

Т.О. ПАВЛЮТЬ ¹, Т.Б. МЕЛИК-КАСУМОВ ¹, И.П. ЖАВОРОНОК ¹,
О.А. АНТИПОВА ¹, Е.И. ПЕХТЕРЕВА ¹, С.А. НОВАКОВСКАЯ ¹,
А.И. ВАСИЛЬКЕВИЧ ², М.А. КИСЕЛЬ ², А.Ю. МОЛЧАНОВА ¹

ВЛИЯНИЕ N-ПАЛЬМИТОИЛЭТАНОЛАМИНА И N-СТЕАРОИЛЭТАНОЛАМИНА В ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЕ НА ЗАЖИВЛЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ РАН КОЖИ

ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» ¹,
ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» ²,
г. Минск,
Республика Беларусь

Цель. Изучить ранозаживляющие свойства N-пальмитоилэтанолamina и N-стеароилэтанолamina в липосомальной форме, сравнить их действие с лекарственным средством с доказанной эффективностью.

Материал и методы. Ранозаживляющее влияние N-пальмитоилэтанолamina и N-стеароилэтанолamina изучено на 214 белых рандомбредных крысах-самцах с тремя типами кожных ран: линейные, лоскутные и ожоговые. Для исследования каждого типа ран животные были разделены на группы: контрольная (раны не обрабатывались), отрицательный контроль (или растворитель), положительный контроль (мазь Метилурацил), пальмитоилэтанолamin и стеароилэтанолamin. Ежедневно проводили мониторинг общего состояния животных, фотосъемку ран. После этого поверхность ран обрабатывали исследуемыми веществами. Обработку ран продолжали до полного заживления с фиксированием суток заживления. Выводы делали на основании результатов визуального наблюдения, компьютерной планиметрии, данных морфологического исследования.

Результаты. В случае применения обоих N-ацилэтанолaminов сокращение сроков заживления линейных ран не зафиксировано, длительность периода заживления составила 8-10 суток. Лоскутные раны в контрольных группах заживали в течение 21-25 суток. В случае применения N-стеароилэтанолamina этот показатель составил 22-25 суток ($p > 0,05$). Напротив, ежедневная аппликация пальмитоилэтанолamina на поверхность лоскутных ран приводила к их заживлению на 18-19 суток ($p < 0,05$). Термические ожоги IIIA степени в контрольных группах заживали в течение 30-32 суток. Применение обоих N-ацилэтанолaminов приводило к уменьшению этого срока до 27-28 суток, в случае N-стеароилэтанолamina эти изменения были достоверными ($p < 0,05$).

Заключение. N-пальмитоилэтанолamin и N-стеароилэтанолamin в липосомальной форме оказывают стимулирующее воздействие на регенерацию раневых дефектов кожи. Пальмитоилэтанолamin сокращает сроки заживления лоскутных кожных ран, N-стеароилэтанолamin ускоряет заживление ожоговых ран. N-ацилэтанолaminы в липосомальной форме являются перспективными для использования в качестве ранозаживляющих средств. Дальнейшие исследования в этом направлении могут стать научной основой создания новых фармацевтических средств.

Ключевые слова: ацилэтанолamin, липосомы, кожные раны, регенерация, эпидермис, дерма, ранозаживляющие свойства, создание новых фармацевтических средств

Objectives. To study wound-healing properties of N-palmitoylethanolamine and N-stearoylethanolamine in liposomes and to compare their action with the drug has also proven to be an effective and safe.

Methods. The wound-healing effects of N-palmitoylethanolamine and N-stearoylethanolamine were studied on white male rats ($n=214$) with three types of skin wounds: incision, excision and burn wounds. To study each type of wounds the animals were divided into groups: control (untreated wounds), negative control (or solvent), positive control (Methyluracil ointment), N-palmitoylethanolamine and N-stearoylethanolamine. The general state of animals was monitored daily; all wounds were photographed and then treated with tested substances. In wound model treatment was continued till the complete healing with registration of the date of healing. Conclusion was made according to visual observation, computer planimetry and morphological studies data.

Results. The application of both of N-acylethanolamines has not reduced the healing time of incision wounds which lasted during 8-10 days. Excision wound completely healed (in control group) within 21-25 days and 22-25 days in treating with N-stearoylethanolamine. In contrast, daily application of palmitoylethanolamine on the surface of excision wound has shorten the healing up to 18-19 days ($p < 0,05$). Thermal burns of IIIA degree healed in control rats within 30-32 days. Use of both of N-acylethanolamines reduced this period up to 27-28 days, as for N-stearoylethanolamine the changes were statistically reliable ($p < 0,05$).

Conclusion. N-palmitoylethanolamine and N-stearoylethanolamine in liposomes stimulate the regeneration of experimental skin wounds. Palmitoylethanolamine accelerates excision skin wounds healing whereas

N-stearoylethanolamine healing of burns. N-acylethanolamines seems to be promising as a base for wound-healing agents. Further research in this direction could be a scientific background for new drugs development.

Keywords: acylethanolamine, liposome, skin wounds, regeneration, epidermis, derma, wound-healing properties, new drugs development

Novosti Khirurgii. 2016 Sep-Oct; Vol 24 (5): 425-435

The Effect of N-palmitoylethanolamine and N-stearoylethanolamine in Liposomes on the Healing of Experimental Skin Wounds

T.O. Pavlut, T.B. Melik-Kasumov, I.P. Zhavoronok, O.A. Antipova, E.I. Pehtereva, S.A. Novakovskaya, A.I. Vasilkevich, M.A. Kisel, A.Y. Molchanova

Введение

Сформировавшаяся на ранних этапах эволюции эндоканнабиноидная система является универсальной сигнальной структурой, играющей важную роль в поддержании гомеостаза организма и в регуляции множества физиологических функций и процессов. Эта система представляет собой совокупность каннабиноидных рецепторов, их лигандов, а также ферментов, катализирующих синтез и распад этих лигандов [1]. Кожа как самый обширный орган человеческого организма является важным плацдармом для эндоканнабиноидной системы. В коже имеется определенный пул эндоканнабиноидов, которые обуславливают наступление специфических эффектов, реализуемых как в норме, так и при патологии [2, 3, 4]. Поиск путей влияния на звенья эндоканнабиноидной системы – одно из направлений фундаментальных исследований в мировой фармакологии. Сегодня имеются определенные клинико-экспериментальные разработки по применению лекарственных средств на основе фито- и синтетических каннабиноидов в таких сферах, как купирование боли, нейропротекция, профилактика рвоты, лечение поражений кожи различного генеза, церебральной ишемии, ревматических заболеваний и заболеваний пищеварительного тракта, глаукомы, болезни Паркинсона, рассеянного склероза [1, 2, 3]. Однако пока применение таких препаратов ограничено из-за потенциальных психотропных побочных эффектов.

В этой связи особый интерес представляют эндогенные N-ацилэтаноламины, которые не оказывают психотических эффектов и в то же время, сохраняют терапевтический потенциал, схожий с эндоканнабиноидами [2, 5]. N-пальмитоилэтаноламин (ПЭА) был идентифицирован более 50 лет назад. ПЭА присутствует как эндогенный компонент в мозге, а также в печени и скелетной мускулатуре [5] в значительном количестве. Это универсальный тканеспецифический биорегулятор, который обладает противовоспалительными, обезболивающими, антиоксидантными и рядом других свойств [1, 2, 5]. В коже, селезенке, печени и других органах также обнаружен гомолог ПЭА

N-стеароилэтаноламин (СЭА). Оба они относятся к соединениям с каннабимиметическими свойствами и вовлечены в контроль ряда физиологических функций [1, 2, 3, 4, 5]. Однако по сравнению с ПЭА физиологическая роль СЭА раскрыта недостаточно полно. В ряде исследований было показано, что СЭА проявляет выраженные противовоспалительные свойства, влияет на активность системы антиоксидантной защиты и др. [6, 7].

Согласно данным литературы, этаноламиды жирных кислот, такие как ПЭА и СЭА, могут модулировать регенерационные процессы в коже человека и животных [2, 4, 6, 7]. Наиболее изучены эффекты ПЭА в коже на уровне зернистого слоя эпидермиса [2, 4]. При различного рода повреждениях (механическое, термическое, ультрафиолетовое, радиационное, химическое, микробное и др.) он образуется из компонентов липидного бислоя клеточных мембран и накапливается в воспаленных тканях [2, 5]. Участие СЭА в поддержании тканевого гомеостаза отражено лишь в немногочисленных исследованиях [6, 7].

ПЭА и СЭА являются гидрофобными соединениями, что создает дополнительные трудности при использовании экспериментальных субстанций и лекарственных средств на их основе. Подходящие растворители (диметилсульфоксид, этиловый спирт и др.) могут оказывать нежелательные или даже пагубные побочные эффекты. Поэтому важным остается вопрос о способах эффективной доставки СЭА и ПЭА в клетки регенерируемой ткани. Одним из наиболее оптимальных способов доставки лекарственных субстанций является использование таких носителей, как липосомы. Они представляют собой везикулы, состоящие из одного или нескольких фосфолипидных бислоев. В водное пространство липосом могут быть включены водорастворимые вещества, а в липидный бислой – гидрофобные. Липосомы, в зависимости от их размера, содержания воды, осмотических свойств и иных характеристик, используются для транспортировки как гидрофильных, так и гидрофобных лекарственных веществ [8, 9].

Таким образом, **целью** настоящего исследования явилось изучение ранозаживля-

ющих свойств N-пальмитоилэтаноламина и N-стеароилэтаноламина в липосомальной форме, сравнение их действия с лекарственным средством с доказанной эффективностью.

Материал и методы

Тестируемые соединения ПЭА и СЭА получали ацилированием этаноламина смешанными ангидридами пальмитиновой и стеариновой кислот с этилугольной кислотой. Полученные этаноламиды очищали перекристаллизацией из смеси растворителей гексан-этилацетат. Структуру этаноламидов подтверждали с помощью ИК- и ЯМР-спектроскопии. Чистоту ПЭА и СЭА контролировали хроматографически и сопоставлением температур плавления с литературными данными. Для получения ПЭА и СЭА в липосомальной форме к 67,5 мг (0,09 ммоль) раствора фосфатидилхолина (ФХ) из яичных желтков (99%, «Lipoid», Германия) в хлороформе добавляли стеароилэтаноламид или пальмитоилэтаноламид (0,025 ммоль в смеси хлороформа и метанола (1:1)). Полученный раствор выпаривали на роторном испарителе до образования тонкой пленки на дне колбы и выдерживали под вакуумом до постоянного веса. Затем добавляли 10 мл фосфатного буфера (рН 7,4), интенсивно встряхивали в течение 30 минут до образования однородной дисперсии, которую далее обрабатывали ультразвуком для превращения в моноламеллярные липосомы.

Исследования ранозаживляющих свойств ПЭА и СЭА в липосомальной форме выполнялись на 214 белых рандомбредных крысах-самцах с массой тела 220-250 г. В соответствии с нормами содержания (Санитарные правила норм 2.1.2.12-18 – 2006. Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев). Постановление Главного государственного санитарного врача Респ. Беларусь № 131 от 31 октября) все животные находились на одинаковом (стандартном) рационе при свободном доступе к воде и пище. Крысы содержались в контролируемых условиях окружающей среды. Световой режим в условиях вивария обеспечивался автоматической сменой освещения «день/ночь» каждые 12 часов. Температура воздуха составляла 19-25°C, относительная влажность – 50-70%. Температуру и влажность воздуха регистрировали ежедневно. Эксперименты проводили с соблюдением правовых и этических норм обращения с животными (Технический кодекс установленной практики. ТКП 125-2008 (02040) Надлежащая лабораторная практика; European Convention for the Protection of Verte-

brate Animals Used for Experimentation and other Scientific Purposes, N 123 of 18 March 1986) в соответствии с национальными и международными стандартами качества планирования и проведения исследований на животных.

Ранозаживляющие свойства ПЭА и СЭА изучали на моделях кожных ран: линейных, лоскутных и ожоговых. Раны у животных моделировали в стерильных условиях и под общим наркозом (тиопентал натрия, 20 мг/кг, внутривенно). Дополнительно для местной анестезии внутримышечно в область лопатки вводили лидокаин (ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов», 200 мкл на крысу). На слезистую глаз наносили «Офтагель» («Сантэн», Финляндия) для предотвращения пересыхания глазного яблока и излишнего образования порфирина. После исчезновения реакций на болевой и сильный звуковой стимулы у экспериментальных животных выбривали участок кожи на шейно-воротниковой зоне и ниже, на верхней части спины.

Для моделирования линейных ран посередине выбритого участка кожи, предварительно смазанного раствором йода 5% (ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов»), делали разрез кожи (до фасции) длиной 25 мм одно-разовым скальпелем. Затем посередине разреза накладывали один шов (нить «Сургикрил», ООО «Футберг», Минск; монофилламент гомополимер полидиоксапон рассасывающийся), сближающий края раны и обеспечивающий регенерацию раны от краев к центру [10, 11].

Моделирование лоскутной раны проводили путем вырезания лоскута кожи (с удалением подкожной клетчатки) посередине выбритого участка кожи, предварительно смазанного раствором йода 5%. Для обозначения места и формы раны использовали специальный трафарет (пластинка овальной формы площадью ≈ 2 см²). Анатомическим пинцетом оттягивали кожную складку и ножницами срезали выделенный по трафарету лоскут кожи [10, 11].

Термический ожог кожи спины у крыс вызывали контактным способом с помощью пробирки с плоским дном площадью 2,5 см², нагретой на водяной бане до 100°C, время экспозиции – 22 с [10, 11].

После описанных манипуляций крыс помещали в индивидуальные клетки, где они находились под постоянным мониторингом до выхода из наркоза. Наблюдение за экспериментальными животными начинали на следующие сутки после нанесения ран и продолжали до полного их заживления. Ранозаживляющее действие оценивали по общему состоянию и характеру клинического течения раневого про-

цесса. Ежедневно осматривали крыс с оценкой внешнего вида, активности и подвижности животного, массы тела. Обследование раневой поверхности проводили как визуально, так и пальпаторно. Оценивали время образования и полного отторжения струпа, его состояние и цвет, фиксацию к подлежащим тканям, наличие или отсутствие вторичного инфицирования, динамику и время полного срастания краев раны. Степень уменьшения размеров ран (длины — для линейных ран, площади и периметра — для лоскутных и ожоговых) определяли по фотографиям с использованием компьютерной программы Image J (США).

Для подтверждения ПЭА степени ожога на предварительном этапе исследования отдельной группе животных делали биопсию кожи с последующим патоморфологическим обследованием в Центре световой и электронной микроскопии. Также для оценки степени восстановления раневой поверхности проводили морфологические исследования биоптатов, изъятых их центра лоскутных и ожоговых ран после их заживления. Образцы кожи после глубокого замораживания (для исключения артефактов) помещали на криостатные блоки. Тонкие срезы кожи толщиной 8 мкм готовили на микротоме-криостате Microm HM 525 («Thermo Scientific», Германия), окрашивали гематоксилином-эозином с использованием общепринятых в морфологических исследованиях методов [12]. Изучение микропрепаратов и изготовление микрофотографий проводили с помощью светового микроскопа MPV-2 («Leitz», Германия), оснащенного цифровой фотокамерой Leica DC300F («Leitz», Швейцария). Оцифрованные изображения записывали на компьютер с помощью программы Leica IM 1000 («Leitz», Швейцария).

На следующие сутки после операции и до полного заживления на поврежденный участок ежедневно наносили ПЭА либо СЭА в липосомальной форме. Массовая концентрация ФХ в эмульсии составляла 6,75 мг/мл, ПЭА — 750 мкг/мл, а СЭА — 820 мкг/мл. Различия в массовой концентрации ПЭА и СЭА были допущены с целью получения их одинаковой молярной концентрации — 2,5 ммоль/л. Исследуемые вещества наносили на рану из расчета 100 мкл/см². Индивидуальный объем эмульсии для каждого животного рассчитывали исходя из размеров раны (длины — для линейных, площади — для лоскутных и ожоговых) и пересчитывали каждый день. Нанесение исследуемых веществ на поврежденный участок проводили частями для лучшего впитывания субстанции. После обработки ран животных в течение нескольких минут (до 5) держали в руках, чтобы

предотвратить слизывание тестируемых веществ с раневой поверхности.

Влияние ПЭА и СЭА на заживление ран сравнивали с лекарственным средством с доказанной эффективностью, в качестве которого использовали мазь для наружного применения «Метилурацил» с содержанием действующего вещества 100 мг/г, производства ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов». В состав мази входили: действующее вещество (метилурацил — 1,5 г); вспомогательные вещества (парафин мягкий белый, ланолин безводный, вода очищенная). Мазь наносили согласно инструкции по применению ежедневно до полного заживления.

Таким образом, для исследования динамики течения раневого процесса на каждый тип ран формировали следующие экспериментальные группы: одной опытной группе крыс раны обрабатывали эмульсией липосом, состоявших из ФХ с включением ПЭА, другой — эмульсией липосом, состоявших из ФХ с включением СЭА. Полученные результаты сравнивали с данными 3 контрольных групп: 1) контроль — группа животных, не получавших каких-либо воздействий на поврежденный участок; 2) негативный контроль, растворитель или ФХ — группа животных, получавших до полного заживления ежедневную аппликацию на рану эмульсии липосом, состоявших из ФХ; 3) позитивный контроль, или Метилурацил — группа животных, которым до полного заживления ежедневно наносили на рану мазь Метилурацил, относящуюся к средствам, способствующим рубцеванию.

Анализ данных выполняли с использованием программы Microsoft Excel с определением среднего арифметического значения и его стандартной ошибки $M \pm m$. Проверку на нормальность распределения количественных показателей осуществляли с помощью программы Origin 7.0 по критерию Шапиро-Уилка. Результаты теста свидетельствовали о нормальном распределении данных для всех исследуемых параметров ($p > 0,05$; таблица 1). Значимость наблюдаемых отличий в группах оценивали с помощью непарного двухвыборочного теста Стьюдента: вывод о статистической значимости (достоверности) отличий делали при $p < 0,05$.

Результаты

Динамический контроль за экспериментальными животными, а именно ежедневный мониторинг общего состояния и течения раневого процесса, позволял оценить ход восстановления поврежденной ткани и влияние исследуемых веществ на сроки заживления ран.

Оценка р-значения по тесту Шапиро-Уилка для проверки гипотезы о нормальном распределении анализируемых данных

Тип ран	Длина / площадь ран	Сутки заживления
Линейные раны	p=0,529	p=0,361
Лоскутные раны	p=0,327	p=0,481
Термические ожоговые раны	p=0,952	p=0,081

Общее состояние и поведение животных в целом носили удовлетворительный характер. Шерстный покров у всех животных был яркий, блестящий, гладкий, незагрязненный, кожа эластичная, подвижная, бледная, без видимых жировых отложений. Видимые слизистые оболочки (конъюнктивы, слизистые оболочки носовой и ротовой полостей, анального отверстия) были бледные, чистые, без изъязвлений и посторонних наложений. Патологические выделения из естественных отверстий тела отсутствовали. Динамика изменения массы тела подопытных крыс на протяжении всего исследования была положительной. Крысы с линейными и лоскутными ранами в течение всего исследования были активны, подвижны, реагировали на раздражители; охотно поедали корм и потребляли воду. В то же время на протяжении 1-3 суток после нанесения ожога животные, чьи раны не подвергались какому-либо воздействию (контроль), были малоподвижны, сидели в углу клетки, не принимали пищу. Начиная с 4 суток наблюдения у них отмечалось увеличение двигательной активности и восстановление аппетита. В остальных группах с ожогами изменения в поведении и состоянии, описанные для контроля, наблюдались только в течение 1 суток.

Линейные раны. Ранозаживление происходило от краев раны к центру смешанным натяжением – как первичным, так и вторичным. В 1-3 сутки после нанесения линейной раны у всех групп животных отмечались гиперемия, болезненность, локальное повышение температуры (фаза воспаления). На 4-7-е сутки отечность спадала, при пальпации рана была безболезненная, образовавшийся струп отходил по краям (фаза регенерации). На 8-11-е сутки струп отпадал и образовывался рубец (фаза рубцевания). Раневые поверхности не прилегали друг к другу, возникала грануляционная ткань, которая в ходе заживления превращалась в рубцовую ткань (вторичное натяжение).

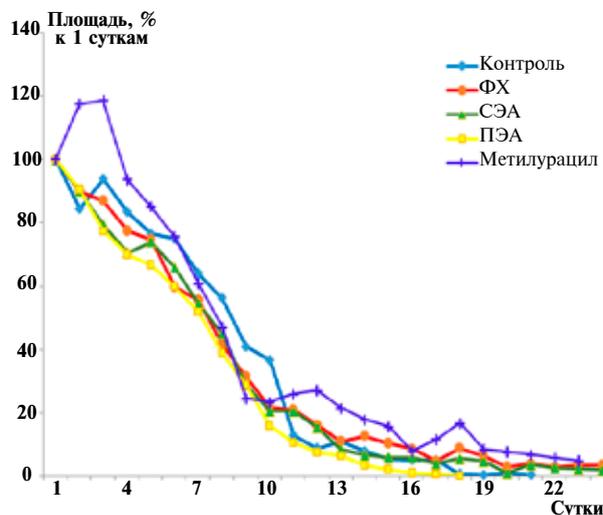
Динамика заживления ран во всех экспериментальных группах в целом носила схожий характер. Ко 2-м суткам размеры ран (длина) у всех животных сокращались в среднем на 17,8% от исходных размеров, к 4 суткам этот показатель снижался на 35,2%, а к концу регенеративной фазы (7 сутки) – на 76,6%. При этом

средняя продолжительность регенерации тканей в контрольной группе составляла $7,9 \pm 0,3$ суток. Сокращение сроков заживления линейных ран не отмечалось как при аппликации ПЭА, СЭА или ФХ, так и при применении Метилурацила.

Лоскутные раны. В 1-2 сутки после операции отмечались незначительная отечность краев ран и слабовыраженная болезненность при надавливании, признаки вторичного инфицирования в целом отсутствовали в течение всего периода наблюдения, раневая поверхность была сухой и не отличалась по температуре от прилегающей здоровой кожи. Кожа вокруг ран была без существенных повреждений (покраснения, следы царапин, трещины в целом отсутствовали). Заживление ран происходило под струпом, на первых этапах тонким, розовато-красного цвета, образованным раневым отделяемым и легко травмируемым. Спустя несколько дней струп становился плотнее, имел красно-коричневую окраску и неровную, шероховатую поверхность. В среднем на 7-10 сутки происходило отторжение первичного струпа, при этом площадь и периметр ран значительно сокращались. Раны затягивались от краев к центру за счет заполнения дефекта грануляционной тканью с последующей частичной эпителизацией и рубцеванием.

Динамика заживления ран была нелинейной (рис. 1). Уменьшение размера ран за

Рис. 1. Динамика заживления лоскутных ран в эксперименте



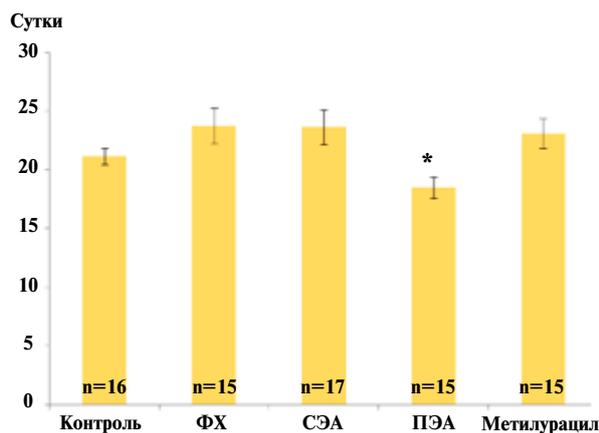


Рис. 2. Средняя продолжительность заживления лоскутных ран у крыс в эксперименте.

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольными группами.

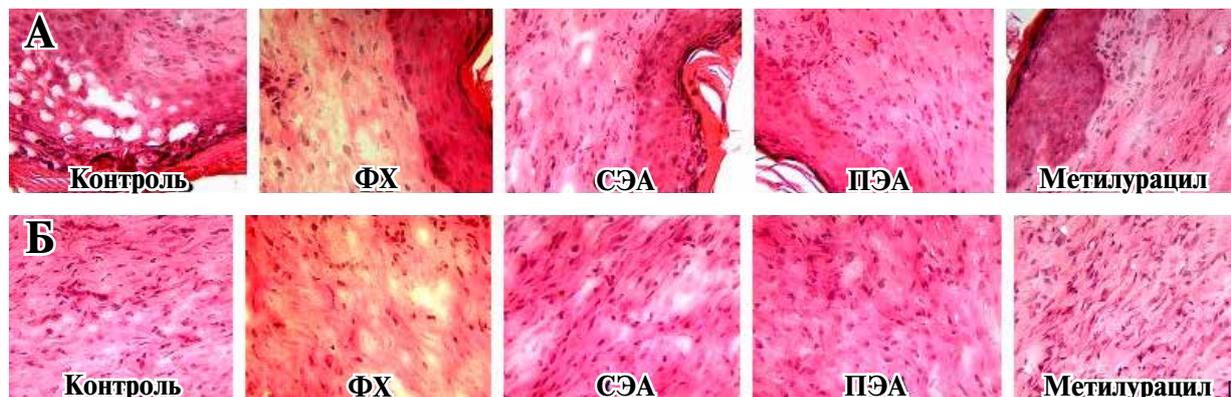
сутки в первые 6 дней составляло в среднем 5-8% для всех экспериментальных групп. Затем скорость репарации возрастала до 8-10% (7-12 сутки). Начиная с 13 суток процесс заживления замедлялся до 0,6-1,5% от площади за сутки. Так в течение первых 8-12 суток у животных контрольной группы происходила достаточно быстрая регенерация поврежденной ткани, площадь ран в среднем уменьшалась вдвое от изначальных размеров, далее процессы замедлялись, окончательное заживление (формирование рубца) происходило спустя еще 8-15 суток. Течение раневого процесса у животных, чьи раны ежедневно обрабатывали ФХ, СЭА либо Метилурацилом, протекало схожим образом. В то же время средняя относительная площадь ран после применения ФХ и СЭА была меньше, а после применения Метилурацила – больше, чем соответствующий показатель в контроле на 10-15%. В целом статистически значимыми эти различия не были как по сравнению с контролем, так и между собой ($p > 0,05$). Начиная с 3-х суток после начала применения ПЭА размеры ран значительно сокращались: в первые 7 суток применения относительная площадь раны

уменьшалась в среднем на 50% от изначальных размеров, что на 10-15% меньше по сравнению с контролем ($p = 0,034$), но существенно не отличалось от группы ФХ ($p = 0,426$).

Средняя продолжительность заживления лоскутной раны площадью ≈ 2 см² в контрольной группе составляла $21,1 \pm 0,7$ суток (рис. 2). В группе ФХ восстановление поврежденной ткани приходилось на $23,7 \pm 1,5$ суток, что существенно не отличалось от контроля ($p = 0,134$) (рис. 2). Достоверных отличий в продолжительности репаративного процесса, который длился в среднем $23,6 \pm 1,5$ суток после применения СЭА, как по сравнению с контролем ($p = 0,151$), так и по сравнению с ФХ ($p = 0,960$) не отмечалось (рис. 2). Ежедневные аппликации ПЭА на раневую поверхность способствовали полному восстановлению в среднем на $18,5 \pm 0,9$ суток, что достоверно меньше периода заживления раны как по сравнению с контролем (на ~ 3 дня; $p = 0,025$), так и по сравнению с группой ФХ (на ≈ 5 дней; $p = 0,006$) (рис. 2). После обработки ран экспериментальных животных мазью Метилурацил продолжительность заживления раневого дефекта составляла в среднем $23,1 \pm 1,2$ суток, что значимо не отличалось от контроля ($p = 0,484$) (рис. 2).

При проведении микроскопического исследования образцов кожи в области раны в контрольной группе (раны без обработки) отмечались утолщение регенерирующего эпидермиса за счет повышенной митотической активности кератиноцитов, а также его погружной рост в нижележащую регенерирующую ткань. Наблюдалась умеренная отечность шиповатого слоя эпидермиса, а также мелкие очаги некроза кератиноцитов в зернистом слое (рис. 3 А). Дерма была представлена соединительнотканым рубцом. Фибробласты и тучные клетки, выявленные в значительном количестве в толще дермы, проявляли высокую пролиферативную активность. Отмечался активный ангиогенез, ускоряющий процесс регенерации

Рис. 3. Регенерация эпидермиса (А) и дермы (Б) в центре лоскутной раны. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. $\times 250$.



лоскутной раны (рис. 3 Б). В группе ФХ процесс регенерации ткани протекал без формирования грубого соединительнотканного рубца. Эпидермис регенерирующей поверхности кожи полностью сформировался и четко разделился на слои, в которых выявлялись кератиноциты полигональной формы (рис. 3 А). Волокнистый каркас дермы был представлен более нежными рыхлыми соединительнотканными волокнами за счет снижения пролиферативной активности фибробластов. Отмечалось интенсивное формирование микроциркуляторного русла дермы (рис. 3 Б). Исследование эпидермиса и дермы после применения СЭА и ПЭА указывало на однонаправленный характер регенерации поврежденных слоев кожи. Структурная организация восстановленного эпидермиса практически не отличалась от таковой у контроля (рис. 3 А). Восстановление дермы протекало за счет разрастания грануляционной ткани и постепенного замещения ее коллагеновыми волокнами, пролиферативная активность фибробластов падала, а волокнистый каркас дермы приобретал более нежное строение (рис. 3 Б). После применения Метилурацила эпидермис был полностью сформирован, отмечалось умеренное утолщение его шиповатого слоя за счет пролиферации кератиноцитов (рис. 3 А). Волокнистый каркас дермы характеризовался усиленным разрастанием коллагеновых волокон за счет увеличения количества функционально активных фибробластов, а также интенсивным ангиогенезом (рис. 3 Б).

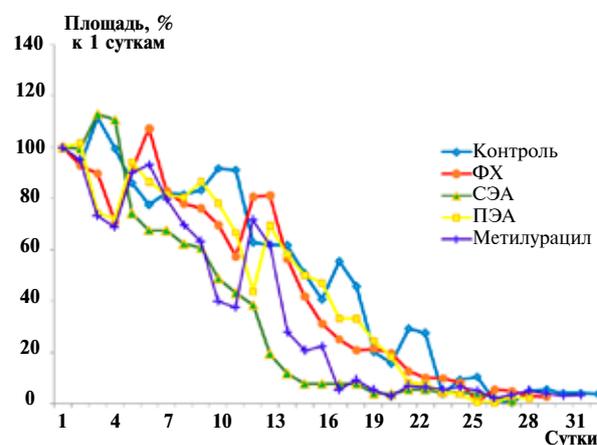
Термические ожоговые раны. У всех экспериментальных животных в первые часы после воздействия горячей стеклянной плоскодонной пробирки кожа в месте контакта приобретала выраженный белый цвет. На следующий день у животных происходило утолщение и уплотнение поверхности ожогов, площадь которых составляла в среднем $\approx 4,5-5$ см². В контроле отмечалось появление единичных очагов некроза и кровоизлияний на поверхности ран. Цвет обожженных участков во всех случаях менялся от белесовато-желтого до красно-коричневого. Формирование плотного первичного струпа происходило в среднем на 3-7 сутки после прижигания, а его отторжение — на 14-18 сутки от начала наблюдения. После применения мази Метилурацил струп у экспериментальных животных находился в более влажном состоянии. В контрольной группе болезненность (избегание при надавливании на рану, а иногда и вокализация) наблюдалась в течение первых 2-3 суток после образования ожога. В то же время в остальных экспериментальных группах умеренная болезненность сохранялась на протяжении 4-7 суток. После отторжения струпа

открывалась раневая мокнущая поверхность. У отдельных животных из групп контроля (только ожог) и ФХ наблюдались признаки вторичного инфицирования (нагноение) раны. У животных, ожоги которых обрабатывали СЭА, ПЭА и мазью Метилурацил, воспалительных изменений в ране не наблюдалось. В мокнущем виде рана сохранялась в среднем в течение последующих 4-6 суток, а далее наблюдали уменьшение размеров дефекта.

Динамика заживления ожогов, как и в экспериментах с лоскутными ранами, была нелинейна (рис. 4). Уменьшение размера ран за первую неделю эксперимента составляло 17-20% в среднем для 3-х контрольных групп. Площадь ран после применения ПЭА сокращалась на 18% от изначальных размеров, в то же время нанесение СЭА способствовало снижению размеров ожога на 32,5%. За вторую неделю размер ран в группах контроль (только ожог), ФХ и ПЭА уменьшался на $\approx 40\%$. После применения Метилурацила сокращение раневого дефекта составляло 70% от изначальных размеров. Обработка ожогов СЭА способствовала уменьшению площади раневой поверхности на 88%. К 21 суткам процессы восстановления замедлялись во всех экспериментальных группах, размеры ран в целом сокращались на 80-90%, формирование рубца происходило спустя еще 7-10 суток.

Окончательное заживление ожоговых ран в контрольной группе происходило в среднем на $31,7 \pm 2,3$ суток мониторинга (рис. 5). Обработка ожогов ФХ способствовала полному восстановлению поврежденных тканей в среднем на $28,6 \pm 1,1$ суток, что существенно не отличалось от контроля ($p=0,162$) (рис. 5). Средняя продолжительность регенерации тканей после применения мази Метилурацил составляла $31,3 \pm 0,7$ суток ($p=0,326$) (рис. 5). Ежедневные аппликации ПЭА на обожженный

Рис. 4. Динамика заживления ожоговых ран в эксперименте



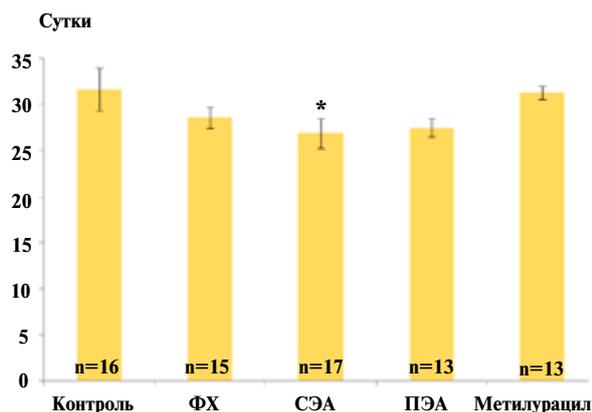


Рис. 5. Средняя продолжительность заживления ожоговых ран у крыс в эксперименте.

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольными группами.

участок кожи способствовали полному восстановлению раневого дефекта в среднем на $27,5 \pm 1,0$ суток, что недостоверно меньше, чем в контрольной группе ($p = 0,081$) и после нанесения ФХ ($p = 0,546$) и Метилурацила ($p = 0,508$) (рис. 5). Применение СЭА сокращало сроки заживления ожоговых ран по сравнению с данными контрольных групп, окончательное восстановление поврежденной ткани происходило в среднем на $26,9 \pm 1,6$ суток ($p = 0,022$) (рис. 5).

При исследовании микропрепаратов кожи выявлено, что регенерация эпидермального слоя у контрольной группы крыс с необработанной ожоговой поверхностью сопровождалась развитием дистрофических изменений, спонгиоза, при котором отмечался межклеточный отек, повреждение кератиноцитов и их замещение микровезикулами (рис. 6 А). Регенерирующая дерма в этой группе также претерпевала дистрофические изменения, соединительнотканые волокна были истончены и разрежены вследствие развития интерстициального отека (рис. 6 Б). Аппликации ФХ, СЭА либо ПЭА на раневую поверхность сопровождалась формированием

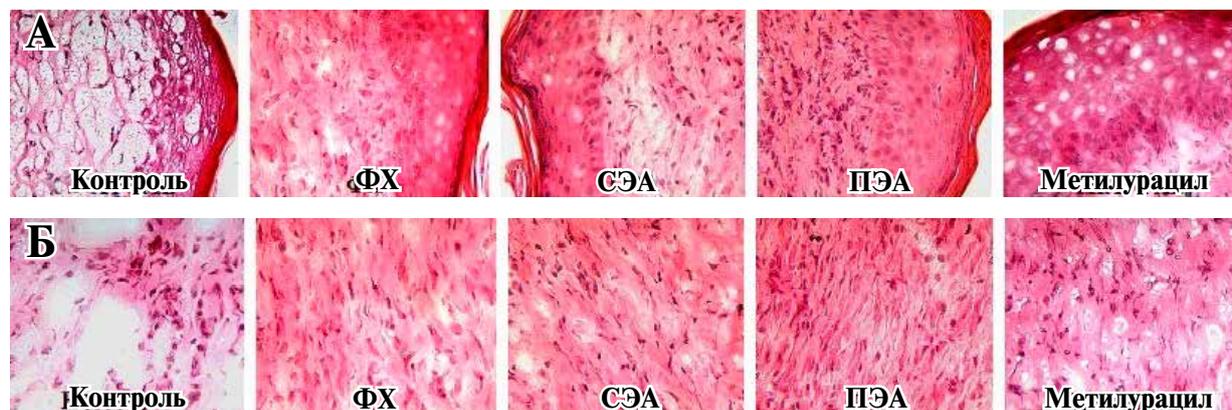
эпидермиса, по строению сходного с контролем (необработанные раны) (рис. 6 А). Регенерация дермы более интенсивно протекала у экспериментальной группы крыс с применением СЭА и ПЭА, в соединительнотканном слое выявлялись в большом количестве активированные фибробласты и тучные клетки. Регенерирующий слой дермы также отличался большей плотностью коллагеновых волокон и интенсивным ангиогенезом (рис. 6 Б). Обработка ожога мазью Метилурацил характеризовалась утолщением шиповатого слоя эпидермиса за счет усиленной пролиферации кератиноцитов базального слоя с образованием выростов в сторону регенерирующей дермы (рис. 6 А). В верхних слоях шиповатого слоя преобладали дистрофические изменения, сопровождающиеся разрушением и вакуолизацией кератиноцитов. Регенерация дермы сопровождалась активацией фибробластов с формированием соединительнотканного каркаса (рис. 6 Б).

Обсуждение

Несмотря на большое число имеющихся терапевтических методов, проблема заживления и лечения ран не теряет актуальности и в настоящее время. На сегодняшний день к новым препаратам и средствам для лечения ран, повреждений, ожоговой болезни предъявляются более высокие требования. Для ускорения заживления ран применяются разные по структуре и происхождению лекарственные средства. Они должны обладать антибактериальными, некролитическими свойствами, оказывать стимулирующее действие на репаративные процессы в ране, усиливать защитные силы организма [13, 14].

Известно что, некоторые субстанции, обладающие высокой обезболивающей, противовоспалительной и антиэкссудативной активностью

Рис. 6. Регенерация эпидермиса (А) и дермы (Б) в центре ожоговой раны. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.×250



ускоряют течение раневого процесса [4, 13, 14]. Полученные нами данные о ходе заживления кожных ран после аппликаций СЭА и ПЭА в липосомальной форме позволяют сделать предположение об активизации ими репаративной регенерации кожи, что подтверждается данными морфологических исследований. ПЭА и СЭА оказывают стимулирующее влияние на пролиферацию и клеточную дифференцировку эпидермиса, а также на регенерацию дермы, снижают степень ее фиброза и способствуют формированию регенерата с более нежной структурой. Процесс заживления кожных ран после их применения протекает более интенсивно и не сопровождается образованием грубых келоидных рубцов. Установлено, что ПЭА сокращает сроки заживления лоскутных и ожоговых ран, в случае лоскутных ран эти изменения носили достоверный характер. СЭА же в эквивалентной концентрации достоверно ускоряет заживление ожоговых ран. Последнее согласуется с данными, полученными ранее другими исследователями, о влиянии СЭА на выделение провоспалительных цитокинов, активность ряда ферментов, содержание свободных аминокислот в плазме крови и интенсивность перекисного окисления при ожогах [6, 7]. Отмечено также, что как ПЭА, так и СЭА ускоряют течение раневого процесса эффективнее препарата сравнения Метилурацила.

Выводы

1. N-ацилэтаноламины (ПЭА и СЭА) в липосомальной форме оказывают стимулирующее воздействие на регенерацию раневых дефектов кожи.

2. ПЭА достоверно сокращает сроки заживления лоскутных кожных ран, СЭА в эквивалентной концентрации достоверно ускоряет заживление ожоговых ран.

3. ПЭА и СЭА в липосомальной форме являются перспективными для использования в качестве ранозаживляющих средств. Дальнейшие исследования в этом направлении указанных N-ацилэтаноламинов могут стать научной основой создания новых фармацевтических средств.

Конфликт интересов отсутствует.

Исследование было выполнено сотрудниками ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» и ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» в рамках научно-исследовательской работы по теме «Разработка путей химического синтеза и исследование биологического действия производных жирных кислот, обладающих

каннабимиметическими свойствами» (ГПНИ «Медицина и фармация», № госрегистрации 20130372, 2013-2015 гг.). Финансовой поддержки со стороны компаний-производителей лекарственных препаратов авторы не получали.

ЛИТЕРАТУРА

1. Молчанова АЮ. Эндоканнабиноидная система: физиология, патофизиология, терапевтический потенциал. Минск, РБ: Бел навука; 2015. 211 с.
2. Калюжная ЛД, Горбенко АВ. Агонисты каннабиноидных рецепторов в дерматологии – новая технология коррекции зуда и воспаления в коже. *Укр. Журн Дерматології Венерології Косметології*. 2011;4(43):17-27.
3. Тромза ВЕ, Никифорова ИН. Фармакологические свойства каннабиноидов. *Изв Нац Акад Наук Беларуси. Сер мед наук*. 2010;(1):112-19.
4. Biró T, Tóth BI, Haskó G, Paus R, Pacher Pál. The endocannabinoid system of the skin in health and disease: novel perspectives and therapeutic opportunities. *Trends Pharmacol Sci*. 2009 Aug;30(8):411-20. doi: 10.1016/j.tips.2009.05.004.
5. Lambert DM, Vandevoorde S, Jonsson KO, Fowler CJ. The palmitoylethanolamide family: a new class of anti-inflammatory agents? *Curr Med Chem*. 2002 Mar;9(6):663-74. doi: 10.2174/0929867023370707.
6. Бердышев АГ, Гулая НМ, Чумак АА, Киндрок НЛ. Влияние N-стеароилэтаноламина на содержание свободных аминокислот в крови и печени крыс при экспериментальном ожоге. *Биомед Химия*. 2011;57(4):446-54. doi: 10.18097/pbmc20115704446.
7. Жуков ОД, Бердышев АГ, Косякова ГВ, Климашевский ВМ, Горидько ТМ, Мегедь ОФ, и др. Вплив N-стеароїлетаноламіна на рівень 11-оксикортикостероїдів, цитокінів IL-1β, IL-6 и TNFα в шурів за неспецифічного запалення, при термічному опіку шкіри. *Ukr Biochem J* [Электронный ресурс]. 2014 [дата доступа: 26.02.2016];86(3):88-97. Режим доступа: <http://nbuv.gov.ua/UJRN/BioChem> 2014 86 3 12.
8. Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013 Jan;65(1):36-48. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.037.
9. Pattni BS, Chupin VV, Torchilin VP. New developments in liposomal drug delivery. *Chem Rev*. 2015;115(19):10938-966. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00046.
10. Фролова НЮ, Мельникова ТИ, Бурякина АВ, Вишневецкая ЕК, Авенирова ЕЛ, Сивак КВ, и др. Методические подходы к экспериментальному изучению дерматотропных средств. *Эксперим и Клини Фармакология*. 2009;72(5):56-60.
11. Kumar V, Khan AA, Nagarajan K. Animal models evaluation of wound healing activity. *Int Bul Drug Res*. 2013;3(5):93-107.
12. Елисеев ВГ, Субботин МЯ, Афанасьев ЮА, Котовский ЕФ. Основы гистологии и гистологической техники. 2 изд. Москва, РФ: Медицина; 1967. 268 с.
13. Нестерова ЮВ, Поветьева ТН, Нагорняк ЮГ, Перова АВ, Андреева ТИ, Рослякова ЕП, и др. Механизмы влияния комплексных и выделенных веществ из живокости высокой на репаративную активность тканей в эксперименте. *Эксперим и Клини Фармакология*. 2009;72(3):40-43.
14. Плечева ДВ, Алехин ЕК. Стимуляция репаративной регенерации кожи крыс оксиметилурацилом. *Эксперим и Клини Фармакология*. 2004;67(5):63-66.

REFERENCES

1. Molchanova Alu. Endokannabinoidnaia sistema: fiziologiya, patofiziologiya, terapevticheskii potentsial [Endocannabinoid system: physiology, pathophysiology, therapeutic potential]. Minsk, RB: Bel Navuka; 2015. 211 p.
2. Kaliuzhnaia LD, Gorbenko AV. Agonisty kannabinoidnykh retseptorov v dermatologii – novaia tekhnologiya korrektsii zuda i vospaleniia v kozhe [Agonists of cannabinoid receptor in dermatology – new technology of correction of skin itchy and inflammation]. Ukr Zhurn Dermatologii Venerologii Kosmetologii. 2011;4(43):17-27.
3. Tromza VE, Nikiforova IN. Farmakologicheskie svoystva kannabinoidov. Izv Nats Akad Nauk Belarusi [The pharmacological properties of cannabinoids]. Ser Med Nauk. 2010;(1):112-19.
4. Biró T, Tóth BI, Haskó G, Paus R, Pacher Pál. The endocannabinoid system of the skin in health and disease: novel perspectives and therapeutic opportunities. *Trends Pharmacol Sci*. 2009 Aug;30(8):411-20. doi: 10.1016/j.tips.2009.05.004.
5. Lambert DM, Vandevorde S, Jonsson KO, Fowler CJ. The palmitoylethanolamide family: a new class of anti-inflammatory agents? *Curr Med Chem*. 2002 Mar;9(6):663-74. doi: 10.2174/0929867023370707.
6. Berdyshev AG, Gulaia NM, Chumak AA, Kindruk NL. Vliianie N-stearoiletanolamina na sodержanie svobodnykh aminokislot v krovi i pecheni krysa pri eksperimental'nom ozhoghe [Effect of N-stearoylethanolamine on the concentration of free amino acids in the blood and liver of rats with experimental burns]. *Biomed Khimii*. 2011;57(4):446-54. doi: 10.18097/pbmc20115704446.
7. Zhukov OD, Berdishev AG, Kosiakova GV, Klimashevskii VM, Gorid'ko TM, Meged' OF, i dr. Vpliv N-stearoiletanolamina na riven' 11-oksikortikosteroidiv, tsitokiniv IL-1 β , IL-6 i TNF α v shchuriv za nespetsifichnogo zapaleniia, pri termchnomu opiku shkiri. [Effect of N-stearoylethanolamine on the level of 11 glucocorticoids, cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF α in rats with non-specific inflammation in thermal skin burns]. *Ukr Biochem J [Elektronnyi resurs]*. 2014 [data dostupa: 26.02.2016];86(3):88-97. Rezhim dostupa: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Bio-Chem_2014_86_3_12.
8. Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013 Jan;65(1):36-48. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.037.
9. Pattni BS, Chupin VV, Torchilin VP. New developments in liposomal drug delivery. *Chem Rev*. 2015;115(19):10938-966. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00046.
10. Frolova NI, Mel'nikova TI, Buriakina AV, Vishnevskaiia EK, Avenirova EL, Sivak KV, i dr. Metodicheskie podkhody kekspierimental'nomu izucheniiu dermatotropnykh sredstv [Methodological approaches to the experimental study of dermatotropic drugs]. *Eksperim i Klin Farmakologiya*. 2009;72(5):56-60.
11. Kumar V, Khan AA, Nagarajan K. Animal models evaluation of wound healing activity. *Int Bul Drug Res*. 2013;3(5):93-107.
12. Eliseev VG, Subbotin MIA, Afanas'ev IuA, Kotovskii EF. Osnovy gistologii i gistologicheskoi tekhniki [Fundamentals of histology and histological techniques]. 2 izd. Moscow, RF: Meditsina; 1967. 268 p.
13. Nesterova IuV, Povet'eva TN, Nagorniak IuG, Perova AV, Andreeva TI, Rosliakova EP, i dr. Mekhanizmy vliianiia kompleksnykh i vydelennykh veshchestv iz zhivokosti vysokoi na reparativnuiu aktivnost' tkanei v eksperimente [Mechanisms of influence of complex and isolated compounds from larkspur high on reparative tissue activity in the experiment] *Eksperim i Klin Farmakologiya*. 2009;72(3):40-43.
14. Plecheva DV, Alekhin EK. Stimuliatsiia reparativnoi regeneratsii kozhi krysa oksimetiluratsilom [Stimulation of reparative regeneration of the skin of rats by oxymetiluratsilom]. *Eksperim i Klin Farmakologiya*. 2004;67(5):63-66.

Адрес для корреспонденции

220072, Республика Беларусь,
г. Минск, ул. Академическая, д. 28,
ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси»,
лаборатория модуляции функций организма,
тел.: +375 29 568-33-82,
e-mail: tanja281286@mail.ru,
Павлють Татьяна Олеговна

Сведения об авторах

Павлють Т.О., научный сотрудник лаборатории модуляции функций организма ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси».

Мелик-Касумов Т.Б., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории модуляции функций организма ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси».

Жаворонок И.П., научный сотрудник лаборатории модуляции функций организма ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси».

Антипова О.А., младший научный сотрудник лаборатории модуляции функций организма ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси».

Пехтерева Е.И., младший научный сотрудник лаборатории модуляции функций организма ГНУ «Ин-

Address for correspondence

220072, Republic of Belarus,
Minsk, Akademicheskaiia st., 28,
Institute of Physiology, NAS Belarus,
laboratory of modulation of body functions
Phone: +375 29 568-33-82
E-mail: tanja281286@mail.ru
Pavlut Tatjana Olegovna

Information about the authors

Pavlut T.O. Researcher, laboratory of modulation of the body functions. «Institute of Physiology», NAS of Belarus».

Melik-Kasumov T.B. PhD (Physiology), Senior Researcher, laboratory of modulation of the body functions, «Institute of Physiology», NAS of Belarus».

Zhavoronok I.P. PhD (Physiology), Researcher, laboratory of modulation of the body functions, «Institute of Physiology», NAS of Belarus.

Antipova O.A. Junior researcher, laboratory of modulation of the body functions», Institute of Physiology», NAS of Belarus.

Pehtereva E.I. Junior researcher, laboratory of modulation of the body functions» Institute of

ститут физиологии НАН Беларуси».

Новаковская С.А., к.б.н., заведующий лабораторией «Центр световой и электронной микроскопии» ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси».

Василькевич А.И. научный сотрудник лаборатории химии липидов ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси».

Кисель М.А., д.х.н., профессор, заведующий лабораторией химии липидов ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси».

Молчанова А.Ю., к.б.н., заведующий лабораторией модуляции функций организма ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси».

Physiology», NAS of Belarus.

Novakovskaya S.A. PhD (Morphology), Head of laboratory «Center of light and electronic microscopy», «Institute of Physiology», NAS of Belarus.

Vasilkevich A.I. Researcher, laboratory of lipids chemistry, «Institute of Bioorganic Chemistry», NAS of Belarus.

Kisel M.A. Dr.Sci. (Chemistry), professor, Head of laboratory of lipids chemistry, «Institute of Bioorganic Chemistry», NAS of Belarus

Molchanova A.Yu. PhD (Physiology), Head of laboratory of modulation of the body functions, «Institute of Physiology», NAS of Belarus».

Поступила 19.04.2016 г.

Received 19.04.2016