

На правах рукописи

**КУЦОЛЯ Мария Анатольевна**

**ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРА «РОНКОЛЕЙКИН» НА  
ПОСТТРАВМАТИЧЕСКУЮ РЕГЕНЕРАЦИЮ РАН КОЖИ**

14.00.25 – фармакология, клиническая фармакология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук



**Старая Купавна, 2008**

Работа выполнена на кафедрах фундаментальной и клинической фармакологии и биологии Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Тверская государственная медицинская академия» Росздрава

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор Г.А. Базанов  
доктор биологических наук, доцент М.Б. Петрова

Официальные оппоненты;

доктор медицинских наук, профессор И.В. Березовская  
доктор медицинских наук, профессор И.Г. Козлов

Ведущая организация: ГУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН

Защита диссертации состоится 21 02 2009 года в 13 часов на заседании Диссертационного совета Д 217.004.01 ОАО «ВНЦ БАВ» (142450, Московская обл., г. Старая Купавна, ул. Кирова, 23).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВНЦ БАВ и на сайте ВНЦ БАВ ([www.vnc@dio.ru](http://www.vnc@dio.ru))

Автореферат разослан 21 01 2009 года

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор биологических наук, профессор

Л.В. Корольченко

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Современная медицина позволяет применять различные способы лечения ран, в том числе и с помощью лекарственных средств. Однако до сих пор ведется постоянный поиск оптимальных методов стимуляции заживления обширных ран, ожогов, трофических язв кожи [Вялов С. П., 1999; Хомулло Г. В., Базанов Г. А., 2004; Волкова О. В., 2006]. Известно значительное количество веществ природного и синтетического происхождения, обладающих репаративными свойствами. Вместе с тем предпочтение отдается естественным природным средствам из разных фармакологических групп, которые в отличие от веществ синтетического происхождения чаще всего лишены побочных эффектов [Спиридонова Т. Г., 2001; Решетько О. В. и соавт., 2008; Kubo K., Kuroyanagi Y., 2003].

В связи с этим интерес к веществам биогенной природы, которые позволяют обнаружить новые эффективные фармакологические пути решения проблемы оптимизации процессов регенерации и репарации, вполне объясним. К группе веществ, перспективных для изучения в этом направлении, относятся иммуномодулирующие средства, т. к. установлено непосредственное регулирующее влияние иммунной системы на течение восстановительных процессов в тканях организма [Ершов Ф. И., 1995; Пустовалова Р. А. и соавт., 2008; Stotzem C. D. et al., 1992]. В частности, как иммуностропное средство в медицинской практике применяют иммуномодулятор «Ронколейкин», созданный на базе интерлейкина-2 [Скороходкина О. В., 2000; Николаева З. К., 2002]. Лекарственный препарат «Ронколейкин» разработан медико-биотехнологической фирмой ООО «БИОТЕХ», организованной на базе лаборатории биохимической генетики Санкт-Петербургского государственного университета совместно с СПбНИИ вакцин и сывороток. Он разрешён для медицинского применения и промышленного выпуска Приказом Министерства здравоохранения и медицинской промышленности Российской Федерации № 249 от 31 августа 1995 г. В настоящее время препарат эффективно используется в комплексной терапии септических состояний, сопровождающихся иммуносупрессией (сепсис посттравматический, раневой, хирургический, ожоговый), а также при лечении перитонита, острого панкреатита, онкологических заболеваний, туберкулеза [Козлов В.К., 2002; Попович А.М., 2004; Мишура В.М. и соавт., 2004]. Способность «Ронколейкина» индуцировать рост, дифференцировку и пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, моноцитов, макрофагов, олигодендральных, эпидермальных клеток [Егорова В. Н. и соавт., 2001; Варганов М. В. и соавт., 2005; Варюшина Е. А. и соавт., 2007] позволяет предполагать у этого лекарственного средства не только иммуностропную активность и способность к стимуляции антиинфекционной защиты организма, но и возможность активации процессов ранозаживления. Данные о влиянии препарата «Ронколейкин» на активность репаративных и регенерационных процессов отсутствуют. Поэтому обоснованным, своевременным и актуальным является изучение регенераторных

способностей и механизма «Ронколейкина», входящего в фармакологическую группу иммуномодуляторов.

**Цель:** исследование влияния «Ронколейкина» на репаративные и регенерационные процессы в экспериментальных полнослойных дефектах кожи у крыс.

В соответствии с поставленной целью при выполнении настоящей работы решались **следующие задачи:**

1. Изучить влияние «Ронколейкина» на цитологические изменения при регенерации ран кожи в эксперименте.
2. Проанализировать микроскопические изменения в регенерирующих структурах раны при использовании «Ронколейкина».
3. Определить ультраструктурные особенности фибробластов грануляционной ткани заживающей раны при воздействии на экспериментальных животных «Ронколейкином».
4. Оценить влияние различных способов назначения «Ронколейкина» на активность репаративных процессов в травматических ранах кожи.

**Научная новизна.** С помощью комплекса экспериментальных морфологических методик установлено стимулирующее влияние иммуномодулятора «Ронколейкин» на течение различных этапов репаративного процесса. Впервые определена динамика восстановительных процессов при применении препарата на отдельных этапах заживления ран кожи на разных уровнях структурной организации (субклеточном, клеточном, тканевом и органном). Впервые изучены и сопоставлены скорость, характер и специфика заживления ран в эксперименте на модели полнослойного дефекта кожи при различных способах применения «Ронколейкина» (аппликация на рану, подкожное введение и сочетанное воздействие).

**Научно-практическая значимость работы.** Проведенные исследования позволили выявить пути реализации положительного воздействия иммуномодулятора «Ронколейкина» на репаративные процессы. Особенности морфофизиологических изменений регенерирующей ткани на всех этапах репаративного процесса в проведенных исследованиях дают возможность обеспечить оптимальное использование препарата для достижения эффекта стимуляции при заживлении полнослойных дефектов кожи. Полученные результаты могут быть использованы для обоснования последующего внедрения в клиническую практику «Ронколейкина» как ранозаживляющего средства.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Препарат «Ронколейкин» обладает противовоспалительным, противоотечным действием, проявляющимися при восстановлении раневых полнослойных дефектов кожи.
2. Под влиянием «Ронколейкина» происходит стимуляция пролиферативных процессов в регенерирующих тканях.
3. Раствор иммуномодулятора «Ронколейкин» в использованных дозах и концентрациях и различных способах применения сокращает сроки

заживления ран кожи у экспериментальных животных на  $2,5 \pm 0,5$  дня, что объясняется ускорением всех этапов посттравматической регенерации при сохранении последовательности их осуществления.

4. Иммуномодулятор «Ронколейкин» является перспективным препаратом для внедрения в клиническую практику в качестве потенциального средства, стимулирующего заживление ран кожи.

**Апробация работы и внедрение.** Материалы и основные положения диссертации доложены и обсуждены на Пятой медицинской ассамблее союза городов Заполярья и Крайнего Севера (Москва, 2004); XIII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2006); I Международной (X Всероссийской) Пироговской студенческой научной медицинской конференции (Москва, 2006); международной конференции «Структурные преобразования органов и тканей на этапах онтогенеза в норме и при воздействии антропогенных факторов. Экология и здоровье человека» (Астрахань, 2007), XV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2008); на совместных заседаниях кафедр фундаментальной и клинической фармакологии и биологии ГОУ ВПО ТГМА (Тверь, 2008).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано десять научных работ, в том числе две – в изданиях, рекомендованных ВАК.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 174 страницах машинописного текста. Состоит из следующих разделов: общей характеристики работы, обзора литературы, 3-х глав результатов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Библиографический список включает 286 источников, из них 187 отечественных и 99 иностранных авторов. Работа иллюстрирована 65 рисунками (59 микрофотографий, 3 графика и 3 схемы), содержит 18 таблиц.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом исследования являлся препарат «Ронколейкин», синтезированный медико-биотехнологической фирмой ООО «БИОТЕХ» на базе лаборатории биохимической генетики Санкт-Петербургского государственного университета и НИИ вакцин и сывороток. «Ронколейкин» представляет собой сухой порошок для инъекций в ампулах. Количество вещества в ампуле 0,5 мг (500000 МЕ). Серия №140705. Перед применением препарат разводился изотоническим раствором хлорида натрия для инъекций. Дозы и концентрации иммуномодулятора «Ронколейкин», используемые в эксперименте, были выбраны на основании собственных предварительных исследований, рекомендаций специалистов фирмы ООО «БИОТЕХ» и данных, полученных другими исследователями [Отчёт НИИ технологии и безопасности лекарственных средств по теме «Доклиническая оценка тератогенного действия интерлейкина», 1989; Отчёт ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН РФ по экспериментальному исследованию «Оценка активности ИЛ-2 в биотесте», 2001; Отчёт НИИ

технологии и безопасности лекарственных средств по теме «Доклиническая Отчёт отдела НИИЦ (МБЗ) ГНИИИВМ МО РФ «Экспериментальное изучение безвредности препарата «Ронколейкин» на неполовозрелых животных», 2001],

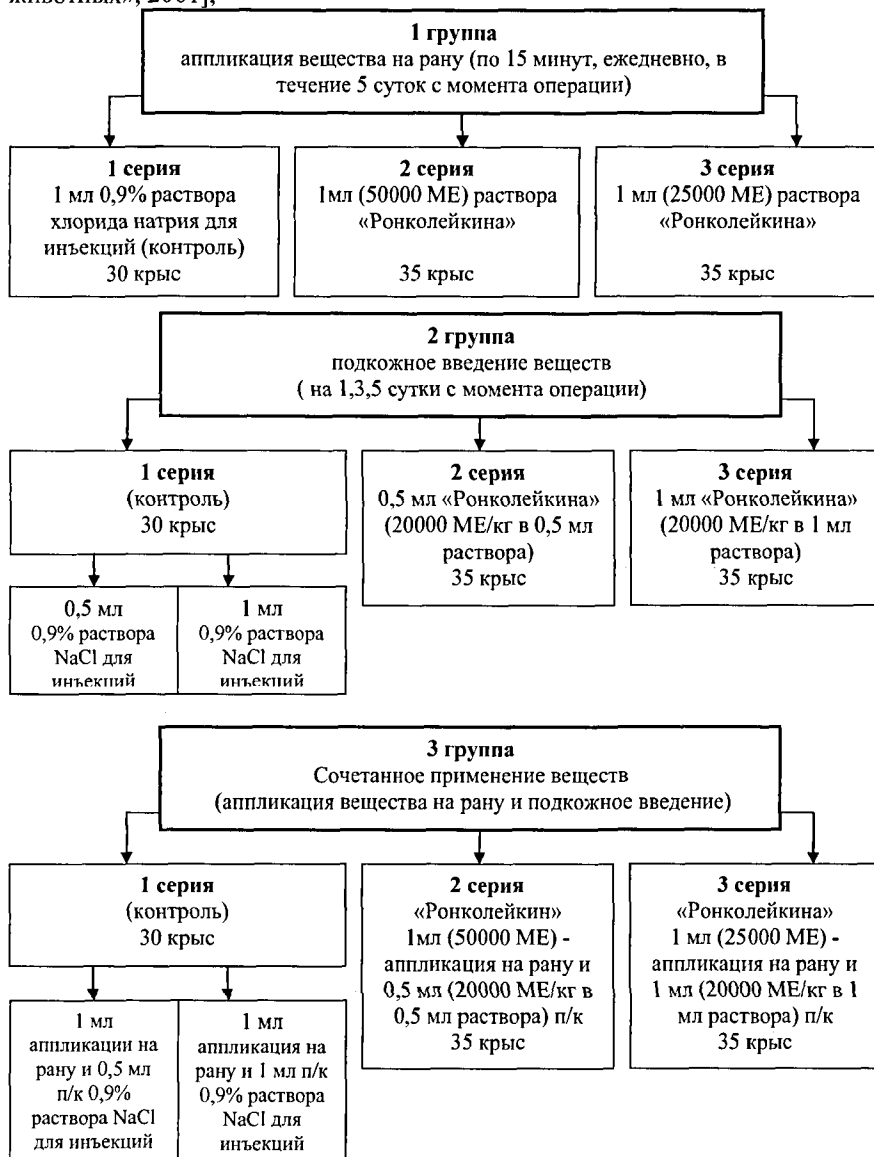


Рис. 1. Схема применения иммуномодулятора «Ронколейкин» и изотонического раствора хлорида натрия для инъекций

Оценка «Ронколейкина», направленная на анализ проявления репаративных эффектов, проводилась на модели заживления полнослойного дефекта кожи у крыс [Петрова М.Б., 1993; Хомулло Г. В., 1996; Харитоновна Е.А., 1997]. В эксперименте использовано 300 животных массой  $180 \pm 20$  г. Все манипуляции, причиняющие животным боль, проводились под эфирным наркозом. Животным всех серий на спине в межлопаточной области удалялся волосяной покров с помощью специального депиляционного крема «Орйса». На операционное поле, обработанное 70% этиловым спиртом, прикладывался смоченный 5% спиртовым раствором йода трафарет в форме квадрата площадью  $225 \text{ мм}^2$ . Остроконечными ножницами по границе отпечатка удалялся полнослойный лоскут кожи. Заживление ран происходило открытым способом.

Назначение препарата крысам осуществлялось разными способами: аппликацией бинта, сложенного вчетверо и смоченного 1 мл соответствующего раствора, на поверхность раны, подкожной инъекцией в заднюю конечность или сочетанным воздействием этих приемов (аппликация на рану + инъекция). Выполнено 3 группы экспериментов. В каждой группе животных разделяли на 3 серии: 1 – контрольная – использовался 0,9% раствор хлорида натрия для инъекций; животные 2 и 3 серии получали препарат «Ронколейкин» на изотоническом растворе хлорида натрия для инъекций. Концентрации и объемы препаратов, кратность назначения, время воздействия и способы нанесения веществ представлены на рис. 1.

Цитологический анализ раневого отделяемого на стадии экссудации репаративного процесса проводился с использованием методики М. П. Покровской и М. С. Макарова [Семченко В. В. и соавт., 2003].

От каждой крысы получали по 3 мазка-отпечатка с поверхности раны на предметное стекло через 6, 12 и 24 часа после нанесения ран кожи. Мазки-отпечатки проводились по методике Романовского-Гимзе [Артишевский А. А. и соавт., 1999]. Цитограммы изучались под световым микроскопом МБИ производства «Биолам-ЛОМО». При анализе цитограмм оценивалось количество, размеры ядер и сроки появления клеточных элементов, принимающих наиболее активное участие в раневом процессе – нейтрофилов и макрофагов. Диаметр ядер этих клеток в микрометрах измерялся с помощью сетки окулярного микрометра.

По окончании опытов из контрольных серий животные выводились из эксперимента на каждую временную точку (5, 10 и 15 суток) по 10 крыс, из опытных серий - по  $12 \pm 1$ .

Для сравнительного анализа микроструктурных изменений, происходящих в процессе регенерации кожного покрова, использовали метод гистологического исследования. Биоптаты краев раны забирали через 5, 10 и 15 дней после нанесения кожных повреждений. Остроконечными ножницами иссекались края раны с участками ( $1,5 \pm 0,5$  мм) интактной кожи. После гистологической обработки из них изготавливали срезы, толщиной  $6,5 \pm 0,5$  микрон, окрашивали гематоксилином с эозином и изучали под

световым микроскопом. С помощью сетки окулярного микрометра определялась величина новообразованных структур регенерирующей раны: высота струпа, лейкоцитарного вала, толщина грануляционной ткани и эпителиального регенерата, его протяженность.

Изучение особенностей ультраструктурной организации фибробластов грануляционной ткани заживающей раны проводилось с помощью электронномикроскопического метода. Биопсию грануляционной ткани у животных проводили через 5 и 10 дней после нанесения кожной раны. Кусочки ткани брались из средних слоев грануляций или с поверхности раны на границе с неповрежденной кожей.

Ультратонкие срезы изготавливались на ультратоме УМТП-6 («SEO», г. Сумы) и наносились на палладируемые сеточки без подложки. Контрастирование ультратонких срезов проводили насыщенным раствором уранилацетата на 70° этиловом спирте в течение 30 минут, после чего отмывали их в 0,02% растворе NaOH, а затем в дистиллированной воде в течение 3-х минут. Ультратонкие срезы изучались и фотографировались на пленку с помощью электронного микроскопа ЭВМ-100 («SEO», г. Сумы) при ускоряющем напряжении 75 киловольт.

Все количественные результаты экспериментов подвергались обработке по общепринятой в математической статистике методике в Microsoft Excel XP (версия 7,0). Статистическая достоверность различий средних величин определялась по критерию Стьюдента, за достоверные принимали отличия при уровне вероятности  $p \leq 0,001$  [Лапач С. Н. и соавт., 2000; Хафизьянова Р. Х. и соавт., 2006, Туровцев В.В., 2008].

## **1. Цитологические изменения ран после воздействия «Ронколейкином»**

По результатам анализа качественных и количественных различий цитогрaмм животных сравнимых серий установлена высокая активность и лейкоцитов и макрофагов у крыс, получавших иммунотерапию «Ронколейкином». Сопоставление результатов проведенных исследований позволяет нам утверждать, что аппликация на рану, подкожная инъекция или введение «Ронколейкина» сочетанием этих способов приводит к сходным цитологическим изменениям при осуществлении раневого процесса у крыс. Этот факт иллюстрируется гистограммами, которые отображают изменение количества нейтрофильных лейкоцитов в экссудате животных в зависимости от способа применения препаратов и сроков получения мазков-отпечатков (рис. 2, 3, 4).

Эффект применения растворов «Ронколейкина» разной концентрации в виде аппликаций на рану через 6 часов после нанесения кожного дефекта проявляется в увеличении общего количества мигрирующих в область раны нейтрофильных лейкоцитов по сравнению с контролем ( $289,0 \pm 24,7$  и  $345,0 \pm 24,7$  против  $246,0 \pm 28,1$  в контрольной 1-ой серии), а также ускорении их дифференцировки. Выраженная макрофагальная фаза процесса экссудации обусловлена активным выселением из кровеносного русла



лейкоцитов, т. к. известно, что нейтрофилы выделяют комплекс биологически активных веществ, способствующих дифференцировке макрофагов и повышению их активности [Маянский, А. Н., 1993; Meddahi A. et al., 1993; Marsolais, D. et al., 2003; Zen K., Parkos C., 2003]. Макрофаги появляются в раневом отделяемом животных 2-ой и 3-ей серий, получавших аппликации «Ронколейкина» на рану, уже через 6 часов после операции, что свидетельствует о более активном, чем в контроле, осуществлении миграции клеточных элементов из кровеносного русла.

Через 12 часов после нанесения дефекта в мазках-отпечатках у животных контрольной серии (0,9% раствор хлорида натрия для инъекций) преобладающей клеточной популяцией являются нейтрофилы с большим количеством непереваренных частиц в цитоплазме. В этот срок наблюдения в цитограммах животных, получавших аппликации «Ронколейкина» на рану, нейтрофильные лейкоциты также являются количественно доминирующими.

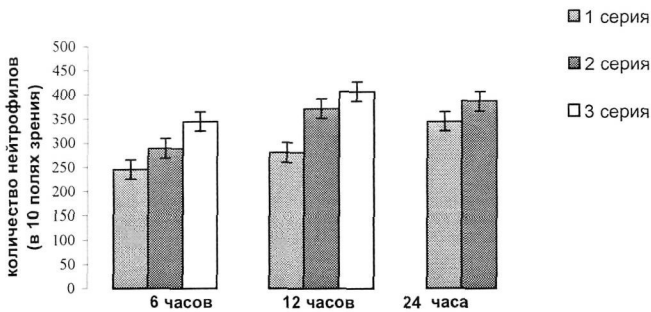


Рис.2. Изменение количества нейтрофилов в экссудате крыс, получавших препараты в виде аппликации на рану (см. рис. 1, 1-я группа опытов)

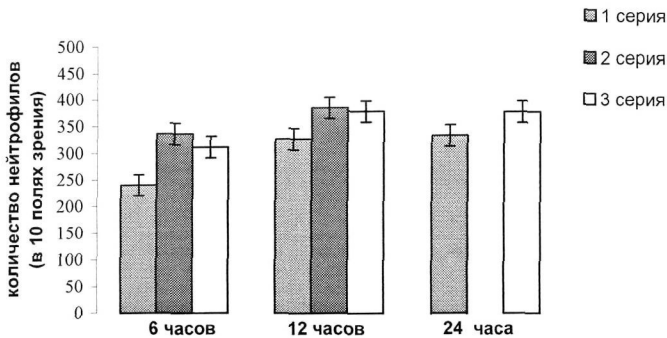


Рис.3. Изменение количества нейтрофилов в экссудате крыс, получавших подкожные инъекции препаратов (см. рис. 1, 2-я группа опытов).

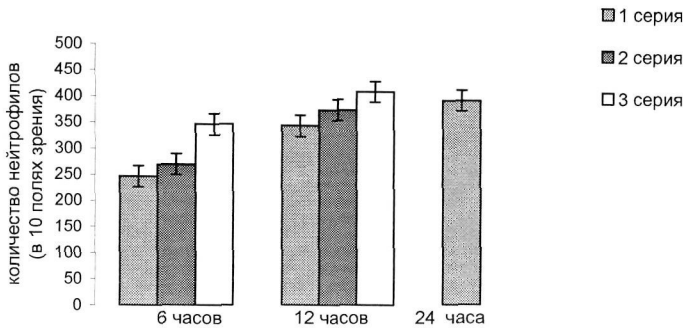


Рис.4. Изменение количества нейтрофилов в экссудате крыс, получавших препараты сочетанным способом (см. рис. 1, 3-я группа опытов).

Однако подавляющее большинство их находится в состоянии физиологической редуции. Ядра некоторых нейтрофилов распадаются на отдельные сегменты и принимают вид глыбок; в других – сегменты ядра сливаются в гомогенное образование, а цитоплазма не окрашивается. О повышении фагоцитарной активности макрофагов свидетельствуют их значительное количество в мазках-отпечатках, крупные размеры ядер макрофагов, множество пищеварительных вакуолей в цитоплазме и отсутствие непереваренных частиц в ней. Существенная роль макрофагов в репаративных процессах обусловлена синтезом и выделением биологически активных веществ, способствующих ускорению пролиферации клеток фибробластического ряда, и, как следствие, сокращению сроков заживления [Хилова Ю. К., 1992; Martin P., Leibovich S., 2003; Langermans J., et al., 2004].

Исследование цитограмм через сутки после операции выявило недостоверное увеличение числа нейтрофильных гранулоцитов ( $372,2 \pm 13,4$ ) в экссудате животных 2-ой серии, получавших аппликации на рану с активностью «Ронколейкина» 50000 МЕ/кг, по сравнению с предыдущим сроком этой группы ( $387,0 \pm 21,0$  через 12 часов после операции), что свидетельствует об ускоренном завершении фазы экссудации.

Аналогичная тенденция в эффектах стимуляции воспалительного процесса наблюдается в мазках-отпечатках животных и при других способах применения веществ. Необходимо отметить, что аппликации «Ронколейкина» с активностью препарата, уменьшенной в 2 раза (25000 МЕ/мл) более активно стимулируют протекание фазы экссудации. Подкожное введение препарата в объеме 1 мл (20000 МЕ/кг), наоборот, характеризуется менее выраженным стимулирующим эффектом, чем введение 0,5 мл (20000 МЕ/кг) «Ронколейкина». Сочетанный способ применения «Ронколейкина» наиболее эффективно влияет на течение экссудации, поэтому через 24 часа после нанесения дефектов кожи получить

мазки-отпечатки у крыс 2-ой и 3-ей серий не представлялось возможным из-за образовавшегося на поверхности раны тонкого струпа.

Помимо установленного нами эффекта ускорения миграции клеток из кровеносного русла после применения «Ронколейкина», все экзогенно введенные цитокины, в том числе изучаемый нами препарат, инициируют фагоцитоз, ведут к очищению раневой поверхности от гнойно-некротических масс, чем способствуют ускорению завершения первой фазы заживления ран. Кроме того, они запускают локальный цитокиновый каскад с участием клеток раны, стимулируя синтез коллагена, пролиферацию фибробластов, эндотелиальных клеток [Николаева З. К., 2002; Горшеев А. Н. и соавт., 2007; Castagnoli C. et al., 1996; Kawai T., Akira S., 2006].

Таким образом, применение растворов «Ронколейкина» в различных концентрациях, объемах и способах введения в организм показало, что действие препарата направлено на клетки, участвующие в осуществлении фазы экссудации и выражается в стимуляции миграции и дифференцировки клеточных элементов в отделяемом раны.

## **2. Оценка влияния «Ронколейкина» на репаративный процесс по морфологическим особенностям заживающей раны**

Сопоставление результатов экспериментов по изучению применения препаратов различными способами (аппликация на рану, инъекция или их сочетание) выявило, что в течение постраневого процесса происходят сходные гистологические изменения. Наиболее выраженные сдвиги в регенерирующих тканях наблюдались при получении крысами «Ронколейкина» комбинированным способом: 1мл (50000 МЕ) в виде аппликации на рану и 0,5 мл «Ронколейкина» (20000 МЕ/кг в 0,5 мл раствора) подкожно и 1 мл (25000 МЕ) в виде аппликации на рану и 1 мл «Ронколейкина» (20000 МЕ/кг в 1 мл раствора) подкожно. Состояние крыс, получавших иммуномодулятор, после нанесения травмы быстро улучшалось и к 5-му дню наблюдения оценивалось как удовлетворительное. Животные блестящий и опрятный шерстный покров, отмечались нормальные поведенческие реакции.

Иммунная терапия «Ронколейкином» приводила к стереотипным структурным изменениям в области повреждения независимо от объема и способа введения препарата. Через 5 дней от момента операции у крыс 2-ой и 3-ей серий, получавших иммуномодулятор в виде аппликаций в сочетании с инъекцией, раны были покрыты струпом достоверно более тонким, чем в контроле ( $441,6 \pm 27,4$  и  $381,1 \pm 29,1$  мкм соответственно против  $502,7 \pm 36,2$  мкм у животных 1-ой серии). Лейкоцитарный вал представлен, в основном, некротизированными клетками и незначительным количеством нейтрофилов нормальной структуры. Он не одинаков на всем протяжении: по краям лейкоцитарный вал узкий, а в центре сохраняет значительную высоту и становится рыхлым. Грануляционная ткань выполняет практически всю раневую область, ее толщина составляет  $858,2 \pm 44,3$  мкм и

930,6±44,1 мкм соответственно во 2 и 3 сериях 3 группы опытов против 617,8±33,2 мкм в контроле.

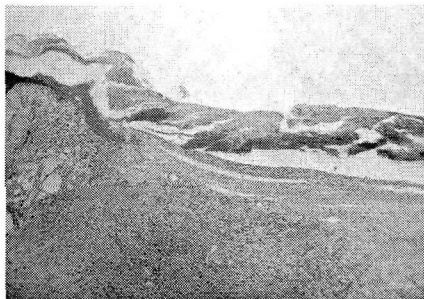


Рис. 5. Общий вид раны. Фибробласты и капилляры грануляционной ткани. 3 группа. 2 серия (1мл [50000 МЕ] аппликация на рану и 0,5 мл [20000 МЕ/кг] п/к «Ронколейкина»). 5 дней. Гематоксилин-эозин. 75х.

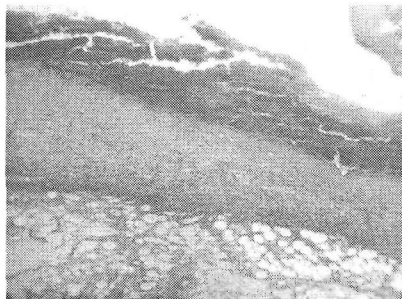


Рис. 6. Центр раны с мощным струпом, лейкоцитарным валом и жировой клетчаткой. 3 группа. 1 серия (контроль). 5 дней. Гематоксилин-эозин. 75х.

Таблица 1

**Величина (в мкм) различных структур заживающей раны через 5 дней после операции в 3 группе опытов (аппликация веществ на рану и подкожное ведение)**

Серии	Величина структур заживающей раны в мкм (M±m)			
	Струп	Лейкоцитарный вал	Грануляционная ткань	Протяженность эпителия
<b>1 серия</b> 1 мл аппликация на рану и 0,5 и 1 мл п/к 0,9% раствора NaCl для инъекций (контроль) 10 крыс	502,7 36,2	198,2 8,4	617,8 33,2	547,6 49,0
<b>2 серия</b> 1мл (50000 МЕ) аппликация на рану и 0,5 мл (20000 МЕ/кг) п/к «Ронколейкина» 12 крыс	411,6* 27,4	140,9* 10,6	858,2* 44,3	887,4* 48,4
<b>3 серия</b> 1 мл (25000 МЕ) аппликация на рану и 1 мл (20000 МЕ/кг) п/к «Ронколейкина» 12 крыс	381,1* 29,1	132,2* 7,6	930,6* 44,1	987,7* 26,3
* Различия по отношению к данным 1 серии достоверны при $p \leq 0,001$				

Микроструктура грануляций характеризуется значительным количеством фибробластов и капилляров, которые обнаруживаются по всей площади дефекта (рис. 5). Фибробласты имеют многоотростчатую форму и ориентированы горизонтально по отношению ко дну раны.

В составе межклеточного вещества содержится значительное количество коллагеновых волокон, агрегированных в пучки. Сосудистая реакция на препараты выражается в более мощной васкуляризации грануляционной ткани и кровенаполненности капилляров. Максимальное количество сосудов наблюдается в верхних слоях новообразованной ткани, они имеют однослойную эпителиальную стенку, вертикальную ориентацию.

Общее состояние раны характеризуется отсутствием отека и лейкоцитарной инфильтрации. Более активное, чем в контроле развитие грануляционной ткани (табл. 1) у животных 2 и 3 серий обеспечивает рост эпителиального клина. Регенерирующий эпителий покрывает рану на значительном протяжении ( $887,4 \pm 48,4$  мкм и  $987,7 \pm 26,3$  мкм против  $547,6 \pm 49,0$  мкм в контрольной 1-ой серии).

У контрольных животных в этот же срок (5 день после нанесения травмы) при макроскопическом обследовании отмечается ярко выраженная гиперемия и отечность краев раневой поверхности. Струп, сформированный некротическими массами, с подлежащими тканями спаян неплотно и имеет значительную величину (табл. 1). Практически вся область дефекта представлена жировой тканью (рис. 6.).

На 10 сутки послеоперационного наблюдения в 3-ей группе экспериментов, у животных находившихся под воздействием иммуномодулятора «Ронколейкин» сочетанным способом (2-я и 3-я серии), края ран были ровные, розового цвета, гиперемия и отек вокруг дефекта не обнаруживались. К этому сроку происходит развитие грануляционной ткани, содержащей большое количество фибробластов разной степени зрелости. Пласт грануляций заполняет всю область бывшей раны, толщина ее значительна и составляет  $1077,1 \pm 34,6$  и  $1118,7 \pm 39,7$  мкм соответственно 2-ой и 3-ей сериям животных (табл. 2).

У крыс 2 и 3 серий, получавших «Ронколейкин» в этот период наблюдения, отмечается выраженная эпителизация раневого дефекта. Пласт регенерирующего эпителия состоит из нескольких слоев клеток, протяженность его увеличена незначительно по сравнению с предыдущим сроком ( $994,2 \pm 43,1$  и  $972,1 \pm 51,0$  мкм), что, видимо, связано с уменьшением площади самой раны в результате контракции (рис. 7).

В 3-ей группе экспериментов у крыс, получавших препарат «Ронколейкин» сочетанным способом (2-я и 3-я серии), на 15-й день наблюдения область бывшей раны представлена рубцом типичной структуры. В центре рубца базальная мембрана новообразованного эпителия отличается выростами, в которых формируются фолликулы и сальные железы. Такая организация эпителия приближается к типичному строению эпидермиса кожи (рис. 8).

Таблица 2

Величина (в мкм) различных структур заживающей раны через 10 дней после операции в 3 группе опытов (апликация веществ на рану и подкожное ведение)

Серии	Величина структур заживающей раны в мкм (M±m)			
	Струп	Лейко-цитарный вал	Грануля-ционная ткань	Протяжен-ность эпителия
<b>1 серия</b> 1 мл апликация на рану и 0,5 и 1 мл п/к 0,9% раствора NaCl для инъекций (контроль) 10 крыс	213,5 15,9	82,2 6,2	750,6 27,2	768,3 53,1
<b>2 серия</b> 1мл (50000 МЕ) апликация на рану и 0,5 мл (20000 МЕ/кг) п/к «Ронколейкина» 12 крыс	190,0 16,2	53,1* 6,2	1077,1* 34,6	994,2* 43,1
<b>3 серия</b> 1 мл (25000 МЕ) апликация на рану и 1 мл (20000 МЕ/кг) п/к «Ронколейкина» 12 крыс	173,7* 14,9	49,2* 5,2	1118,7* 39,7	972,1* 49,2

\* Различия по отношению к данным 1 серии достоверны при  $p \leq 0,001$

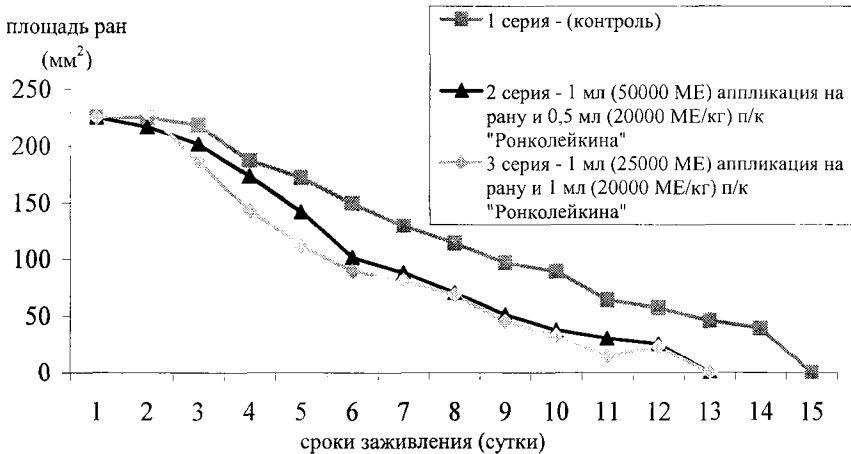


Рис. 7. Площадь ран на последовательных этапах заживления ран при сочетанном применении препаратов (см. рис. 1, 3-я группа опытов)



Рис. 8. Восстановленные дериваты кожи в области бывшей раны. 3 группа. 3 серия (1 мл [50000 МЕ] аппликация на рану и 0,5 мл [20000 МЕ/кг] п/к «Ронколейкина»). 15 дней. Гематоксилин-эозин. 75х.

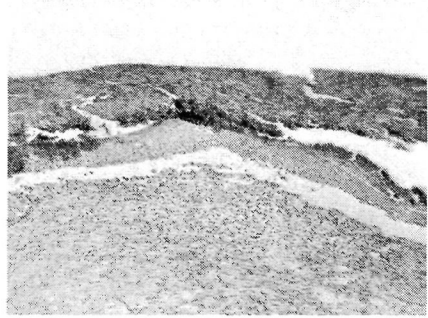


Рис. 9. Многослойный эпителиальный регенерат в области раневого дефекта. 3 группа. 1 серия (контроль). 15 дней. Гематоксилин-эозин. 75х.

Через 15 дней после нанесения травмы у крыс контрольной серии в этой же группе экспериментов наблюдается полное заживление (рис. 7). У отдельных животных сохраняются фрагменты струпа в центре раневой области (рис. 9). Бывшая рана заполнена хорошо сформированной молодой соединительной тканью, с характерной горизонтальной ориентацией фибробластов, между которыми наблюдаются тонкие коллагеновые волокна.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что местное применение различных объемов и концентраций растворов «Ронколейкина» оказывают выраженное регулирующее действие на раневой процесс в коже. Этот иммуномодулятор приводит к неспецифическим морфологическим сдвигам в области повреждения, которые являются, вероятно, результатом воздействия этого препарата на скорость созревания новообразованной грануляционной ткани. Формирование грануляций возможно только после завершения фазы экссудации и очищения раны. «Ронколейкин», как нами установлено, усиливает макрофагальную реакцию. Макрофаги непрерывно высвобождают факторы роста и таким образом стимулируют комплексный процесс фиброплазии и ангиогенеза [Singer A.J., Clark R.A.F., 1999], что оказывает влияние на организацию фибробластов. Наши данные согласуются с Smith P.G., Liu M. (2002), которые доказали, что миграцией фибробластов в очаг регенерации управляют такие цитокины, как тромбоцитарный фактор роста PDGF, основной фактор роста фибробластов  $\beta$ -FGF. Препарат «Ронколейкин» создает благоприятные условия для последовательного протекания всех этапов посттравматической регенерации, что проявляется сокращением общих сроков заживления на  $2,5 \pm 0,5$  дня.

### 3. Реакция фибробластов грануляционной ткани на введение «Ронколейкина»

Применение «Ронколейкина» различными способами (апликация на рану, подкожная инъекция или введение сочетанием этих способов) имеет однонаправленное действие на заживление ран и приводит к сходным ультрамикроскопическим изменениям в процессе репарации. У крыс, получавших 1 мл (50000 МЕ) и 1 мл (25000 МЕ) растворов иммуномодулятора «Ронколейкина» в виде аппликаций на рану; 0,5 мл (20000 МЕ) и 1 мл (20000МЕ) – в виде инъекций или их сочетания, популяция фибробластов грануляционной ткани представлена в основном активными коллагенсинтезирующими формами, фиброциты встречаются крайне редко. Зрелые фибробласты характеризуются мощным развитием белоксинтезирующего аппарата и эндоплазматической сети, занимающей почти весь объем цитоплазмы. Резко увеличивается по сравнению с контролем количество фиксированных на мембранах рибосом. Хорошо развитый пластинчатый комплекс представлен расширенными цистернами, множеством пузырьков и крупных вакуолей. Важным признаком активации фибробластов является образование в их цитоплазме большого количества секреторных гранул, увеличение размеров и количества митохондрий. Их кристы четко контурированы и правильно ориентированы, матрикс имеет высокую электронную плотность. Митохондрии локализируются преимущественно в околоядерной зоне цитоплазмы. Гипертрофия ядра и ядрышек, гиперплазия гранулярной эндоплазматической сети, увеличение числа рибосом, расширение зоны пластинчатого комплекса позволяют утверждать, что фибробласты после иммунной терапии в виде подкожного введения 0,5 мл и 1 мл растворов препарата «Ронколейкин» (20000 МЕ/кг) приобретают способность к более интенсивному синтезу проколлагена, обеспечивая тем самым быстрое созревание соединительной ткани. Об ускоренном коллагено- и фибриллогенезе свидетельствует образование пучков коллагеновых волокон в экстрацеллюлярном пространстве фибробластов. Возле цитолеммы обнаруживаются вначале неструктурированные волоконца, а затем и коллагеновые волокна, имеющие характерную поперечную исчерченность.

У животных, не получавших растворов иммуномодулятора «Ронколейкин» (контроль), популяция фибробластов была представлена в основном малодифференцированными формами, для которых специфическим признаком является незначительное развитие органелл, обеспечивающих синтез и эвакуацию в межклеточное пространство коллагена.

По результатам исследования установлено, что «Ронколейкин» влияет на онтогенез фибробластов, увеличивая скорость их дифференцировки и появления в грануляционной ткани зрелых форм, активно синтезирующих коллаген.



### Заключение

Известно, что препарат «Ронколейкин», способен восполнять дефицит IL-2 и воспроизводить его эффекты как одного из ключевых компонентов цитокиновой сети [Козлов В.К. в соавт., 2001; Козлов В.К., 2002]. Данные о стимулирующем эффекте препарата на ранозаживление, основанные на полученных результатах собственных исследований и изучении мировой литературы, позволяют предположить следующий механизм воздействия этого иммуностропного средства на процессы репарации и регенерации. Действие «Ронколейкина» реализуется с помощью не индивидуального пептида, а набора регуляторных цитокинов. При этом цитокины действуют последовательно и индуцируют выработку друг друга, а также адаптируют поверхностные мембранные рецепторы клеток к другим медиаторам. Через интегрированные рецепторы клетки получают сигналы к активации, миграции, делению и дифференцировке. В итоге одним из основных эффектов действия «Ронколейкина» является ускорение дифференцировки и увеличение функциональной активности клеток системы фагоцитоза, повышения в них синтеза цитокинов. Показано, что экзогенные цитокины, применяемые в виде растворов «Ронколейкина» запускают каскад заживления раны, т. к. они привлекают в область повреждения и там активируют популяцию фибробластов. Все выявленные свойства лекарственного средства способствуют активной смене этапов репаративной регенерации с сохранением их последовательности, а в результате ускорению регенераторных реакций в экспериментах. Эти эффекты проявляются в различной степени в зависимости от концентрации и объема вводимого раствора препарата интерлейкина-2, а также от способов его применения (апликацией на рану, инъекционно, сочетано).

Таким образом, у иммуномодулятора «Ронколейкин» выявлены следующие эффекты: противовоспалительный, противоотечный, стимулирующий пролиферацию клеток и коллагенообразование, проявляющиеся в активации репаративных процессов дефектов кожи.

### ВЫВОДЫ

1. Установлено, что «Ронколейкин» ускоряет миграцию и дифференцировку клеточных популяций в зоне регенерации, что приводит к сокращению времени течения первой фазы раневого процесса – экссудации.
2. Показано, что «Ронколейкин» интенсифицирует течение пролиферативной фазы заживления.
3. Установлено, что «Ронколейкин» стимулирует онтогенез фибробластов грануляционной ткани.
4. Показана односторонность эффекта иммуномодулятора «Ронколейкин», как стимулятора репаративных процессов, примененного в различных объемах и концентрациях растворов при различных способах назначения (апликация на рану, подкожно, сочетано), проявляющаяся в сокращении сроков заживления ран на  $2,5 \pm 0,5$  дня.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные нами результаты выявили репаративные свойства иммуномодулятора «Ронколейкин», изученного в различных концентрациях и объемах используемого вещества, а также при разных способах его введения. Данные экспериментов позволяют обосновать наиболее целесообразное, эффективное и наименее травматичное использование «Ронколейкина» как репаранта в виде аппликаций на область повреждения кожи.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Базанов, Г. А., Куцоля, М. А. Современные подходы к стимуляции репаративных процессов [Текст] / Г. А. Базанов, М. А. Куцоля // Тезисы докладов Пятой медицинской ассамблеи союза городов Заполярья и Крайнего Севера. – М., 2004. – С. 178-188.
2. Куцоля, М. А. Влияние ронколейкина на заживление экспериментальных полнослойных ран кожи [Текст] / М. А. Куцоля // Тезисы докладов XIII Российского национального конгресса “Человек и лекарство”. Москва, 2006. – С.635.
3. Куцоля, М. А. Цитологическая характеристика фазы воспаления экспериментальных ран кожи в условиях применения ронколейкина [Текст] / М. А. Куцоля // «Вестник Российского государственного медицинского университета». Тезисы докладов I Международной (X Всероссийской) Пироговской студенческой научной медицинской конференции. Москва, 2006.- №2 (49).- С.361.
4. Куцоля, М. А. Цитологические изменения раневого отделяемого при регенерации в условиях применения ронколейкина [Текст] / М. А. Куцоля // Материалы первого съезда клинических фармакологов Сибирского Федерального округа. Барнаул, 2006. - С. 361.
5. Куцоля, М. А. Фаза воспаления: цитологические параметры экспериментальных ран кожи в условиях применения «Ронколейкина» [Текст] / М. А. Куцоля // «Морфология», 2006. Т. 130. - №5.- С.57.
6. Куцоля, М. А. Изменение ультраструктурной организации фибробластов грануляционной ткани при воздействии иммунокорректором «Ронколейкин» [Текст] / М. А. Куцоля // Верхневолжский медицинский журнал. Спец. выпуск. Тверь, 2006. - С. 42-44.
7. Куцоля, М. А., Петрова, М. Б. Влияние «Ронколейкина» на ультраструктурную организацию фибробластов грануляционной ткани [Текст] / М. А. Куцоля, М. Б. Петрова // Тезисы международной конференции «Структурные преобразования органов и тканей на этапах онтогенеза в норме и при воздействии антропогенных

- факторов. Экология и здоровье человека». Астрахань, 2007. – №2. - С. 108-109.
8. Куцоля, М. А. Микроскопические изменения грануляционной ткани кожных дефектов крыс при воздействии препаратом «Ронколейкин» / М. А. Куцоля, М. Б. Петрова, Е. А. Харитоновна, Н. В. Павлова, В. Г. Шестакова, Л. А. Курбатова // «Тверская педиатрия: союз науки и практики»: сборник научных трудов ГОУ ВПО Тверская ГМА Росздзрва, посвященный 50-летию кафедры детских болезней Тверской государственной медицинской академии. – Тверь, 2007. – С.65-67
9. Куцоля, М. А. Характеристика клеточного состава грануляционной ткани при применении иммунокорректора «Ронколейкин» [Текст] / М. А. Куцоля // «Морфология», 2008. – Т. 133. - №2.- С.75.
10. Куцоля, М. А. Особенности формирования грануляционной ткани под влиянием препарата «Ронколейкин» [Текст] / М. А. Куцоля // Тезисы докладов XV Российского национального конгресса “Человек и лекарство”. Москва, 2008. – С.654.

Подписано в печать 14 января 2009 г.  
Объем 1,0 п.л. Тираж 50 экз. Зак. №58.

Отпечатано в

ООО «Издательство «Грида» ИД №06059 от 16.10.01 г.  
170034, г. Тверь, пр. Чайковского, 9