

ОЦЕНКА УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ TLR-9 РЕЦЕПТОРОВ ПРИ РАЗВИТИИ АСЕПТИЧЕСКИХ И ГНОЙНЫХ РАН У КРЫС НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ ПРЕПАРАТА ДЕРИНАТ®

¹Бугримов Д.Ю., ¹Цветикова Л.Н., ¹Остроушко А.П., ²Глухов А.А.,

³Филатов О.Ю., ¹Лядов Д.В., ¹Климович А.А., ³Кашаева О.В.

¹Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко, НИИ экспериментальной биологии и медицины, г. Воронеж;

²Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко, кафедра общей хирургии, г. Воронеж;

³Московский государственный медико-стоматологический университет, кафедра патологической физиологии лечебного факультета

Препарат Деринат® представляет собой натриевую соль ДНК, деполимеризованную ультразвуком до частиц с молекулярной массой 270-500 кДа. Препарат получают из молок осетровых и лососевых рыб [1]. Деринат активирует клеточный и гуморальный иммунитет. Оптимизирует специфические реакции против грибковой, вирусной и бактериальной инфекции. Препарат стимулирует репаративные и регенераторные процессы, нормализует состояние тканей и органов при дистрофиях сосудистого происхождения. Известно, что иммобилизованные фрагменты ДНК молок лососевых (им-ОГН) проявляются в усилении цитотоксической активности естественных киллеров экспериментальных животных. Ранее, в исследовании было установлено, что при добавлении иммобилизованных фрагментов ДНК в культуру перитонеальных макрофагов *in vitro* отмечается дозозависимая стимуляция функциональной активности изучаемых клеток, которая проявляется в повышении продукции оксида азота. Стимулирующее действие (им-ОГН) отменяется при блокировании рецептора TLR-9 (от английского *Toll-like receptor*). Многие исследователи полагают, что данный эффект иммобилизованных фрагментов ДНК опосредуется макрофагальным рецептором TLR-9 [4]

Целью данного исследования явилось исследование уровня экспрессии TLR-9 рецепторов при развитии асептической и гнойной раны у крыс на фоне введения препарата Деринат®, что может послужить описанием основного механизма действия изучаемого иммуностропного вещества.

Моделирование развития асептической и гнойной раны на белых лабораторных крысах, массой 180-200 г проводили по модифицированной методике И.А.Сыченникова [2, 3].

Животным всех групп с асептической раной под наркозом на выбритом от шерсти участке наружной поверхности средней трети бедра, одноразовым медицинским скальпелем производили линейный разрез кожи, подкожной жировой клетчатки, фасции и мышцы длиной 1,0 см. Рану закрывали давящей марлевой асептической повязкой. Введение Дерината® подкожно начинали сразу после моделирования раны в дозе 5 мг/кг массы тела животного. Материал забирали на 1 и 3 день развития патологического состояния. Моделирование гнойных ран проводили по следующей схеме: под наркозом на выбритом от шерсти участке наружной поверхности средней трети бедра, одноразовым медицинским скальпелем производили линейный разрез кожи, подкожной жировой клетчатки, фасции и мышцы длиной 1,0 см. Стенки раны и дно раздавливались зажимом Кохера. В рану вносился марлевый тампон со взвесью суточной культуры *Staphylococcus aureus* в дозе 10^{10} микробных тел в 1 мл физиологического раствора. После этого на кожу накладывали адаптационные швы шелковой нитью размером 1,0. Рану покрывали давящей марлевой асептической повязкой. Для моделирования гнойных ран во всех случаях применялся один и тот же штамм стафилококка. На вторые сутки от начала эксперимента в ранах появлялись признаки воспаления: гиперемия и отечность кожи, просачивание по линии швов гнойного экссудата. На третьи сутки развивалась модель острого гнойного воспаления с обильным гнойным отделяемым. Швы снимали, края раны разводили, удалялся марлевый тампон. Выделялось около 2-3 мл гноя. В результате формировалась гнойная рана, используемая в дальнейшем для исследования влияния препарата Деринат® (вводили препарат подкожно, в дозе 5 мг/кг массы тела животного). Материал забирали на 1 и 3 день после начала лечения. В контрольной группе проводили ежедневные однократные смены асептической повязки. Характер лечебных мероприятий в экспериментальных группах был идентичным.

Для определения уровня экспрессии генов TLR-9 методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на первые и третьи сутки после введения препарата в опытных группах осуществляли забор материала. Выделение нуклеиновых кислот из клеток. Выделение ДНК проводили по известным протоколам [5]. Для выделения РНК использовали метод кислото-фенольной экстракции и RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

ПЦР-РВ проводили по следующей схеме: праймеры и зонды для ПЦР-РВ моделированы в программе Vector NTI 8,0, в соответствии с последовательностями мРНК исследуемых генов (из базы данных GenBank), и синтезированы в фирме Синтол (РФ). Для приготовления ПЦР-смеси в реакциях использовали Hot Start Taq DNA Polymerase (СибЭнзим, РФ), Hot Start Taq DNA Polymerase (Qiagen, Германия), TaqBead HotStart Polymerase (Promega, США), а также наборы «Набор реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I (Буфер Б)» (Синтол, РФ). Для определения

экспрессии гена актина, помимо имеющейся системы, использовали «Набор реактивов для обнаружения и определения кДНК-актина человека» (Синтол, РФ). Реакцию проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя в амплификаторе АНК-32 или АНК-16 (Институт Аналитического Приборостроения РАН, РФ) при следующей программе: 500С – 2 мин., 950С – 10 мин., (56 - 680С – 50 секунд, 950С – 15 секунд) 40 циклов.

Опыты проводили 3-х кратной биологической повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в двух повторностях. Результаты опытов сравнивали с контролем. Для определения достоверности результатов исследований применяли методы вариационной статистики. Полученные данные обрабатывали с использованием статистических критериев. Обсуждаются статистически достоверные различия при $P \leq 0,05$.

Средняя площадь асептических ран перед началом лечения составила $45,01 \pm 0,09$ мм² ($p < 0,05$). Уменьшение площади асептической раны уже на первые сутки наблюдалось в опытной группе крыс, которым вводили Деринат® (уменьшение площади раны на 20,1% по сравнению с контрольной группой). Также, на первый день проведения лечения раны, нами было отмечено уменьшение площади гнойной раны (на 16,0%). К третьему дню проведения лечебных мероприятий наблюдалось увеличение степени уменьшения площади раны на 38,2 и 35,6% соответственно.

Выявлено увеличение уровня экспрессии гена TLR-9 на 20,2 и 30,0% на первые и третьи сутки развития асептической раны, а также на 26,4 и 47,8% на третьи и шестые сутки развития гнойной раны после введения препарата Деринат® по сравнению с показателями в контрольной группе.

Таким образом, мы можем предположить, что изменение экспрессии TLR-9 в сторону повышения способствует заживлению как асептических, но в большей степени гнойных ран – что может являться основным иммуотропным действием изучаемого препарата. Однако гиперэкспрессия данного гена может привести к повышенной выработке провоспалительных цитокинов, оксида азота, вызывающих патологическое повреждение тканей [4]. Поэтому нами было предложено использование иммуномодуляторного препарата Деринат® для лечения асептических и гнойных ран в эксперименте. Очевидно, уменьшение площади асептических и гнойных раны у крыс на фоне введения животным препарата Деринат®, связано с иммуномодуляторным действием данного препарата на уровне взаимодействия иммобилизованных фрагментов ДНК молок лососевых рыб и рецепторов TLR-9.

В дальнейших исследованиях мы планируем более детально подтвердить уже описанный механизм действия препарата.

Литература

1. Применение Дерината в хирургии/ Э.Н. Каплина, В.Н. Чернова. Тверь.: Триада, 2008. – 64с.
2. Кузин М.И., Костюченко Б.М. Раны и раневая инфекция. - М., 1990. - 150 с.
3. Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI веке» РУДН, Москва, 2010г.
4. Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI веке» РУДН, Москва, 2009г.
5. Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI веке» РУДН, Москва, 2008г.
6. Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI веке» РУДН, Москва, 2007г.
7. Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI веке» РУДН, Москва, 2006г.
8. Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI веке» РУДН, Москва, 2005г.
9. Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI веке» РУДН, Москва, 2004г.
10. Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI веке» РУДН, Москва, 2003г.
11. Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI веке» РУДН, Москва, 2002г.
12. Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI веке» РУДН, Москва, 2001г.
13. Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI веке» РУДН, Москва, 1999г.