

ВЛИЯНИЕ ЛИПОСОМНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСОВ ТАКСИФОЛИНА С МЕТАЛЛАМИ ПЕРЕМЕННОЙ ВАЛЕНТНОСТИ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ КОЖИ ПРИ ХИМИЧЕСКОМ ОЖОГЕ

© В. С. Шубина^{1, 2}, * Ю. В. Шаталин^{1, 2}

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино,
и ² Пушинский государственный университет, УЦ биофизики и биомедицины;
* электронный адрес: shubinavictoria@rambler.ru

Проведено исследование действия липосомных препаратов с включением комплексов таксифолина (ТФ) с ионами металлов переменной валентности. Установлено, что использование препаратов на основе свободного флавоноида и его комплексов с ионами железа (II/III) и меди (II) при химическом ожоге приводит к интенсификации регенерационных процессов и репарации волосяных фолликулов и сальных желез. Прослеживается тенденция к более эффективному заживлению ран в случае использования липосомных комплексов ТФ—Cu(II) и ТФ—Fe(III) по сравнению с контрольными животными. Предложен механизм действия данных препаратов, основанный на процессах окислительной полимеризации и конъюгации флавоноида, в результате которых наблюдается утилизация токсичных метаболитов и продуктов перекисного окисления липидов. Таким образом, препараты на основе комплексов флавоноид—металл могут быть использованы для ускорения регенерации кожной ткани при различных повреждениях.

Ключевые слова: липосомы, комплексы таксифолина с металлами переменной валентности, химический ожог, регенерация кожи.

Принятые сокращения: ПОЛ — перекисное окисление липидов, ТФ — таксифолин, ВФ — волосяной фолликул, СЖ — сальная железа.

Ожоговая травма является одной из наиболее сложных в современной медицине, в связи с чем ведется постоянный поиск наиболее эффективных средств лечения ожогов. Ранее уже было показано, что липосомы, нагруженные таксифолином (ТФ), усиливают процесс регенерации кожи как при химических, так и при термических ожогах (Наумов и др., 2009, 2010). Также были отмечены признаки репарации волосяных фолликулов и сальных желез. Существует несколько гипотез, объясняющих эффективность действия данного липосомного препарата. Во-первых, ограничение зоны вторичного некроза раны может быть связано с антиоксидантными свойствами ТФ, ингибирующего свободнорадикальные процессы, протекающие в области повреждения (Наумов и др., 2010). Во-вторых, данный препарат может оказывать антибактериальное действие на поверхности раны (Наумов и др., 2010), которое может быть связано с формированием комплексов ТФ с металлами переменной валентности, способных в определенных условиях как ингибировать, так и усиливать перекисное окисление липидов и продукцию активных форм кислорода (Шаталин, 2010; Шаталин, Шмарев, 2010). Впервые попытка проанализировать наличие у комплексов флавоноид—металл способности ингибировать или усиливать развитие окислительного стресса была предпринята рядом авторов на модели перекисного окисления липидов в условиях *in vitro* (Sugihara et al., 1999) и затем уже на уровне организма — в услови-

ях *in vivo* (Afanas'ev et al., 1998; Kostyuk et al., 2007). Данные, полученные рядом авторов, свидетельствуют о том, что в целом комплексы флавоноидов с металлами переменной валентности проявляют более высокую антиоксидантную и гепатопротекторную активность по сравнению со свободным флавоноидом. Тем не менее в моделях *in vitro* способность ингибировать или усиливать перекисное окисление липидов существенно зависит от соотношения флавоноид—металл в системе, pH среды и концентрации активных форм кислорода, влияющих на состав и соотношение комплексов ТФ—металл.

Задачей данной работы являлось исследование влияния липосомных препаратов на основе комплексов ТФ с металлами переменной валентности на процесс регенерации кожи после химического ожога.

Материал и методика

В работе были использованы следующие реактивы: лецитин и бромистый этидий (Sigma-Aldrich, США); ацетат натрия, FeCl₃·6H₂O, FeSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O, этанол и ксилол (ЗАО Мосреактив, Москва), таксифолин (НПФ «Флавит», ИБП РАН, Пушино); заливочная среда для криотомии GSV 1 (Slee medical GmbH, Германия); смесь азур—эозин (Минимед-Р, Брянск); фосфатно-солевой буфер (ПанЭко, Москва).

Приготовление препарата липосом. Липосомы готовили методом фазовой сепарации (коацервации) (Ishii et al., 1995). Спиртовой раствор лецитина (20 %) насливали на раствор ацетатного буфера (рН 5.5) в соотношении 1 : 4, интенсивно перемешивали в течение 1 ч и оставляли на 2 ч. Состояние раствора оценивали визуально и спектрально. Включение комплексов или свободного флавоноида в липосомы осуществляли введением исходных компонентов (соль металла и ТФ) в водный раствор в концентрации 1 мМ и проведением мицеллообразования по описанной выше схеме. После получения стабильной суспензии липосом раствор дополнительно продавливали через фильтры с диаметром пор 0.22 мкм. Полученную суспензию липосом диализовали против трех смен дистиллированной воды в течение 3 ч. Полученный препарат хранили не более 48 ч при 4 °С.

Анализ регенерационных процессов в коже при химическом ожоге. Исследование проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 250—300 г. За 1 сут до начала эксперимента у всех животных удаляли волосяной покров на участке спины размером 20 см². Для получения химического ожога к коже спины, лишенной волосяного покрова, на 60 с прикладывали марлевый тампон, смоченный ледяной уксусной кислотой (площадь воздействия 1 см²). Все манипуляции над животными производили под эфирным наркозом. Раневую поверхность начинали обрабатывать исследуемыми препаратами спустя 5 ч после нанесения повреждений. В дальнейшем аппликации препаратов на раневую поверхность проводили ежедневно в течение 2 нед. Аппликации осуществляли путем нанесения на поврежденный участок ватно-марлевой повязки, пропитанной суспензией липосом.

В качестве контрольных животных использовали следующие группы крыс: 1) животные, которым на раневую поверхность наносили липосомы без включения активного компонента; 2) животные, на раневую поверхность которых апплицировали липосомы, содержащие ТФ.

В качестве экспериментальных групп использовали животных, на раневую поверхность которых апплицировали липосомы, содержащие: 1) комплекс ТФ(II); 2) комплекс ТФ—Fe(II); 3) комплекс ТФ—Fe(III).

Для оценки влияния данных препаратов на процесс регенерации были проведены гистологические исследования образцов кожи здоровых животных (норма). Каждая из экспериментальных и контрольных групп включала в себя не менее 5 животных. Всех животных содержали в условиях гуманного обращения в соответствии с Европейской конвенцией о содержании животных. Цель исследования и экспериментальный протокол работы с животными были одобрены этическим комитетом Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН.

Контроль течения раневого процесса производили на основании объективных критериев: планиметрического метода оценки изменения площади раневого дефекта и морфологического анализа поперечных гистологических срезов раневого и околораневого пространства у экспериментальных и контрольных животных. Измерения площади проводили каждые сутки по формуле

$$S_{\%} = (S_n/S_0) \cdot 100 \%,$$

где $S_{\%}$ — площадь ожога на текущие сутки, % от контроля; S_n — площадь ожога на текущие сутки, см²; S_0 — площадь ожога через 4 ч после нанесения ожога, см².

Оценку различий площади ожогов в контрольной и экспериментальной группах осуществляли с помощью U-критерия Манна—Уитни.

Приготовление срезов, окраска и анализ структуры дермальной ткани. Для проведения гистологических исследований образцы кожи животных фиксировали 4%-ным раствором формальдегида на фосфатном буфере в течение 20 ч. Затем следовала отмывка буферным раствором с последующим заключением образца в заливочную среду GSV 1 (Slee medical GmbH, Германия). Блоки ткани резали на серийные срезы толщиной 10 мкм при –18 °С. Срезы приклеивали к предметному стеклу и после стандартного окрашивания смесью азур-а и эозина изучали с помощью светового микроскопа OptiTech X139 (OptiTech, Канада). Для флуоресцентной микроскопии срезы окрашивали этидиум бромидом ($\lambda_{ex} = 493$ нм, $\lambda_{em} = 620$ нм) и изучали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Zeiss, Германия). Собственную флуоресценцию матрикса фиксированного образца регистрировали при $\lambda_{em} = 500—530$ нм.

Морфометрические исследования структурных особенностей дермы в области повреждения. Толщину эпидермиса определяли во всех полях зрения среза каждого животного при увеличении объектива 40×; общее число измерений в группе составило не менее 30—50 измерений.

Результаты

Ранее было показано, что при химических ожогах аппликации препаратами на основе ТФ существенно увеличивают скорость регенерации дермы, при этом наблюдается восстановление волосяных фолликулов, сальных желез и эпителия (Наумов и др., 2009). Тем не менее для термических травм кожи скорость регенерации ткани при обработке препаратом, содержащим флавоноид, оказалась ниже (Наумов и др., 2010). Подобный эффект, по-видимому, связан с рядом причин. Во-первых, при термической травме быстрее формируется струп с более плотной структурой, чем при химическом ожоге, что затрудняет диффузию липосомного препарата. Во-вторых, при химическом ожоге огромную роль в повреждении ткани играют кислотоз тканей и формируемые в процессе окислительного стресса карбонильные соединения, которые сами по себе существенно влияют на хемотаксис и продукцию активных форм кислорода фагоцитами (Меньшикова и др., 2006). При дальнейшем окислении карбонильные соединения способны формировать карбоновые кислоты, поддерживающие низкое значение рН в ткани. При низких значениях рН флавоноиды способны формировать конъюгаты с карбонильными соединениями (Es-Safi et al., 2002) и, таким образом, могут снижать токсический потенциал продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) (Wang et al., 2001). Процесс конъюгации существенно ускоряется в присутствии металлов переменной валентности, при этом формируемые комплексы флавоноид—металл обладают большим антиоксидантным потенциалом (Kostyuk et al., 2007) по сравнению со свободным флавоноидом. На основании этих данных нами была предпринята попытка оценить влияние данных комплексов на процесс регенерации кожи при химическом ожоге.

Для химического ожога характерно формирование области с визуально четкими контурами повреждения, которые впоследствии теряют четкость и размываются в

Динамика изменения площади повреждения кожи крыс вследствие химического ожога после аппликаций липосомным препаратом

Время, сут	Площадь повреждения кожи (в %)ª после аппликации				
	ТФ ^б	ТФ—Fe(II)	ТФ—Fe(III)	ТФ—Cu(II)	Липосомы без включения
1	93.8 ± 25.7	94.0 ± 38.5	89.9 ± 20.8	91.3 ± 25.8	97.8 ± 33.1
3	81.4 ± 17.5	82.1 ± 28.5	69.8 ± 13.9	73.8 ± 23.1	97.5 ± 15.7
5	81.1 ± 8.8	62.5 ± 7.8 ^Б	68.2 ± 5.2 ^Б	52.5 ± 11.4 ^Б	94.5 ± 7.2
6	76.4 ± 9.9	61.9 ± 10.5 ^Б	34.8 ± 3.3 ^Б	51.2 ± 10.7 ^Б	93.0 ± 14.0
7	62.9 ± 8.8 ^Б	59.1 ± 11.3 ^Б	33.1 ± 5.6 ^Б	39.1 ± 7.3 ^Б	92.3 ± 15.2
8	56.7 ± 5.6 ^Б	46.0 ± 2.5 ^Б	24.7 ± 3.1 ^Б	28.2 ± 9.5 ^Б	92.0 ± 15.4
9	41.6 ± 6.1	32.3 ± 2.1 ^Б	23.2 ± 4.5 ^Б	18.1 ± 13.1 ^Б	61.6 ± 18.1
14	14.7 ± 7.4	5.0 ± 1.4	2.5 ± 1.4	1.8 ± 0.9	10.0 ± 4.8

^а За 100 % принята площадь кожного повреждения через 4 ч после химического ожога. ^б ТФ — таксифолин. Данные представлены как среднее и стандартная ошибка. ^Б Значения, достоверно отличающиеся от контрольных (липосомы без включения) при $P < 0.05$.

процессе образования отека. После нанесения химического ожога на кожу крысы с фиксированной площадью воздействия (1 см²) наблюдается возрастание площади поражения до 4—5 см², формируется отек, наблюдается депигментация ткани с четкими границами. Регистрируемый во всех группах отек в поврежденной зоне и близлежащих областях практически не обнаруживается спустя 1 сут после нанесения ожога, при этом депигментация визуально определяется вплоть до формирования струпа на 3—4-е сут. Восстановление волосяного покрова в областях, непосредственно прилегающих к области повреждения, происходило во всех группах животных постепенно в процессе регенерации ткани. Данный процесс наиболее интенсивно протекал у животных, на раневую поверхность которых наносили липосомы, содержащие комплекс ТФ—Cu(II).

Планиметрическая оценка изменения линейных размеров области повреждения в процессе регенерации кожи показала, что аппликация липосомных препаратов на основе комплексов флавоноид—металл на раневую поверхность приводит к более быстрому уменьшению очага воспаления, окружающего область струпа, и уменьшению области ожога (см. таблицу). Статистический анализ с помощью теста Уитни—Манна проводили между группами каждые сутки в течение всего процесса регенерации кожи после нанесения ожога. При сравнении значений площади в контроле (липосомы без включения) и опытных группах (липосомы с включением комплексов ТФ—металл) были обнаружены статистически значимые различия между данными группами на 5—9-е сут ($P < 0.05$). При этом значимые различия между контрольными группами (липосомы без включения и липосомы с включением ТФ) были обнаружены только на 7-е и 8-е сут после нанесения ожога, тогда как в целом различия в площади ожогов в этих двух группах статистически недостоверны. Также необходимо отметить наличие значимых различий на 5—8-е сут между группами животных, на раневую поверхность которых наносили липосомы с включением ТФ и с включением комплекса ТФ—Cu(II), для комплекса ТФ—Fe(III) различия регистрировались в диапазоне 6—8 сут, а для комплекса ТФ—Fe(II) не выявлено достоверных различий на всем протяжении процесса регенерации. Таким образом, использование препаратов на основе ТФ—Cu(II) и ТФ—Fe(III) эффективно при об-

работке химических ожогов в сравнении с липосомами без включения или с включением свободного флавоноида.

Согласно полученным данным, при использовании препаратов на основе комплексов ТФ—Cu(II) и ТФ—Fe(III) площадь ожога на 5-е сут на 30 % меньше, чем в контрольных группах и группе, в которой в качестве активного компонента был использован комплекс ТФ—Fe(II). К 7—9-м сут различие площадей повреждений возрастает до 60 % по отношению к контрольным животным. В период 7—14 сут наблюдается разница и при использовании препарата на основе свободного флавоноида и комплекса ТФ—Fe(II).

Стоит также отметить, что во всех группах через 15 сут рана практически не идентифицируется, что согласуется с полученными ранее результатами и свидетельствует о наиболее эффективном протекании репаративных процессов по сравнению с животными, раневую поверхность которых обрабатывали физиологическим раствором (Наумов и др., 2010).

Гистологический анализ показал, что образцы изученных фрагментов кожи представлены эпидермисом, дермой, гиподермой и мышцами, под которыми виден неровный край соединительной ткани (рис. 1). На рис. 1 также видны волосяные фолликулы и сальные железы, тогда как потовых желез обнаружено не было (рис. 1, а, в), что согласуется с данными, полученными другими авторами (Marcelo et al., 2003). Так как в стандартной гистологической технике используются спиртовые растворы, ацетон и ксилол, хорошо растворяющие нейтральные жиры, при микроскопическом анализе жировые клетки обнаруживаются в виде тонкого кольца цитоплазмы, окружающего вакуоль, оставшуюся после растворения жировой капли. Ободок цитоплазмы, оставшийся после удаления накопленных жиров, может разорваться и исказить структуру ткани (рис. 1, в). Флуоресцентная микроскопия показала, что матрикс состоит из рыхлой волокнистой соединительной ткани сосочкового слоя дермы, под которым расположен более плотный сетчатый слой дермы. Видны многочисленные ядра фибробластоподобных клеток, определяемые по их продолговатой форме (рис. 1, в).

На 3-и сут после ожога в гистологических срезах кожи животных были обнаружены многочисленные повреждения всех слоев эпидермиса и дермы. На рис. 1,

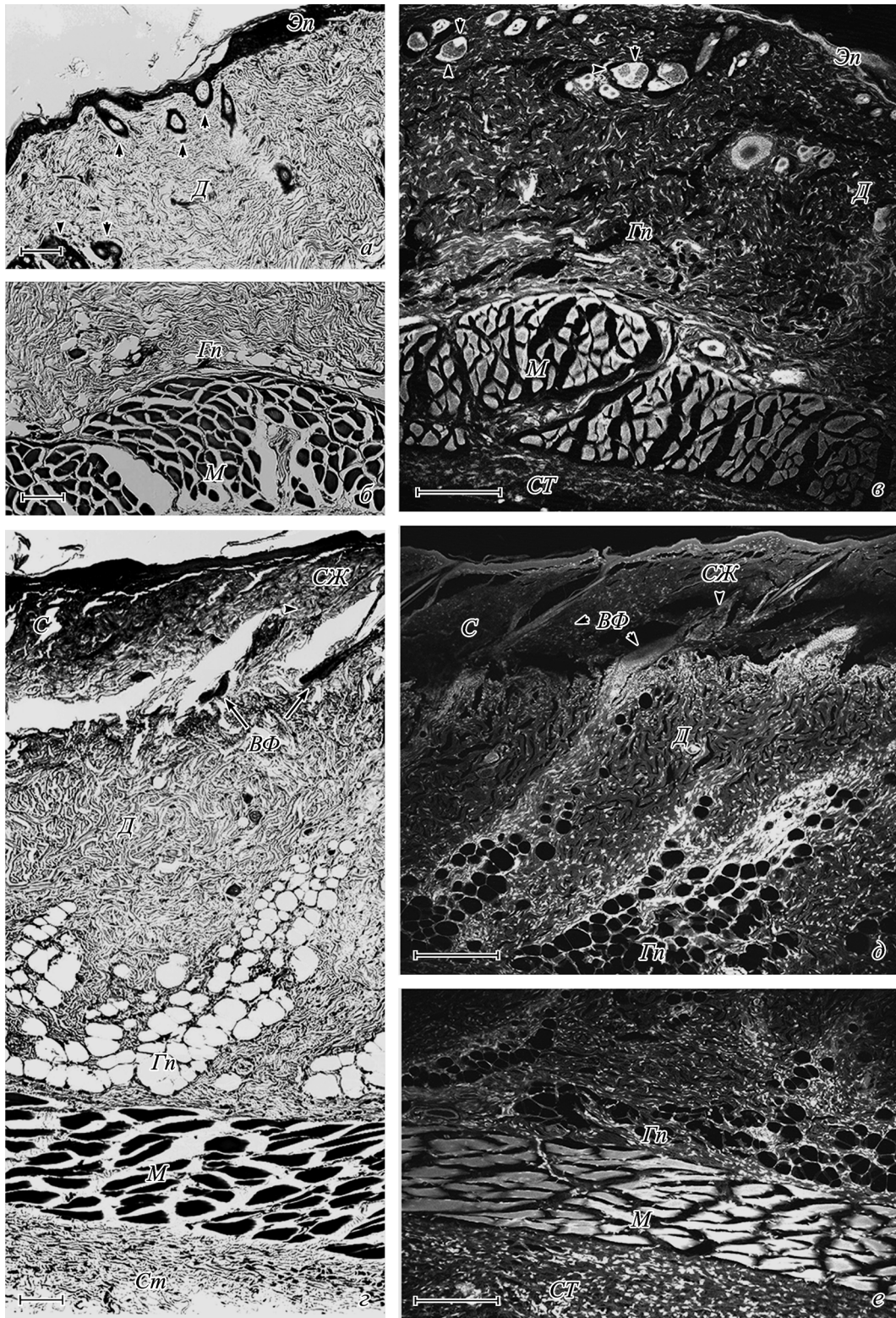


Рис. 1. Поперечные срезы кожи крыс до и после нанесения ожога.

a–в — фрагменты кожи интактных крыс: *a* — область эпидермиса и дермы, *б* — область гиподермиса и мышечной ткани, *в* — участок среза: эпидермис, дерма, гиподермальный слой, мышцы и соединительная ткань. *г–е* — ежесуточная обработка в течение 3 сут липосомами без активного компонента; *г, д* — фрагменты кожи, на которых видны разрушенный эпидермис, поврежденные участки дермы, разрушенные волосяные фолликулы и сальная железа; *е* — область гиподермы, мышц и соединительной ткани. *ВФ* — волосяные фолликулы, *Гн* — гиподерма, *Д* — дерма, *М* — мышцы, *С* — струп, *СЖ* — сальные железы, *СТ* — соединительная ткань, *Эп* — эпидермис. *Стрелкой* указаны волосяные фолликулы, *головой стрелки* — сальные железы. Окраска азур-эозином (*a, б, г*) и бромистым этидием (*в, д, е*). *Масштабные отрезки*: *a, б, г* — 100 мкм; *в, д, е* — 250 мкм.

г—е в качестве примера представлен гистологический срез кожи животного, на раневую поверхность которого наносили суспензию липосом без включения активного компонента: видны разрушенный эпидермис и поврежденные участки дермы, наблюдаемые вплоть до жировой ткани (гиподермы) кожи. В пораженной области видны некротические массы, разрушенные волосяные фолликулы (ВФ) и сальные железы (СЖ) (рис. 1, г, д), разрушено дермоэпидермальное соединение, отмечены признаки воспаления: расширение сосудов дермы под раневой поверхностью и клеточная инфильтрация дермы. При анализе гистологических препаратов с помощью флуоресцентной микроскопии было обнаружено наличие некротических масс в области ожога, в отдельных участках которого виден окрашенный этидиум бромидом ядерный материал, равномерно заполняющий всю область струпа. Наблюдается инфильтрация всех слоев соединительной ткани клетками лейкоцитарного ряда (овальная форма), отмечено их скопление в области под струпом (рис. 1, д). Структура матрикса в слоях, непосредственно прилегающих к эпидермису, нарушена, в структуре присутствует множество разрывов, особенно заметных непосредственно рядом с ВФ и СЖ. В период активной регенерации в первые 10 сут процессы эпителизации, восстановления ВФ и СЖ, миграции фибробластов и восстановления матрикса во всех группах протекают со схожей гистологической картиной, но с различной интенсивностью. У контрольных животных, на поврежденные участки кожи которых апплицировали препарат на основе липосом без активного компонента, скорость регенерации была самая низкая. К 14-м сут после нанесения ожога и начала аппликации препаратов гистологическое исследование образцов кожи выявило наличие поврежденного эпидермиса и дермы (рис. 2, а). В области ожога сформированный струп представляет собой неоднородную и неструктурированную массу с множественными разрывами ткани, достигающими значений 240—340 мкм. На 14-е сут эксперимента наблюдаемые разрывы в области струпа характерны только для данной группы животных. В зоне формирования эпидермиса видны скопления разрушенных полиморфноядерных лейкоцитов (рис. 2, б). На течение воспалительного процесса также указывают расширение сосудов дермы и наличие клеточной инфильтрации, хорошо заметной при исследовании срезов с помощью флуоресцентной микроскопии (рис. 2, в). На срезах виден струп, в отдельных участках которого обнаруживаются скопления ядерного материала. В дермальной и гиподермальной областях наблюдаются многочисленные ядра клеток как лейкоцитарного ряда (овальная форма), так и фибробластоподобных клеток (продолговатая форма), хаотично расположенные во всем поле зрения микроскопа. Наличие такого количества клеточных элементов свидетельствует об интенсивно протекающих воспалительных и репаративных процессах в поврежденной области (рис. 2, в).

При аппликациях на раневую поверхность суспензии липосом, содержащих ТФ, также наблюдается наличие струпа (данные не представлены). В области регенерации отчетливо видна область дермы с интенсивно протекающими регенерационными процессами, обнаруживаемая по более интенсивному окрашиванию (рис. 2, г) и флуоресценции (рис. 2, д, е). Представленный на рисунке участок кожи полностью эпителизирован. Толщина эпидермиса изменяется в диапазоне от 30 до 130 мкм (в норме 30—55 мкм) в зависимости от степени повреждения кожи

и протекающих регенерационных процессов (рис. 2, е). На рисунке также видны многочисленные ВФ и СЖ, имеющие морфологическое строение, близкое к интактным. Флуоресцентная микроскопия позволила выявить участки с интенсивно протекающими регенерационными процессами, для которых характерна интенсивная светло-зеленая флуоресценция матрикса, имеющего более плотную неупорядоченную структуру (рис. 2, д, е).

Аппликация на раневую поверхность липосомных препаратов, содержащих в качестве активного компонента комплексы флавоноид—металл, приводила к схожим между собой гистологическим результатам. В частности, анализ гистологических срезов кожи животных, на раневую поверхность которых наносили липосомы с комплексом ТФ—Cu(II), показал наличие струпа в зоне максимального повреждения кожи (рис. 3, а, б). Видно, что процесс эпителизации и регенерации ткани продолжается, в поле зрения не наблюдается ни ВФ, ни СЖ (рис. 3, а, б). Тогда как в близлежащей области с интенсивно протекающими регенерационными процессами видны многочисленные ВФ и СЖ, имеющие морфологическое строение, близкое к интактному (рис. 3, в). Размер эпидермиса в области регенерационных процессов в среднем составляет 60—75 мкм, что примерно в 1.5 раза превышает соответствующее значение для кожи в норме, тогда как средняя толщина эпидермиса в уже восстановленной области кожи (рис. 3, в) не отличается от соответствующей величины в норме. Исследование срезов методом флуоресцентной микроскопии позволило выявить участки с интенсивно протекающими регенерационными процессами (рис. 3, б). Также видна область плотной волокнистой соединительной ткани, в которой по сравнению с контрольными группами увеличивается пропорция клеток фибробластоподобного ряда, что свидетельствует об интенсивной регенерации (рис. 3, б). Расположенный под ней слой гиподермы выглядит более рыхлым вследствие разрывов ободков цитоплазмы липоцитов. Стоит также отметить, что в области максимального повреждения ткани, расположенной под струпом (рис. 3, а, б), наблюдается наиболее глубокий участок с интенсивно протекающими регенерационными процессами. Видны плотные волокна внеклеточного матрикса дермы, которые «вытесняют» расположенную ниже подкожную жировую ткань, что является одним из признаков фиброза (Huber et al., 2007). Тем не менее изучение ткани из близлежащей области показало, что структуры матрикса, ВФ и СЖ близки к норме (рис. 3, в), что свидетельствует об отсутствии формирования рубца и практически полном восстановлении ткани, протекающем более эффективно по сравнению с контрольными группами.

В группе животных, на раневую поверхность которых наносили липосомы с комплексом ТФ—Fe(II), также были обнаружены признаки восстанавливающейся ткани. На рис. 3 виден струп, под которым произошла полная эпителизация ткани (рис. 3, г), различимы небольшие участки с интенсивно протекающими регенерационными процессами (рис. 3, г—е). Толщина эпидермиса составляет порядка 80—100 мкм в области интенсивно протекающих регенерационных процессов, при удалении от которых она постепенно уменьшается и достигает значений, характерных для кожи в норме (30—55 мкм). Флуоресцентная микроскопия фрагментов кожи показала наличие плотной волокнистой соединительной ткани, видны ядра клеток лейкоцитарного ряда (овальная форма) и фибробластоподобные клетки (продолговатая форма), на-

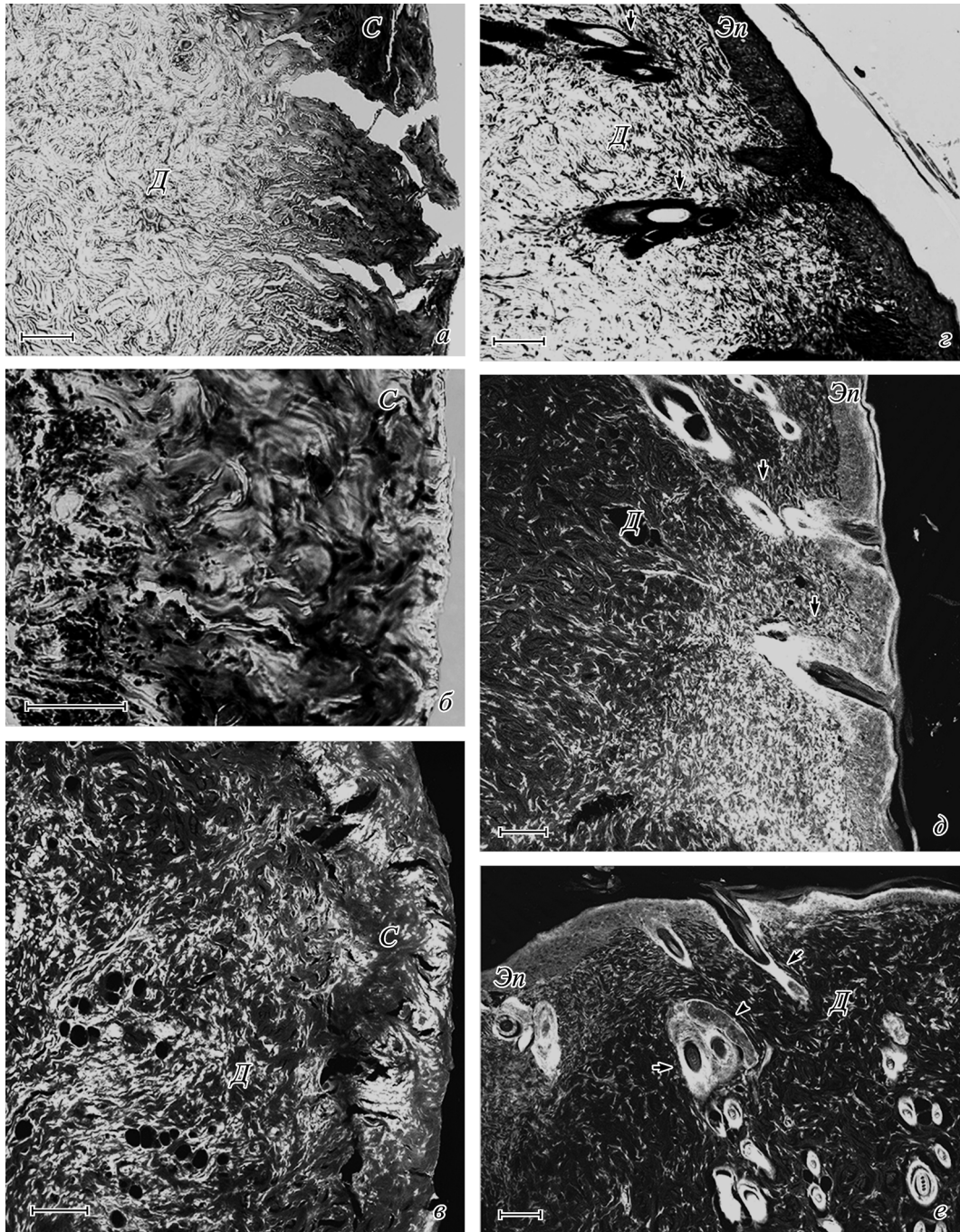


Рис. 2. Поперечные срезы поврежденных участков кожи крыс на 14-е сут эксперимента после аппликации липосомными препаратами без включения и с включением таксифолина.

a—в — обработка липосомами без включения активного компонента: видны поврежденные эпидермис и дерма. *г—е* — обработка липосомами с таксифолином: видны эпидермис, дерма, область с интенсивно протекающими регенерационными процессами, волосяные фолликулы (стрелка) и сальная железа (голова стрелки). Обозначения те же, что и на рис. 1. Окраска азур-эозином (*a, б, г*) и бромистым этидием (*в, д, е*). Масштабные отрезки: *a, в—е* — 100 мкм; *б* — 50 мкм.

блюдается увеличение пропорции клеток фибробластоподобного ряда, а также уменьшение зоны интенсивно протекающих регенерационных процессов по сравнению с контрольными группами (рис. 3, *e*).

На рис. 4 представлены срезы кожи животных, на раневую поверхность которых наносили липосомы, содержащие комплекс ТФ—Fe(III). На срезах видна полностью эпителизованная поверхность, хорошо видны край эпителизации (рис. 4, *a*) и небольшой участок с интенсивно

протекающими регенерационными процессами (рис. 4, *a—в*). Хорошо видна область гиподермы с частично разорванными ободками цитоплазмы жировых клеток (рис. 4, *a*). В близлежащей зоне наблюдаются многочисленные ВФ и СЖ, имеющие морфологическое строение, близкое к интактным (рис. 4, *в, г*). Толщина эпидермиса в среднем меняется от 70—110 до 35—50 мкм (в норме 30—55 мкм) в зависимости от степени протекающих регенерационных процессов. Флуоресцентное исследование

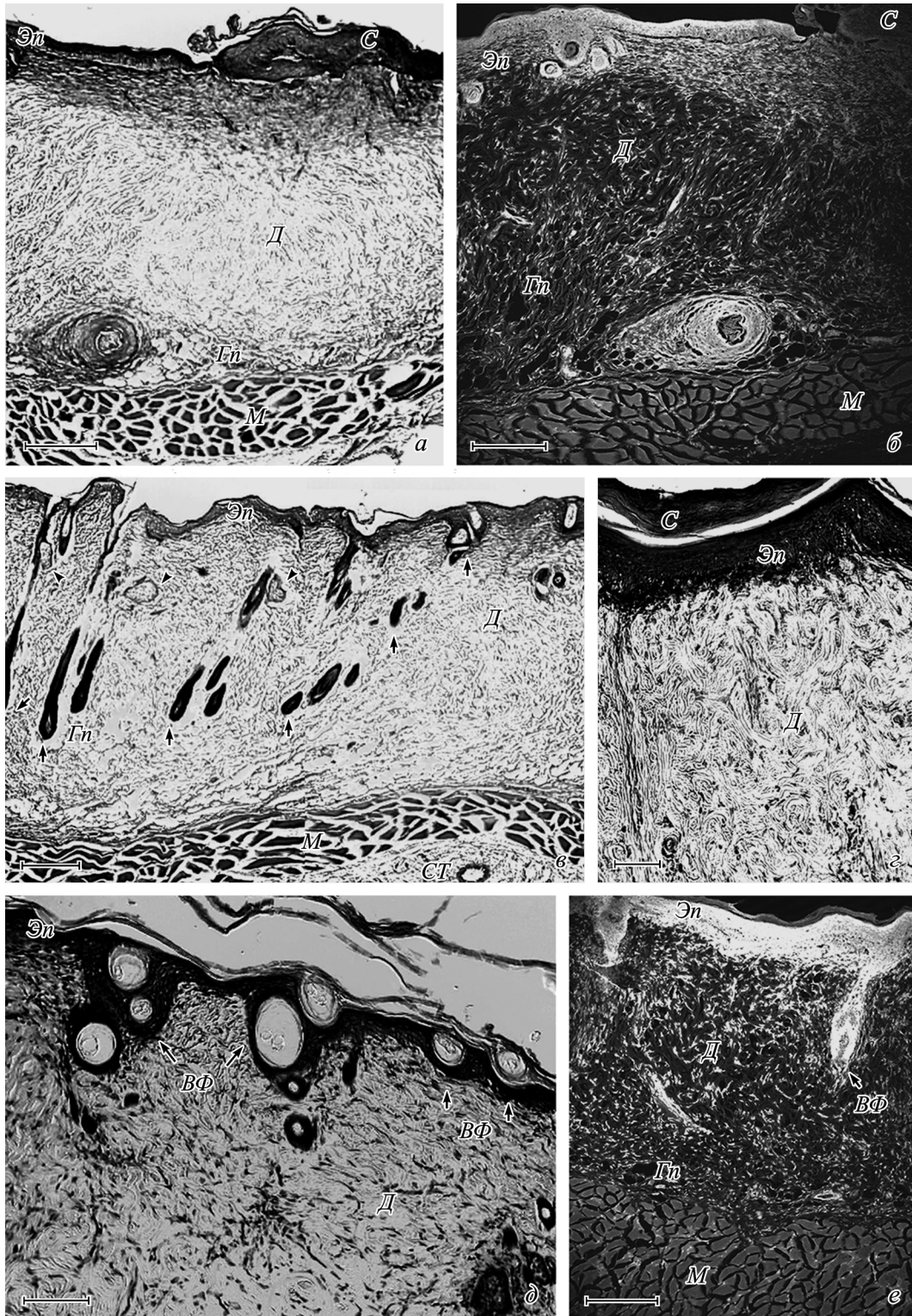


Рис. 3. Поперечные срезы поврежденных участков кожи крыс на 14-е сут после аппликации их липосомными препаратами с включением комплексов таксифолин—Cu(II) и таксифолин—Fe(II).

a—в — обработка липосомами с комплексом таксифолин—Cu(II): *a, б* — участок среза, на котором видны струп, эпителизованная область, дерма, гиподермальный слой и мышцы; *в* — полностью эпителизованный участок ожога; волосяные фолликулы (*стрелка*) и сальные железы (*головка стрелки*) морфологически близки к интактным. *г—е* — обработка липосомами с комплексом таксифолин—Fe(II): *г* — под струпом видна полная эпителизация раны; *д, е* — фрагменты кожи, структура которых сходна с интактной. Обозначения те же, что и на рис. 1. Окраска азур-эозином (*a, в—д*) и бромистым этидием (*б, е*). Масштабные отрезки: *a—в, е* — 250 мкм; *г, д* — 100 мкм.

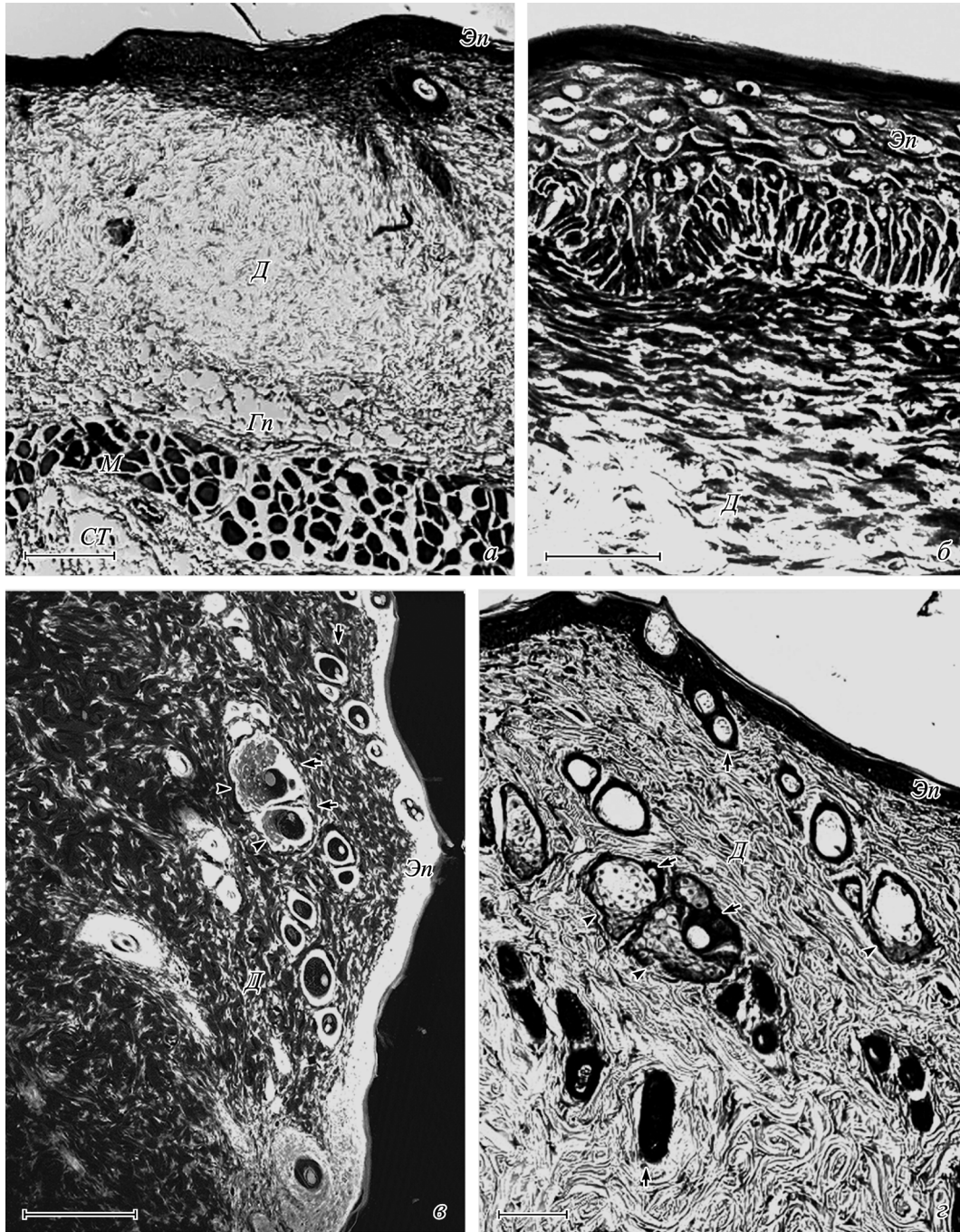


Рис. 4. Поперечные срезы поврежденных участков кожи крыс на 14-е сут после аппликации их липосомным препаратом с включением комплекса таксифолин—Fe(III).

a — участок эпителизации и ниже — область с интенсивно протекающими регенерационными процессами; *б* — участок эпидермиса и дермы в области с интенсивно протекающими регенерационными процессами при большем увеличении; *в, з* — фрагменты кожи, структура которых близка к интактной. Обозначения те же, что и на рис. 1. Окраска азур-эозином (*a, б, з*) и бромистым этидием (*в*). Масштабные отрезки: *a, в* — 250 мкм; *б* — 50 мкм; *з* — 100 мкм.

срезов показало, что матрикс дермы представлен в виде волокнистой соединительной ткани и близок по структуре к норме. Также преимущественно видны ядра клеток фибробластов, пропорция которых по отношению к клеткам лейкоцитарного ряда увеличивается по сравнению с контрольными группами, что говорит о снижении воспалительной реакции и интенсификации регенерационного процесса (рис. 4, *в*). Таким образом, структуры матрикса, ВФ и СЖ близки к норме, что свидетельствует об эффек-

тивном влиянии данного препарата на процесс восстановления ткани после химического ожога по сравнению с контрольными группами.

Обсуждение

Оценка изменения площади раневой поверхности и результаты гистологических исследований позволяют говорить о том, что в экспериментальных группах (ап-

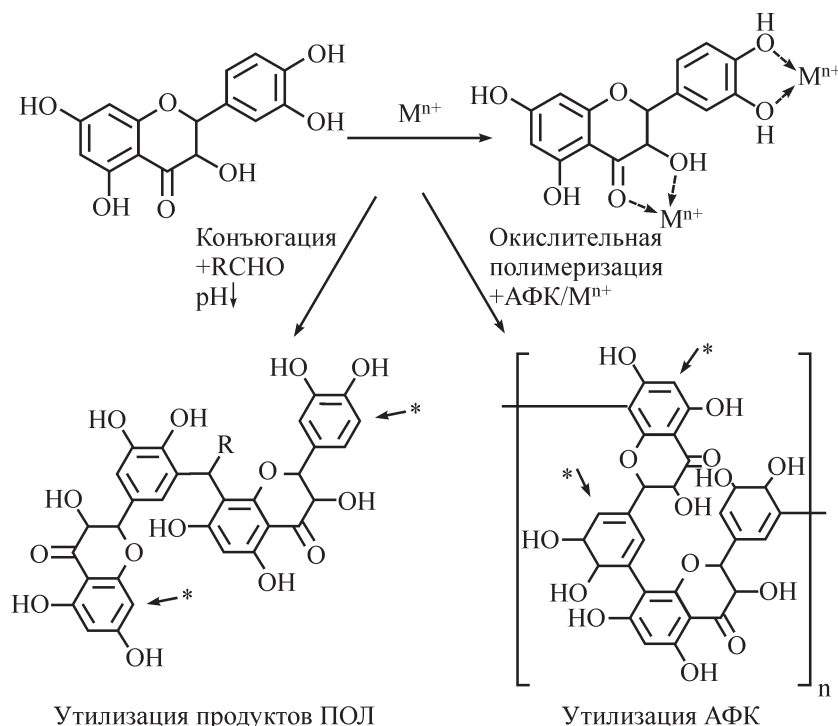


Рис. 5. Формирование конъюгатов и олигомеров флавоноида в процессе утилизации активных форм кислорода и продуктов перекисного окисления липидов.

Стрелками со звездочкой указаны пути дальнейшей олигомеризации в указанных процессах.

пликация липосомными препаратами с включением комплексов флавоноид—металл) процесс регенерации ткани проходит наиболее эффективно по сравнению с контрольными группами (липосомный препарат без включения или с включением свободного флавоноида). При этом полная эпителизация раневой поверхности ранее всего наблюдается у отдельных животных при аппликации препаратов на основе комплексов ТФ—Cu(II) и ТФ—Fe(III). Однако в последнем случае заживление ран у всех животных зарегистрировано несколько раньше, чем в остальных экспериментальных группах и в контроле. Одной из причин более быстрого восстановления ткани при использовании препаратов на основе комплексов ТФ—Cu(II) и ТФ—Fe(III) является, по-видимому, то, что данные препараты более эффективно утилизируют продукты ПОЛ, ингибирующие клеточную пролиферацию (Wang et al., 2001). Результаты анализа клеточного состава дермы под раневой поверхностью через 2 нед после нанесения ожога показали наличие отчетливо выраженного сдвига в сторону клеток фибробластоподобного ряда, что в совокупности свидетельствует о более быстром снижении в этих условиях воспалительного процесса, развивающегося в месте ожога. Объяснением подобного эффекта может служить тот факт, что в условиях низких значений pH флавоноиды способны формировать конъюгаты с карбонильными соединениями (Es-Safi et al., 2002). Причем при понижении pH скорость формирования конъюгатов возрастает на 2 порядка (данные не представлены). Изменение pH также способствует и другому процессу — окислительной полимеризации флавоноида, в результате которой наблюдается восстановление хиноновых фрагментов, формируемых в процессе окисления флавоноидов, за счет формирования новых межмолекулярных С—С-связей. Процессы конъюгации и полимеризации су-

щественно облегчаются в присутствии металлов переменной валентности, что приводит к быстрой утилизации продуктов ПОЛ в процессе окислительного стресса. Суммарный механизм действия данных препаратов можно проиллюстрировать в виде схемы (рис. 5). Формируемый олигомер флавоноида эффективнее хелатирует металлы переменной валентности, чем свободный флавоноид, и способен утилизировать до 8 свободных радикалов в пересчете на одну молекулу мономера (Hotta et al., 2001). Таким образом, данные препараты обладают противовоспалительным действием и способствуют снижению токсического действия продуктов ПОЛ (Wang et al., 2001). Различие между препаратами на основе ТФ—Fe(III) и ТФ—Fe(II) может быть связано со скоростью формирования олигомеризованных и конъюгированных форм флавоноида. Нами отмечено, что комплекс ТФ—Fe(II) не переходит в ТФ—Fe(III) под действием растворенного кислорода (данные не представлены), что говорит об эффективном хелатировании металла флавоноидом и формировании устойчивого к окислению комплекса состава 2 : 1.

Таким образом, использование препаратов на основе липосом, содержащих комплексы ТФ—Cu(II) и ТФ—Fe(III), может быть эффективным при лечении химических ожогов, способствуя стимуляции пролиферативных процессов в эпидермисе и модификации течения воспалительного процесса в сторону активации фибробластической реакции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы» (№ 2.1.1/10886) и Федеральной целевой программы «Научные и научно-

педагогические кадры инновационной России» 2009—2013 гг., по государственным контрактам (№ 16.740.11.0349 и П609) с использованием приборов Регионального Пушчинского центра коллективного пользования «Структурно-функциональные исследования биосистем» Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН.

Список литературы

Меньшикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К., Бондарь И. А., Круговых Н. Ф., Труфакин В. А. 2006. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово. 556 с.

Наумов А. А., Шаталин Ю. В., Поцелуева М. М. 2010. Воздействие наноконлекса, содержащего антиоксидант, липид и аминокислоту, на раневую поверхность, вызванную термическим ожогом. Бюл. эксперим. биол. мед. 148 (1) : 69—73.

Наумов А. А., Шаталин Ю. В., Сухомлин Т. К., Поцелуева М. М. 2009. Влияние липосом, содержащих антиоксидант, фосфолипид и аминокислоту, на процесс регенерации кожи после химического ожога. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2 : 96—102.

Шаталин Ю. В. 2010. Комплексы флавоноидов с металлами переменной валентности. Пушино: Фотон-Век. 176 с.

Шаталин Ю. В., Шмарев А. Н. 2010. Окисление лецитина в присутствии дигидрокверцетина и его комплекса с ионами двухвалентного железа. Биофизика. 55 (1) : 75—82.

Afanas'ev I. B., Ostrachovich E. A., Korkina L. G. 1998. Effect of rutin and its copper complex on superoxide formation and lipid peroxidation in rat liver microsomes. FEBS Lett. 425 : 256—258.

Es-Safi N. E., Cheynier V., Moutounet M. 2002. Role of aldehydic derivatives in the condensation of phenolic compounds with emphasis on the sensorial properties of fruit-derived foods. J. Agric. Food Chem. 50 : 5571—5585.

Hotta H., Sakamoto H., Nagano S., Osakai T., Tsujino Y. 2001. Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic antioxidants. Biochim. biophys. acta. 1526 : 159—167.

Huber L. C., Distler J. H., Moritz F., Hemmatazad H., Hauser T., Michel B. A., Gay R. E., Matucci-Cerinic M., Gay S., Distler O., Jungel A. 2007. Trichostatin A prevents the accumulation of extracellular matrix in a mouse model of bleomycin-induced skin fibrosis. Arthritis Rheum. 56 : 2755—2764.

Ishii F., Takamura A., Ishigami Y. 1995. Procedure for preparation of lipid vesicles (liposomes) using the coacervation (phase separation) technique. Langmuir. 11 : 483—486.

Kostyuk V. A., Potapovich A. I., Kostyuk T. V., Cherian M. G. 2007. Metal complexes of dietary flavonoids: evaluation of radical scavenger properties and protective activity against oxidative stress *in vivo*. Cell. Mol. Biol. 53 : 62—69.

Marcelo B. T., Kemli R. B., Cristiano N., Comesu M. V. 2003. Progressive effects of diabetes mellitus on the skin epithelium of the rat. Int. J. Morphol. 21 : 143—148.

Sugihara N., Arakawa T., Ohnishi M., Furuno K. 1999. Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid. Free Radic. Biol. Med. 27 : 1313—1323.

Wang H., Liu X., Umino T., Sköld C. M., Zhu Y., Kohyama T., Spurzem J. R., Romberger D. J., Rennard S. I. 2001. Cigarette smoke inhibits human bronchial epithelial cell repair processes. Amer. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 25 : 772—779.

Поступила 15 VII 2011

EFFECT OF THE LIPOSOMAL FORM OF FLAVONOID—METAL COMPLEXES ON SKIN REGENERATION AFTER CHEMICAL BURN

V. S. Shubina,^{1,2,*} Yu. V. Shatalin^{1,2}

¹ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, and ² Pushchino State University;
* e-mail: shubinavictoria@rambler.ru

The effect of the liposomal form formed by taxifolin and metals of variable valency was investigated. It was shown that the application of preparations based on the free flavonoid and its complexes with Fe(II/III) and Cu(II) ions after chemical burns results in a more effective skin regeneration and the repair of hair follicles and sebaceous glands. A tendency for a more effective wound healing after the applications of taxifolin—Cu(II) and taxifolin—Fe(III) liposomal complexes versus control was observed. It was assumed that the mechanism of action of these preparations is based on the oxidative polymerization and conjugation of the flavonoid, which results in the utilization of toxic metabolites and lipid peroxidation products.

Key words: liposomes, complexes of taxifolin with metals of variable valency, chemical burn, skin regeneration.