

DOI: <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2024.4.113>

Гистологическая характеристика регенерации тканей при лечении экспериментальной плоскостной раны гелями на основе листьев ольхи черной и листьев ольхи серой

О.В. Мушкина¹, Н.С. Гурина¹, А.Ю. Крылов²

¹Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Республика Беларусь

²Институт повышения квалификации и переподготовки кадров Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, г. Минск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2024. – Том 23, №4. – С. 113-122.

Histological characteristics of tissue regeneration during treating an experimental plane wound with gels based on the leaves of black alder and the leaves of gray alder

O.V. Mushkina¹, N.S. Gurina¹, A.Yu. Krylov²

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

²Institute for advanced training and retraining of the investigative committee of the Republic of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2024;23(4):113-122.

Резюме.

Цель работы – гистологический анализ раневых дефектов кожи крыс при лечении гелями на основе настоек из листьев ольхи черной и ольхи серой.

Материал и методы. Для оценки регенеративных свойств листьев ольхи черной и ольхи серой на модели плоскостной полнослойной кожной раны использовано 6 серий полученных нами гелей. Четыре серии фитогелей: две – содержащие настойки из листьев ольхи серой (на основе 30% и 70% спирта этилового) и две – настойки из ольхи черной (на основе 30% и 60% спирта этилового). В качестве плацебо – две серии без растительных настоек. В качестве препаратов сравнения использовали 5% гель декспантенола и мазь репарэф-2. Исследование было выполнено на 81 белой крысе-самце линии Wistar. На выбритом от шерсти участке спины крыс иссекали кожу с подкожной клетчаткой. Раны оставляли открытыми и со второго дня эксперимента ежедневно обрабатывали их 1 раз в сутки. Гистологическое исследование производили на 5, 9 и 13 сутки эксперимента. Забор материала проводили путем иссечения рубцовой ткани и прилежащего края раны. Полученный материал был зафиксирован в 10% формалине, обезвожен в спиртах восходящей плотности, залит в парафин, затем из него были изготовлены микропрепараты, окрашенные гематоксилином и эозином.

Результаты. Результаты морфологического исследования показали, что использованные фитогели стимулируют пролиферативную и функциональную активность клеток грануляционной ткани. При этом гель, содержащий настойку листьев ольхи черной на основе 60% спирта, проявлял максимальную эффективность.

Заключение. Динамика морфологической картины ран, обрабатываемых фитогелями и мазью репарэф-2, указывала на их четко выраженное ранозаживляющее действие, в то время как морфологическая характеристика тканевых дефектов, обрабатываемых гелями-плацебо, соответствовала таковой в контрольной группе.

Ключевые слова: ольха черная, ольха серая, гели, раны, гистологические препараты.

Abstract.

Objectives. To make a histological analysis of wound defects of the skin of rats during treatment with gels based on tinctures of black alder and gray alder leaves.

Material and methods. For assessing the regenerative properties of black alder and gray alder leaves on a model of a planar full-thickness skin wound, we used 6 series of gels, which had been prepared previously. Four series of phytogels:

two of them containing tinctures of gray alder leaves (based on 30% and 70% ethyl alcohol) and two containing tinctures of black alder leaves (based on 30% and 60% ethyl alcohol). Two series without herbal tinctures served as a placebo. 5% dexpanthenol gel and Reparef-2 ointment were used as comparison drugs. The study was performed on 81 white male Wistar rats. The skin and subcutaneous tissue were excised from an area of the rats' backs shaved from fur. The wounds were left open and beginning with the second day of the experiment they were treated daily once a day. Histological examination was carried out on the 5th, 9th and 13th days of the experiment. The material was collected by excision of scar tissue and the adjacent wound edge. The obtained material was fixed in 10% formaldehyde, dehydrated in alcohols of increasing density, embedded in paraffin, and then microslides were made from it, stained with hematoxylin and eosin. Results. The results of the morphological study showed that the phytogels used stimulate the proliferative and functional activity of granulation tissue cells. At the same time, the gel containing a tincture of black alder leaves based on 60% alcohol showed maximum effect.

Conclusions. The dynamics of the morphological picture of wounds treated with phytogels and Reparef-2 ointment indicated their clearly expressed wound-healing effect, while the morphological characteristic of tissue defects treated with placebo gels corresponded to that in the control group.

Keywords: *black alder, gray alder, gels, wounds, histological preparations.*

Введение

Раны – одно из самых распространенных травматических повреждений, частота которых постоянно возрастает в связи с увеличением количества стихийных бедствий, производственных и бытовых травм, военных конфликтов. Поэтому проблема регенерации раневых повреждений и поиск новых лекарственных средств для ее решения является актуальной задачей современной медицины [1, 2]. Разработка местных ранозаживляющих средств растительного происхождения – перспективное направление, так как фитоэкстракты содержат разнообразные по химическому строению биологически активные вещества, оказывающие широкий спектр фармакологической активности. Полифенольные соединения растительного происхождения (флавоноиды, дубильные вещества, фенолкарбоновые кислоты и др.) обладают противовоспалительным, антимикробным и антиоксидантным действием. Использование местных ранозаживляющих средств, содержащих антиоксиданты, способствует сокращению времени заживления ран. С активными формами кислорода взаимодействуют неферментативные и ферментативные антиоксиданты. При этом низкомолекулярные соединения, например глутатион, убихинон, витамин С (аскорбиновая кислота), витамин Е, каротиноиды и фенольные соединения, функционируют как неферментативные антиоксиданты [3].

Регенерация раны включает в себя три фазы: I – фаза воспаления; II – фаза регенерации; III – фаза организации рубца. Заживление ран в коже инициируют фибробласты, которые образуют

временную тканевую матрицу. За этим следует воспаление и повторная эпителизация кератиноцитами. Дальнейшая ревазуляризация раны, наряду с образованием внеклеточного матрикса, ангиогенезом и ремоделированием, завершается заживлением и восстановлением раны. Морфологически выделяют три фазы клеточных реакций, в зависимости от преобладания отдельных видов клеток: лейкоцитарную, макрофагальную и фибробластическую. Для регенерации раны характерен сложный клеточный состав, который может служить прогностическим критерием оценки процесса заживления [4].

Цель работы – гистологический анализ раневых дефектов кожи крыс при лечении гелями на основе настоек из листьев ольхи черной и серой.

Материал и методы

Для оценки регенеративных свойств листьев ольхи черной и ольхи серой на модели плоскостной полнослойной кожной раны использовано 6 серий полученных нами гелей. Четыре серии фитогелей, содержащие настойки из листьев ольхи серой или черной и две серии – гелей-плацебо (табл. 1) [5, 6]. В качестве препаратов сравнения использовали 5% гель декспантенола и мазь репарэф-2.

Исследование было выполнено на 81 белой крысе-самце линии Wistar, массой $180,0 \pm 20,0$ г, прошедших карантин в виварии УО БГМУ. Все животные содержались в стандартных условиях. Животным под наркозом после депиляции волосяного покрова моделировались плоскостные полнослойные круглые кожные раны. На выбри-

Таблица 1 – Составы экспериментальных гелей

Серия геля	Состав	
	Действующее вещество	Вспомогательные вещества
Серия ОЧ60	Настойка листьев ольхи черной на основе 60% спирта этилового	вода, этилендиаминтетраацетат, карбомера, макрогола, пропиленгликоля, диэтанолamina
Серия ОЧ30	Настойка листьев ольхи черной на основе 30% спирта этилового	гидроксипропилметилцеллюлоза
Серия ОС70	Настойка листьев ольхи серой на основе 70% спирта этилового	вода, этилендиаминтетраацетат, карбомера, макрогола, пропиленгликоля, диэтанолamina
Серия ОС30	Настойка листьев ольхи серой на основе 30% спирта этилового	гидроксипропилметилцеллюлоза
Серия П70	Спирт этиловый 70%	вода, этилендиаминтетраацетат, карбомера, макрогола, пропиленгликоля, диэтанолamina
Серия П30	Спирт этиловый 30%	гидроксипропилметилцеллюлоза

Таблица 2 – Группы экспериментальных животных

Группа животных	Препараты, которыми обрабатывали раны
1-я (контрольная)	0,9% раствором NaCl
2-я	гель ОЧ60
3-я	гель ОЧ30
4-я	5% гель декспантенол
5-я	мазь репарэф 2
6-я	гель ОС70
7-я	гель ОС30
8-я	гель П70
9-я	гель П30

том от шерсти участке спины без соблюдения стерильных условий иссекали хирургическими ножницами кожу с подкожной клетчаткой. Раны оставляли открытыми, со второго дня эксперимента обрабатывали их 1 раз в сутки исследуемыми препаратами. Животные были разделены на 9 групп по 9 животных в группе в зависимости от препарата, которым осуществлялась обработка ран (табл. 2).

Гистологическое исследование производили на 5, 9 и 13 сутки эксперимента. Животных выводили из эксперимента путем передозировки фторотана. Забор материала проводили путем иссечения рубцовой ткани и прилежащего края раны. Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине с последующей проводкой по восходящим спиртам в процессоре карусельного типа Leika TP 1020 и заливкой в парафин по стандартной методике. Полученные блоки резали на микротоме (Leika RT), толщина срезов 3-5 мкм. Депарафинизация срезов. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином в аппарате Leika ST

5010, затем накрывали покровными стеклами. Микроскопический анализ проводили на гистоскане MoticEasyscan [7].

При проведении экспериментального исследования соблюдались принципы биоэтики в соответствии со следующими регламентирующими документами: «Международные рекомендации (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» [8-11]. Перед проведением эксперимента протокол исследования был утвержден на заседании этической комиссии УО «Белорусский государственный медицинский университет».

Результаты и обсуждение

Гистологические исследования показали, что на 5 сутки эксперимента во всех группах имеются участки кожи с дефектом многослойного плоского эпителия (эпидермиса): очаг некроза с выраженной воспалительной инфильтрацией (рис. 1), в воспалительном инфильтрате преобладают сег-



Рисунок 1 – Участки кожи с раной – очаг некроза с выраженной воспалительной инфильтрацией, распространяющейся до жировой клетчатки. Ув. x4

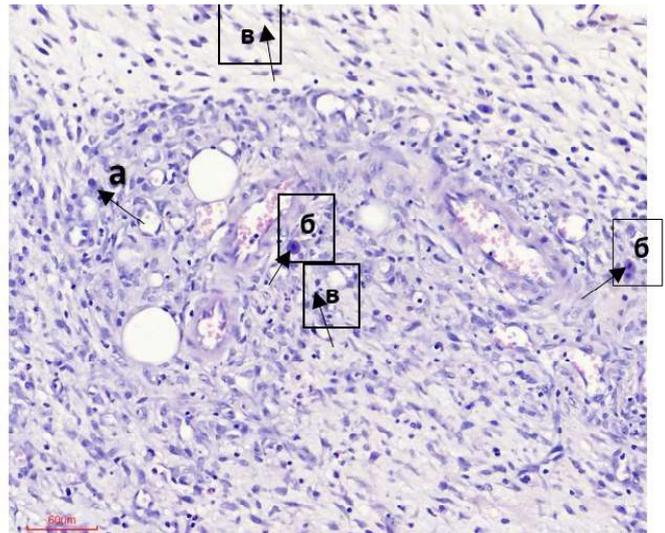


Рисунок 2 – В воспалительном инфильтрате преобладают сегментоядерные лейкоциты (а), тучные клетки (б), плазмоциты (в). Ув. x20



Рисунок 3 – Формирование микроабсцессов в ране. Ув. x10

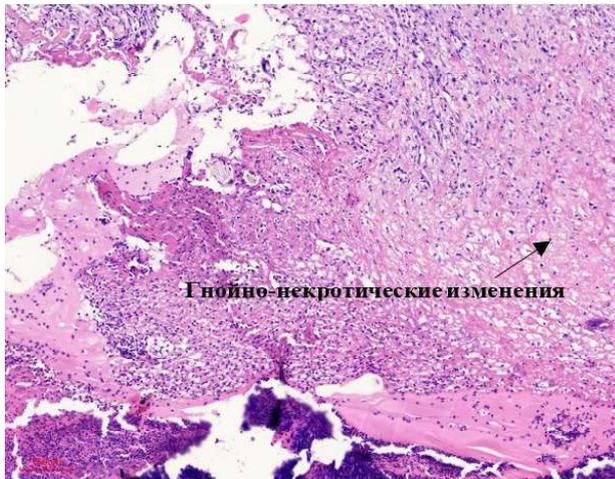


Рисунок 4 – Морфологические изменения дефекта контрольной группы на 9 сутки. Ув. x10

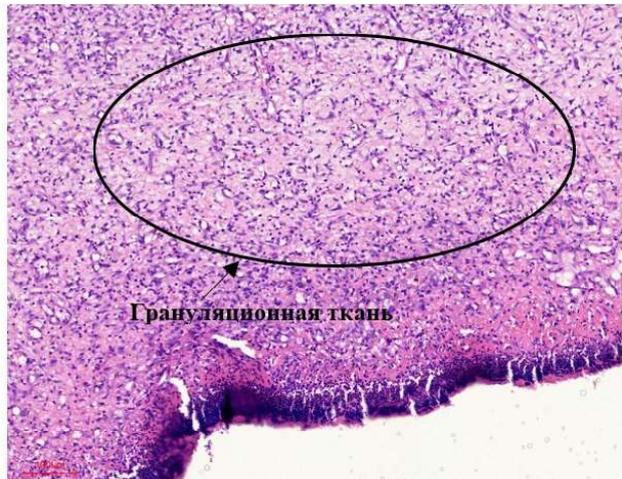


Рисунок 5 – Участки хорошо сформированной грануляционной ткани. Ув. x10

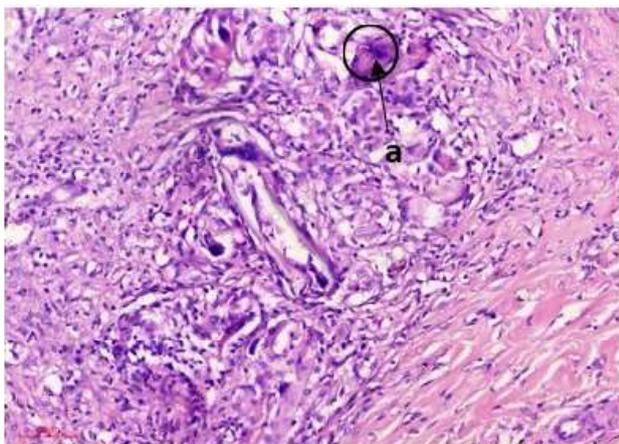


Рисунок 6 – Очаги продуктивного воспаления с наличием гигантских многоядерных клеток (а).
Ув. x 20

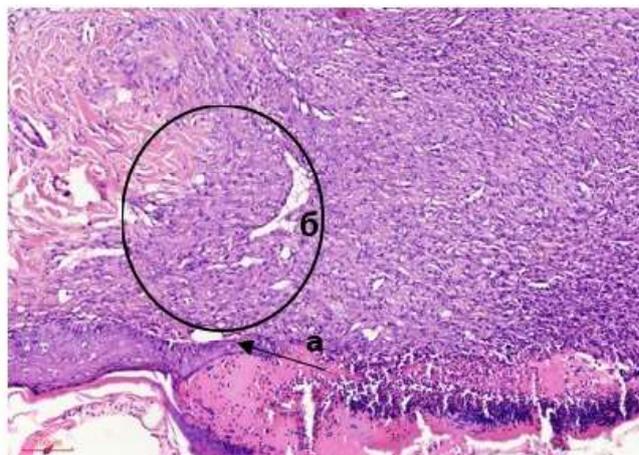


Рисунок 7 – края раны, определяется молодой эпидермис (а), под ним зрелая грануляционная ткань (б). Ув. x10

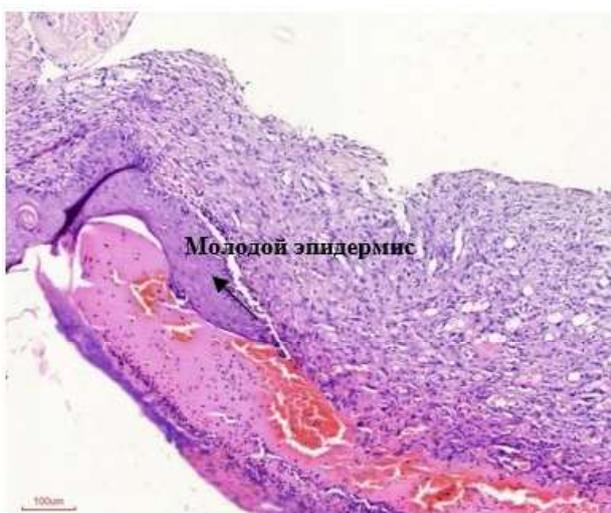


Рисунок 8 – Морфологические изменения в группе 3 на 9 сутки. Ув. x10



Рисунок 9 – Морфологические изменения дефекта группы 6 на 9 сутки. Ув. x10

ментоядерные лейкоциты (рис. 2), тучные клетки, плазмоциты, что свидетельствует о хроническом гнойном воспалении. Наблюдается формирование грануляционной ткани. Воспалительный инфильтрат распространяется до жировой клетчатки. Кроме того, в группе 3 наблюдалось формирование микроабсцессов в ране (рис. 3).

На 9 сутки в контрольной группе наблюдался дефект эпидермиса с гнойно-некротическими изменениями, очагами кровоизлияний и плазморагиями. (рис. 4). Во второй группе животных, обрабатываемых гелем серии ОЧ60, отмечалось формирование зрелой грануляционной ткани в глубоких отделах (рис. 5), очаги продуктивного воспаления с наличием гигантских многоядерных клеток

(рис. 6). На границе с очагом некроза отмечалась молодая грануляционная ткань, в глубоких отделах – зрелая. В краях раны определялся молодой эпидермис, под ним зрелая грануляционная ткань (рис. 7). В группах 3 (использовался гель серии ОЧ30), 6 (использовался гель серии ОС70) и 7 (использовался гель серии ОС30) на 9 сутки морфологические изменения сходны со второй группой, однако гнойно-некротические изменения выражены в большей степени (рис. 8, 9, 10). На 9 сутки в группе 6 более выражены гнойно-некротические изменения по сравнению с группами 2 и 3 (рис. 9).

На 9 сутки в группе животных 4, у которых раны обрабатывались декспантенолом, отмечалось наличие некроза, отсутствует многослой-

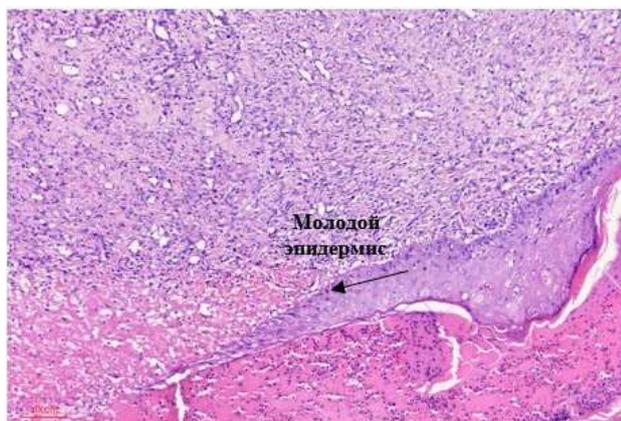


Рисунок 10 – Морфологические изменения дефекта группы 7 на 9 сутки Ув. x10

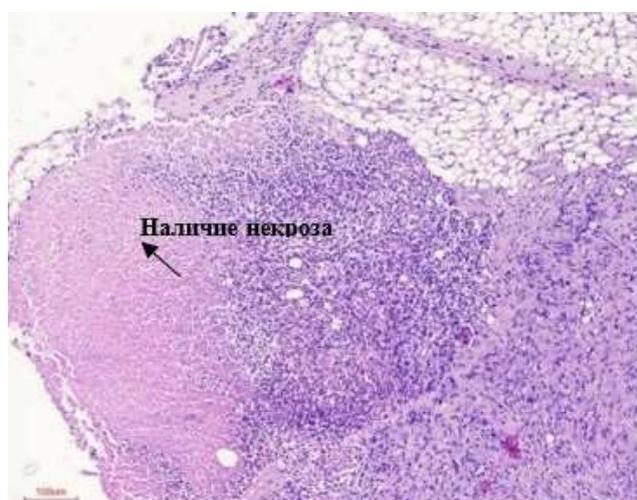


Рисунок 11 – Морфологические изменения дефекта группы 4 на 9 сутки. Ув. x10



Рисунок 12 – Морфологические изменения дефекта группы 5 на 9 сутки. Ув. x10

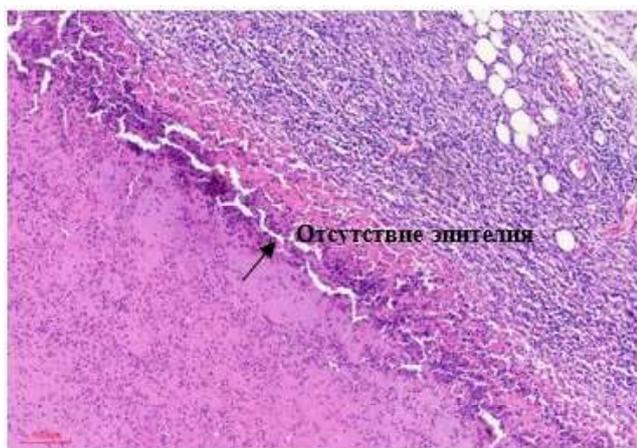


Рисунок 13 – Морфологические изменения дефекта группы 8 (отсутствие эпителизации, гнойно-некротические изменения). Ув. x10

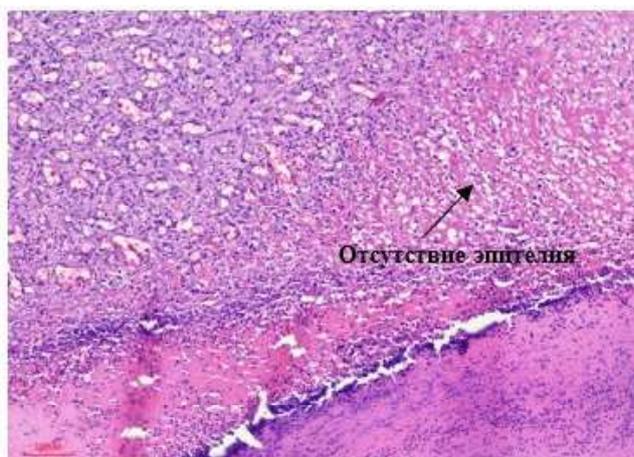


Рисунок 14 – Морфологические изменения дефекта группы 9 на 9 сутки (эпителизация отсутствует, определяются гнойно-некротические изменения). Ув. x10

ный плоский эпителий (рис. 11). В группе 5 (рис. 12) наблюдалось появление эпителизации в краях раны. В группах 8 и 9 эпителизация отсутствовала, определялись гнойно-некротические изменения и формирование молодой грануляционной ткани (рис. 13, 14).

На 13 сутки у животных контрольной группы наблюдался дефект эпидермиса, признаки хронического воспаления с обострением (нейтрофилы и лимфоциты в большом количестве) (рис. 15). В группе 2 многослойный плоский эпителий покрывает грануляционную ткань, что не наблюдалось в контрольной группе 1 (рис. 16, 17). В этот же период эксперимента в ранах третьей группы животных наблюдался процесс эпителизации, но

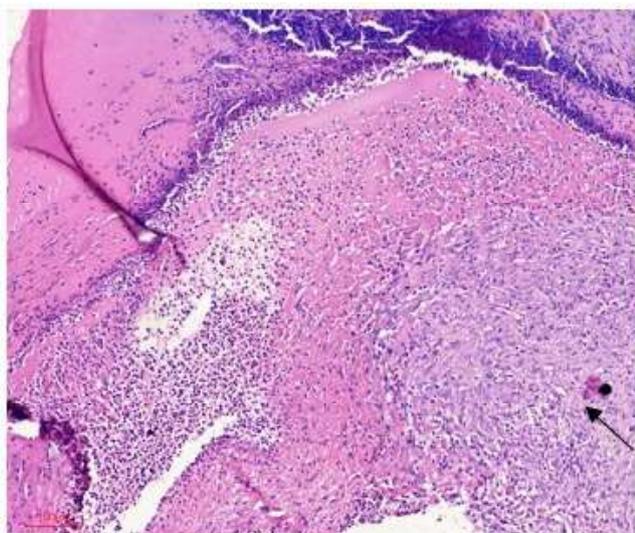


Рисунок 15 – Дефект эпидермиса, признаки хронического воспаления с обострением, нейтрофилы и лимфоциты в большом количестве. Ув. x10

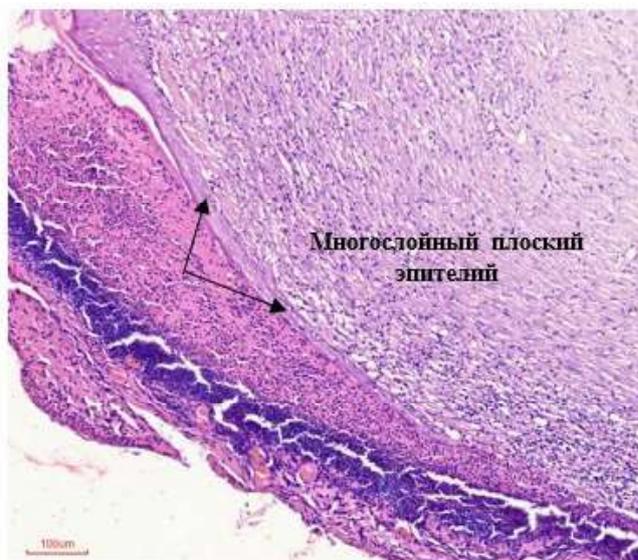


Рисунок 16 – Морфологические изменения дефекта у группы 2 на 13 сутки. Ув. x10

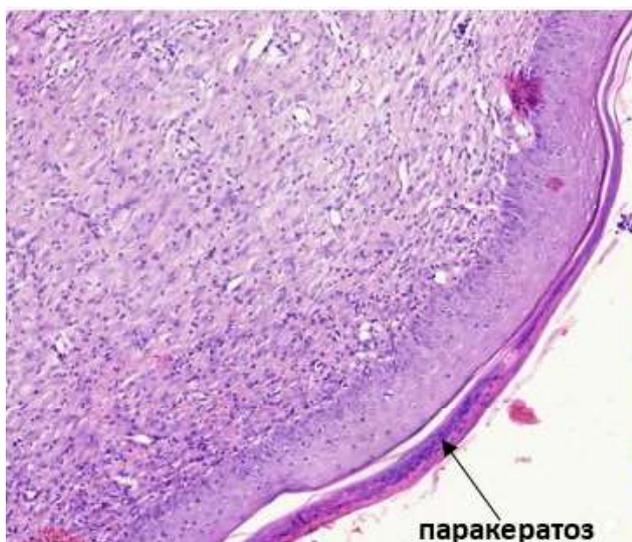


Рисунок 17 – Эпителизация с паракератозом многослойного плоского эпителия. Ув. x10

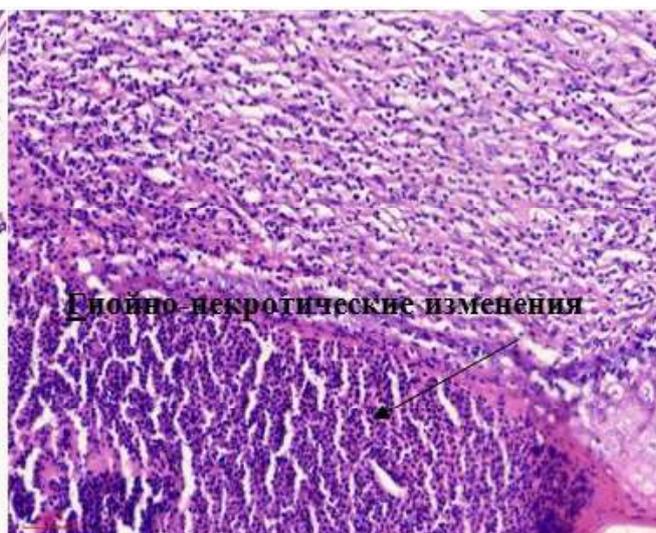


Рисунок 18 – Морфологические изменения дефекта у группы 3 на 13 сутки. Ув. x20

более выражены гнойно-некротические изменения по сравнению со второй группой (рис. 18). Аналогичная картина наблюдалась в ранах, обрабатываемых фитогелями, содержащими настойки на основе листьев ольхи серой (рис. 19, 20).

На 13 сутки в 5 группе животных рана была представлена зрелой грануляционной и фиброзной тканью (формируется рубец). Дефект практически полностью покрыт многослойным плоским эпителием (рис. 21). В 4 группе животных определялись очаги кровоизлияний, грануляционная

ткань разной степени зрелости, что свидетельствовало о замедленных процессах репарации по сравнению с группами 2 и 3 (рис. 22). В группе 8, где раны обрабатывались гелем-плацебо № 5, на 13 сутки грануляционная ткань без эпителизации по сравнению с группой 2, 5 и 6 в эти же сутки (рис. 23). На 13 сутки в ранах животных группы 9, обрабатываемых гелем-плацебо № 6, сохранялись гнойно-некротические изменения, грануляционная ткань была развита слабо, по сравнению с группой 3 и 7 (рис. 24).

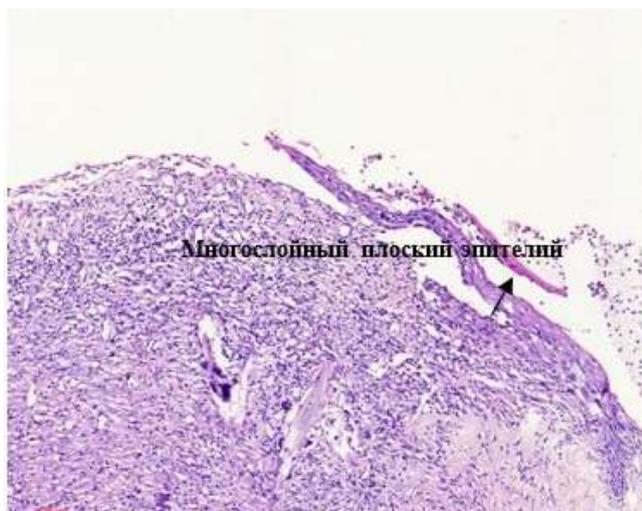


Рисунок 19 – Морфологические изменения дефекта у группы 6 на 13 сутки. Ув. x10

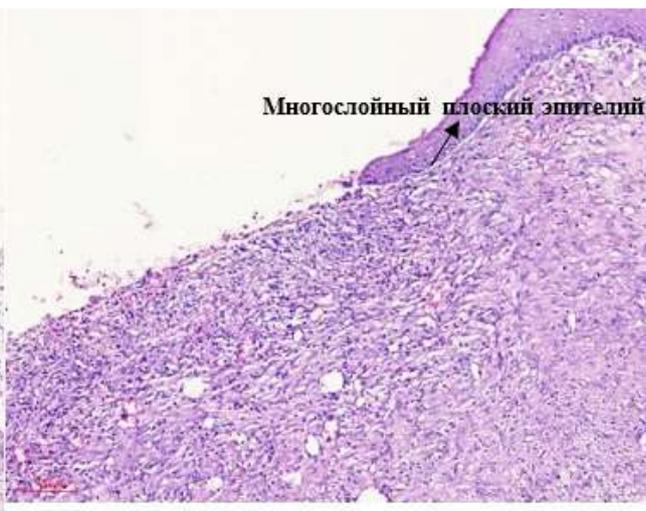


Рисунок 20 - Морфологические изменения дефекта группы 7 на 13 сутки. Ув. x10



Рисунок 21 – Дефект практически полностью покрыт многослойным плоским эпителием. Ув. x10

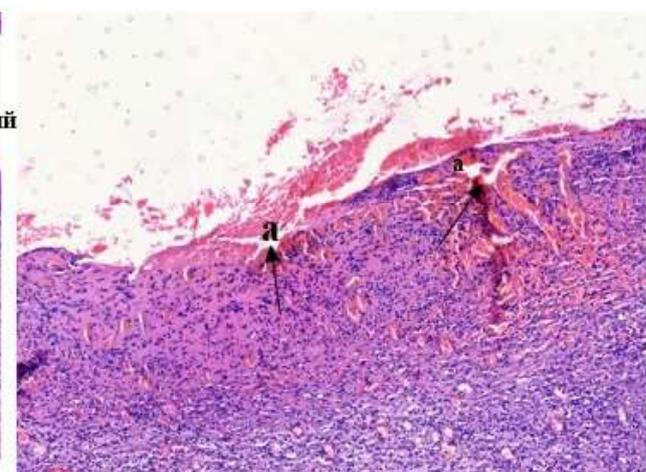


Рисунок 22 – очаги кровоизлияний (а), грануляционная ткань разной степени зрелости. Ув. x10

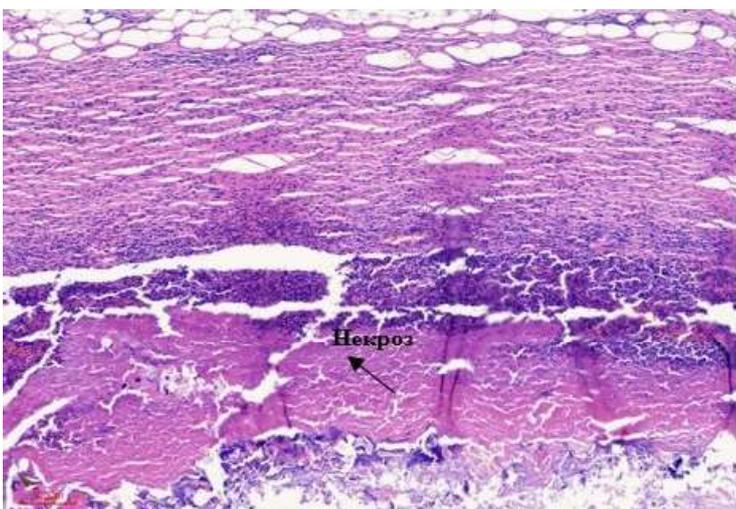


Рисунок 23 – Морфологические изменения у группы 8 на 13 сутки. Ув. x10

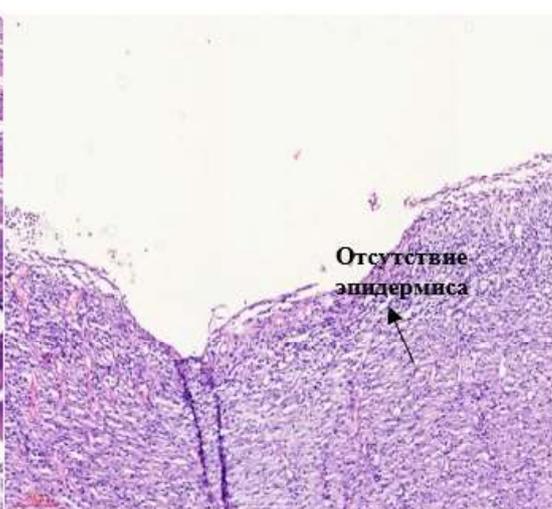


Рисунок 24 – Морфологические изменения группы 9 на 13 сутки. Ув. x10

Заключение

Гистологическое изучение раневого процесса показало, что разработанные гели на основе спиртовых настоек из листьев ольхи черной и серой обладают хорошо выраженным стимулирующим эффектом на пролиферативную и функциональную активность клеток грануляционной ткани, который со временем возрастает. При этом гель на основе 60% спиртовой настойки из листьев ольхи черной проявлял максимальную эффективность по сравнению с остальными фитопрепаратами, морфологически сходные картины наблюдались у животных, обрабатываемых данным гелем и препаратом сравнения – мазью репарэф-2. Морфологическая картина изменений дефектов, обрабатываемых гелями-плацебо, соответствовала изменениям контрольной группы и отличалась от дефектов, обрабатываемых фитогелями и мазью репарэф 2, которые проявляли ранозаживляющее действие.

Литература

1. Гистохимическая характеристика восстановительных процессов при заживлении ран / А. А. Глухов [и др.] // *Фундам. исслед.* 2013. № 7, ч. 1. С. 55–60.
2. Ранозаживляющее действие экстракта зубчатки обыкновенной / А. В. Бодоев [и др.] // *Вестн. Бурятского гос. ун-та. Медицина и фармация.* 2009. № 12. С. 30–32.

References

1. Glukhov AA, Frolov RN, Alekseeva NT, Andreev AA. Histochemical characterization of regenerative processes during wound healing. *Fundam Issled.* 2013;(7 ch 1):55-60. (In Russ.)
2. Bodoev AV, Shantanova LN, Alekseev PV, Ubashev IO. Wound-healing effect of common clove extract. *Vestn Buryatskogo Gos Un-ta Meditsina Farmatsiya.* 2009;(12):30-2. (In Russ.)
3. Kochubey VV, red. Wounds, the wound process: ucheb-metod posobie dlya internov, ordinatorov i prakt vrachei. Krasnodar, RF: KubGMU; 2016. 29 p. (In Russ.)
4. Konstantinova MV, Khaytsev NV, Kravtsova AA, Balashov LD. Major wound healing problems and the use of skin substitutes. *Pediatr.* 2015;6(2):85-95. (In Russ.)
5. Mushkina OV, Kravtsova-Kukhmar NG, Gurina NS, Shakovets NV, Kidyasova TV. Application of phytogel with tincture of black alder leaves in experimental gingivitis. *Vestn VGMU.* 2022;21(3):94-101. (In Russ.)
6. Mushkina V. Effect of wound healing in gels containing tincture of *Alnus glutinosa* (L) leaves. *Clinical*

3. Раны, раневой процесс : учеб.-метод. пособие для интернов, ординаторов и практ. врачей / под общ. ред. В. В. Кочубей. Краснодар : КубГМУ, 2016. 29 с.
4. Основные проблемы заживления ран и использование заменителей кожи / М. В. Константинова [и др.] // *Педиатр.* 2015. Т. 6, № 2. С. 85–95.
5. Применение фитогеля с настойкой листьев ольхи черной при экспериментальном гингивите / О. В. Мушкина [и др.] // *Вестн. ВГМУ.* 2022. Т. 21, № 3. С. 94–101.
6. Mushkina, V. Effect of wound healing in gels containing tincture of *Alnus glutinosa* (L) leaves / V. Mushkina // *Clinical. Phytoscience.* 2021 Jul. Vol. 62, N 7. Art. 62. doi: 10.1186/s40816-021-00299-9
7. Гистологическая техника в патоморфологической лаборатории : учеб.-метод. пособие / М. О. Мавликеев [и др.]. Москва : *Практ. медицина*, 2023. 112 с.
8. Международные рекомендации (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных [Электронный ресурс]. Женева, 1985. Режим доступа: <https://studfile.net/preview/6330457/page:39/>. Дата доступа: 16.08.2024.
9. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях ETC № 123 (Страсбург, 18 марта 1986 г.) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://base.garant.ru/4090914/#friends>. Дата доступа: 16.08.2024.
10. Денисов, С. Д. Требования к научному эксперименту с использованием животных / С. Д. Денисов // *Здравоохранение.* 2001. № 4. С. 40–41.
11. Надлежащая лабораторная практика = Належная лабораторная практика : ТКП 125-2008 (02040). Введ. 2008.05.01. Изд. офиц. Минск : М-во здравоохранения Респ. Беларусь, 2008. 34 с.

Поступила 10.05.2024 г.

Принята в печать 28.08.2024 г.

- Phytoscience. 2021 Jul;62(7):62. doi: 10.1186/s40816-021-00299-9
7. Mavlikeev MO; Kiyasov AP; Deev RV; Chernova ON. Histologic technique in the pathomorphology laboratory: ucheb-metod posobie. Moscow, RF: *Prakt meditsina*; 2023. 112 p. (In Russ.)
8. International recommendations (code of ethics) for conducting biomedical research using animals [Internet]. Geneva, Switzerland; 1985. Available from: <https://studfile.net/preview/6330457/page:39/>. [Accessed 16th August 2024]. (In Russ.)
9. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes ETC No. 123 (Strasbourg, March 18, 1986) [Internet]. Available from: <https://base.garant.ru/4090914/#friends>. [Accessed 16th August 2024]. (In Russ.)
10. Denisov SD. Requirements for scientific experimentation using animals. *Zdravookhranenie.* 2001;(4):40-1. (In Russ.)
11. Good laboratory practice: ТКП 125-2008 (02040). Vved 2008.05.01. Izd ofits. Minsk, RB: М-во zdravookhraniya Rsp Belarus', 2008. 34 p. (In Russ.)

Submitted 10.05.2024

Accepted 28.08.2024

Сведения об авторах:

О.В. Мушкина – к.ф.н., доцент, зав. кафедрой организации фармации, Белорусский государственный медицинский университет, <https://orcid.org/0000-0002-3397-1220>,

e-mail: Olga7081@tut.by – Мушкина Ольга Владимировна;

Н.С. Гурина – д.б.н., профессор, декан фармацевтического факультета, Белорусский государственный медицинский университет;

А.Ю. Крылов – к.м.н., доцент, зав. кафедрой судебной медицины, Институт повышения квалификации и переподготовки кадров Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь.

Information about authors:

O.V. Mushkina – Candidate of Pharmaceutical Sciences, associate professor, head of the Chair of Organization of Pharmacy, Belarusian State Medical University, <https://orcid.org/0000-0002-3397-1220>,

e-mail: Olga7081@tut.by – Olga V. Mushkina;

N.S. Gurina – Doctor of Biological Sciences, professor, dean of the pharmaceutical faculty, Belarusian State Medical University;

A.Yu. Krylov – Candidate of Medical Sciences, associate professor, head of the Chair of Forensic Medicine, the Institute for Advanced Training and Retraining of the Investigative Committee of the Republic of Belarus.