, L. Prantl et al. // J. Am. Acad. Dermatol. – 2010. – Vol. 63, № 5. – P. 866–881.
2. Козинець Г. П. Надання комбустіологічної допомоги населенню України за 2011-2012 роки в умовах використання нових технологій хірургічного лікування ран / Г. П. Козинець, М. П. Комаров // Клін. хірургія. – 2013. – № 11 (Додаток). – С. 12–13.
3. Теория и практика производства лекарственных препаратов прополиса / А. И. Тихонов, Т. Г. Ярных, В. П. Черных и др. – Х. : Основа, 1998. – 384 с.
4. Хохленкова Н. В. Исследование мази с фенольным гидрофобным препаратом прополиса / Н. В. Хохленкова, Т. Г. Ярных, В. Н. Чушенко // Фармаком. – 2003. – № 3. – С. 75–78.
5. Tikhonov O. I. Research of ointment with phenolic hydrophobic Propolis preparation / O. I. Tikhonov, T. G. Jarnych, N. V. Khokhlenkova // Intern. Scient. Conf. “Pharmacy in contemporary society”. – Kaunas, 2003. – P. 93–97.
6. Патент України на винахід №60849. Мазь «Пролідоксид» для місцевого лікування ран та опіків / О. І. Тихонов, В. П. Черних, Т. Г. Ярних, Л. В. Яковлєва, С. С. Кальф-Каліф, О. В. Ткачова, Н. В. Хохленкова // опубл. 15.11.2005 р., бюл. №11. – 6 с.

7. Ярних Т. Г. Вибір оптимальних технологічних параметрів отримання густого екстракту з кори дуба / Т. Г. Ярних, Н. В. Хохленкова, В. М. Чушенко // Вісник фармації. – 2007. – № 3 (51). – С. 27–29.
8. Патент на корисну модель №53420. Спосіб одержання засобу з протизапальною, мембраностабілізуючою та антимікробною активністю / Т. Г. Ярних, Н. В. Хохленкова, М. В. Буряк, Л. В. Яковлєва, О. В. Ткачова // опубл. 11.10.2010 р., бюл. №19 . – 5 с.
9. Яковлева Л. В. Изучение фармакологической активности и безвредности экстракта коры дуба / Л. В. Яковлева, О. В. Ткачева, Ф. А. Саллуб // Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : матер. І-ї Міжнар. наук.-практ. конф., м. Тернопіль, 6-7 квітня 2006 р. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2006. – С. 178-180.
10. Ткачова О. В. Експериментальне обгрунтування вмісту густого екстракту кори дуба у складі ранозагоювальної мазі / О.В. Ткачова, Л.В. Яковлєва, О.М. Горбань // Український біофармацевтичний журнал. – 2011.– № 4 (15). – С. 32–35.
11. Biological effects of essential oils: a review / F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck // Food Chem. Toxicol. – 2008. – Vol. 46, № 2. – P. 446–475.
12. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils / A. T. Peana, P. S. D'Aquila, F. Panin et al. // Phytomedicine. – 2003. – Vol. 9, № 8. – P. 721–726.
13. Буряк М. В. Фізико-хімічні дослідження мазі на основі густого екстракту кори дуба / М. В. Буряк, Н. В. Хохленкова, Т. Г. Ярних // Актуальні питання фармац. і медич. науки та практики. – 2011. – Вип. XXIV, № 1. – С. 81–82.
14. Хохленкова Н. В. Теоретичне та експериментальне обґрунтування фармацевтичної розробки лікарських препаратів на основі кори дуба для комплексної терапії раневого процесу : автореф. дис.… д-р фарм. наук, 15.00.01 "технологія ліків, організація фармацевтичної справи та судова фармація" / Н. В. Хохленкова; Нац. фармац. ун-т. – Харків, 2013. – 42 с.
15. Кетлинский С. А. Цитокины / С. А. Кетлинский, А. С. Симбирцев. – СПб. : Фолиант, 2008. – 552 с.
16. Яковлєва Л. В. Експериментальне вивчення нових препаратів для місцевого лікування ран : методичні рекомендації / Л. В. Яковлєва, О. В. Ткачова, Я. О. Бутко. – К.: ДЕЦ МОЗ України, 2013. – 52 с.
17. Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair / T. Lucas, A. Waisman, R. Ranjan et al. // J. Immunol. – 2010. – Vol. 184, № 7. – P. 3964–3977.