

И. Н. Большаков, А. Н. Сапожников, А. В. Еремеев, А. К. Кириченко,
А. А. Власов, Д. В. Черданцев, А. В. Каскаев

БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ РАНЕВЫЕ ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДНЫХ ПОЛИМЕРОВ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

I. N. Bolshakov, A. N. Sapozhnikov, A. V. Eremeev, A. K. Kirichenko,
A. A. Vlasov, D. V. Cherdantsev, A. V. Kaskaev

BIODEGRADABLE WOUND COVERINGS ON THE BASIS OF POLYSACCHARIDES POLYMERS

ГОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздравоохранения России, г. Красноярск
ООО «Коллахит», г. Железногорск
Краевой ожоговый центр, г. Красноярск
© Большаков И. Н., Сапожников А. Н., Еремеев А. В., Кириченко А. К.,
Власов А. А., Черданцев Д. В., Каскаев А. В.

Цель работы — дать экспериментальный анализ лечебной эффективности нового класса биodeградируемых раневых покрытий на основе полисахаридных биополимеров с использованием клеточных технологий для реконструкции обширной ожоговой поверхности. Контроль молекулярных маркеров ожоговой поверхности при использовании наноструктурированных полисахаридных комплексов с включением в них хитозана, гепарина, хондроитинсерной кислоты, гиалуроновой кислоты, альгината натрия, сывороточного фактора роста «аджелон» указывает на высокую степень готовности ожоговой поверхности к клеточным технологиям.

Ключевые слова: раневое покрытие класса «коллахит», структурированный хитозан, экспериментальный ожог, маркеры репарации кожи, дермальный эквивалент кожи.

The work purpose is to give the experimental analysis of medical efficiency of a new class biodegradable wound coverings on a basis polysaccharides biopolymers with use of cellular technologies for reconstruction extensive burn surface. The control of molecular markers of burn surfaces at use nano-structural polysaccharides complexes with inclusion in them chitosan, heparin, chondroitin sulfate acid, hyaluronic acid, alginate sodium, growth serum factor «adgelon» specifies a high degree of burn surfaces readiness to cellular technologies.

Key words: wound covering «kollachit», structured chitosan, an experimental burn, skin reparation markers, skin dermal equivalent.

УДК 616.5-001.17-002.3-089.4-092.9:[547.995.12:547.962.9]:677.4-022.532

ВВЕДЕНИЕ

Проблема восстановления обширных раневых дефектов в результате ожога была и остается одной из самых актуальных в современной медицине. В настоящее время число обожженных пациентов за год составляет в РФ в среднем 120 тыс. человек (данные Федеральной службы государственной статистики за 2008 год). В результате существенно возросла потребность в коже или ее искусственных эквивалентах, что стимулировало многочисленные исследования в этом направлении [4, 6–10, 14, 16, 17, 19, 20, 24, 26]. Определенный прогресс в данной области

был достигнут в создании способов и средств, ускоряющих сроки заживления ран благодаря управляемым процессам самосборки основного компонента соединительной ткани — коллагена [13, 18, 21, 25]. В настоящее время стало очевидным, что наилучшие результаты в оптимизации процессов реорганизации тканевых дефектов позволяет получить использование природных полимеров, способных осуществлять контроль синтеза и ориентации волокнистых структур [11, 23]. Комбинация таких полимеров с мукополисахаридами и факторами роста дает возможность контролировать образование грануляций, эпителизацию кожных дефектов, получать рубцовую



№№	Субъект Российской Федерации	Наименование проекта	Ответственные исполнители	Сроки реализации
13.	Иркутская область	Создание центра туризма "Гора Соболиная" в рамках особой экономической зоны туристско-рекреационного типа	Минэкономразвития России, Министртуризм России, правительство Иркутской области	2010 - 2014 годы
Иновационная сфера				
14.	Новосибирская область	Создание технологической инфраструктуры технопарка Новосибирского академгородка	Минкомсвязь России, Минобрнауки России, СО РАН, правительство Новосибирской области	2009 - 2011 годы
15.	Красноярского края	Развитие коллаген-хитозановых нанокомплексов (г. Железногорск)	Минпромторг России, ГК "Роснанотех", правительство Красноярского края	2010 - 2011 годы

Рис. 1. а — Постановление Правительства РФ № 3411п-П16 от 05.07.2010 г. о перечне первоочередных инвестиционных проектов в СФО;

б — Первоочередной инвестиционный проект в СФО «Развитие коллаген-хитозановых нанокомплексов», г. Железногорск

ткань, мало отличающуюся от окружающей здоровой кожи.

Переход от биологически инертных полимеров (полигликолиды, полилактиды) к биологически активным системам (полисахаридам), которые позволяют иммобилизовать факторы роста, регуляции пролиферации клеток, открывает широкие возможности регенерации не только кожных покровов, но и других жизненно важных клеточных систем организма человека. Такими полимерами, из которых возможно изготовление деградирующих в организме пациента материалов, являются природные полисахариды — хитин и его дезацетилированное производное — хитозан. Природные полисахариды (хитин, хитозан) резорбируются. Эти природные полисахариды являются перспективными материалами при создании рассасывающихся матриц для культивирования фибробластов и кератиноцитов. Они обеспечивают сохранность внеклеточного матрикса и нужную ориентацию клеток при переносе трансплантата на раневую поверхность. Можно полагать, что матричные материалы на основе этих природных полимеров окажутся более перспективными, чем материалы на основе коллагена или рассасывающихся синтетических полимеров при культивировании и трансплантации клеток кожи человека.

Предлагаемые в настоящей работе раневые покрытия входят в инновационный проект (№ 15), который включен в перечень первоочередных инвестиционных проектов в Сибирском

Федеральном округе в рамках Программы развития инновационной сферы Сибири, утвержденной Председателем правительства Российской Федерации 5 июля 2010 г. (рис. 1).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

ХИТОЗАНОВЫЙ ПОЛИМЕР И ЕГО СТРУКТУРИРОВАНИЕ

Изделие медицинского назначения класса «Коллахит» является продуктом наукоемких технологий, в основу которых заложено структурирование полисахаридных комплексов с целью практического применения в сфере комбустиологии, трансплантологии и создания искусственных органов, содержащих в своих основах биодеградируемые полимерные микрочастицы с прикрепленными к ним целевыми молекулами. Отдельные фрагменты структурированного хитозана представляют собой систему переноса ингредиентов для обмена информацией с материнской тканью, служат непосредственным строительным материалом для быстрого восстановления утраченных тканей. Такая система переноса гарантирует сохранность биологической активности прикрепленных целевых молекул в агрессивных биологических жидкостях организма, является высокоаффинной по отношению к соматическим клеткам при доставке к ним информации для их размножения и дифференцировки, является высокоаффинной по отношению к патогенным

бактериальным клеткам с целью прекращения их жизнедеятельности. Возможность культивирования на таких подложках эмбриональных клеток, включая стволовые с высокими пролиферативными и дифференцировочными потенциями, обеспечивает имплантацию эмбриональной клеточной массы на указанные подложки в присутствии полного молекулярного микроокружения, находящегося в микросоставляющей раневого покрытия, инициирующего строго направленную организацию искусственного дермально-эпидермального эквивалента кожи, позволяет уже через две недели культивирования получать продукт, пригодный для прямой трансплантации на ожоговую поверхность. Разработка новой номенклатуры клеточных матриц для получения нового класса коммерческих продуктов (например, дермально-эпидермального эквивалента кожи с репрограммированным клеточным геномом под конкретного пациента) является социально значимой научной проблемой. В настоящей работе использована авторская технология структурирования хитозана молекулярной массы 690 кДа со степенью дезацетилирования 98 %. Первичным сырьем служили клешни свежемороженого камчатского краба, из хитинового покрова которых был получен хитозан высокой степени очистки. Следует отметить, что молекулярная масса и размер частиц хитозана существенно зависят от pH среды.

Следует отметить, что эффективность молекул хитозана зависит также от зарядового состояния биополимера. В кислых средах хитозан принимает катионную форму, что способствует электростатическому связыванию с анионными компонентами среды [15]. Эти события разыгрываются на каждом мономерном звене хитозана, размеры которого не превышают 1 нм, что во много раз меньше размеров частиц самого хитозана. В зависимости от плотности упаковки в частицах полимера могут формироваться активные центры, размеры которых значительно меньше самой молекулы. Таким образом, на одной частице имеется несколько функционально значимых сайтов разного масштаба.

Масштаб размеров молекул является принципиальным фактором для медицинского применения хитозана. Благодаря очень малым размерам обеспечивается преодоление ферментативного или адсорбционного барьеров, а также пролонгированное действие лекарственных препаратов. Наноразмерные частицы полимера обеспечивают преодоление ферментативного или адсорбционного барьеров, а также пролонгированное

действие лекарственных препаратов. Авторы настоящей работы провели последовательный химический синтез гелей на основе высоко дезацетилированного хитозана с присоединением к фрагментам жесткой цепи в положении C₂ пиранозного кольца мономерного звена глюкозамина через аминогруппу (NH₂)⁺ молекул аскорбиновой кислоты. Таким образом, при дополнительном протонировании аминогруппы с образованием (NH₃)⁺ и увеличении положительного заряда молекулы было осуществлено последовательное присоединение молекул гепарина, хондроитинсерной и гиалуроновой кислот, низкомолекулярного сывороточного фактора роста крупного рогатого скота «адгелон» (ИНЭ-ОС им. А. Н. Несмеянова РАН, г. Москва) при строго заданных значениях температуры, концентрации, pH и молекулярной массы (изделие медицинского назначения «Бол-хит»). Такой химический синтез привел к образованию системы переноса компонентов соединительной ткани размерами в поперечнике порядка долей 1 нанометра, усиленно потребляемых при строительстве в проблемной зоне ткани при воспалительных-дегенеративных процессах.

Для создания раневых покрытий с привлечением структурированного хитозана предпочтительным является введение ингредиентов полисахаридной структуры. К таковым относится альгинат натрия, по сути дела, выполняющий такую же роль инициатора ионного желирования, как и триполифосфат натрия.

Изделие «Бол-хит» в виде лиофилизированной пористой массы содержит аскорбат хитозана с молекулярной массой 700 кДа и степенью дезацетилирования 98 %, солевые формы хондроитинсерной, гиалуроновой кислот и гепарин. Структурирование хитозана с существенным уменьшением размеров молекул обусловлено наличием именно таких анионных полисахаридов как гепарин, хондроитинсульфат, гиалуронат.

ПОЛУЧЕНИЕ КОЛЛАГЕН-ХИТОЗАНОВОГО РАНЕВОГО ПОКРЫТИЯ

Ковалентное соединение полисахаридной гелевой конструкции «Бол-хит» с бычьим коллагеновым гелем в соотношении 1:3, лиофильное высушивание глубоко замороженных образцов, упаковка и стерилизация электронно-лучевым способом позволило получить раневое покрытие «Коллахит-Бол», пригодное не только в



Рис. 2. Маркировка готовой продукции



Рис. 3. Внешний вид коллаген-хитозановой матрицы

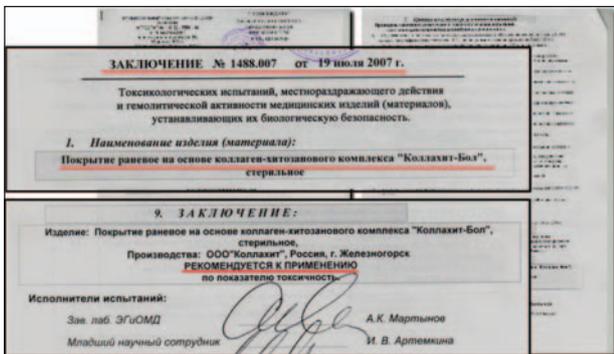


Рис. 4. Заключение лабораторно-испытательного центра НИИ ФХМ МЗ РФ о применении раневого покрытия «Коллахит-Бол» по показателю токсичность

качестве бесклеточного раневого покрытия для реконструкции ожоговой поверхности, но и для культивирования и дифференцировки *in vitro* эмбриональных клеток, включая пул стволовых, с формированием дермально-эпидермального эквивалента кожи (рис. 2, 3).

Безопасность полиионной конструкции при контакте с биологическими тканями была подтверждена на базе испытательного лабораторного центра НИИ ФХМ МЗ РФ (аттестат № ФС 02-ПТИ-04 от 10.03.2004 г., регистрация в реестре ФС 16.08.2004 г.) проведены санитарно-химические и токсикологические испытания продуктов «Бол-хит» — протокол № 1612.007 от 13.08.2007 г.; «Коллахит-Бол» — протокол № 1488.007 от 19.07.2007 г.) (рис. 4).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЖоговая ТРАВМА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ ТИПА «КОЛЛАХИТ» ДЛЯ ЕЕ ЛЕЧЕНИЯ

Исследование заключалось в изучении процессов репарации на модельной ожоговой ране животных с помощью известных методов регистрации динамики заживления. Термический ожог кожи IIIБ степени моделировали с помощью разработанного способа [1] на 94 крысах самцах популяции Wistar массой 180–220 г. После депиляции в паравертебральной области спины под эфирным наркозом создавали контактный термический ожог медной пластинкой с силой в 1,255 н, нагретой до 220 °С. Время экспозиции пластины составило 14 сек, с глубиной ожога IIIБ степени. День нанесения травмы животным считали нулевым. Для вычисления процентного соотношения ожоговой поверхности к общей площади тела у крыс использовалась формула, предложенная Lee (1929), в модификации формулы Мее-Рубнера:

$$S = K \times W^{0,60},$$

где S — поверхность тела в квадратных сантиметрах; K — коэффициент, равный 12,54; W — вес животного в граммах.

Площадь ожоговой раны составляла 26 см² (9–10 % от общей поверхности кожи крысы).

На 2-й день на всех этапах исследования после механического удаления раневого струпа [3] и стандартного туалета ожоговых ран с использованием растворов антисептиков в условиях асептики извлекались из стерильных бумажных

пакетов раневые покрытия и моделировали их по контуру раны. Контрольные и опытные покрытия наносили на рану, прижимали ко дну и фиксировали по краю с помощью шовного материала, марлевого бинта и пластыря. Покрытие выступало за края раны на 0,2–0,5 см.

Оценку результатов проводили на основе динамического визуального, планиметрического, гистологического, иммуногистохимического анализов состояния ожоговой поверхности. Контрольные точки анализа репарации ожоговой поверхности: 5, 7, 10, 13, 15, 16, 20, 26 и 30 суток с момента травмы. Раневые покрытия обновляли по мере их биодеградации. Для расчета суточного уменьшения заживления площади раны использовали формулу, предложенную Л. Н. Поповой (1942):

$$S = (S - S_n) \times 100 / S \times t,$$

где S — величина площади раны при предшествующем измерении; S_n — величина площади раны в момент очередного контроля; t — число дней между первым и последующим измерением.

Партии раневых покрытий «Коллахит-Г» и «Коллахит-Бол» произведены в ООО «Коллахит» г. Железногорска Красноярского края (ген. директор предприятия А. Н. Сапожников).

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ОБШИРНОЙ ОЖГОВОЙ РАНЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ КОЛЛАГЕН-ХИТОЗАНОВЫХ КОНСТРУКЦИЙ

Для проведения морфологического анализа предварительно производилась эксцизия ожоговой поверхности с последующей фиксацией препаратов в 10% нейтральном растворе забуференного формалина. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по Ван-Гизону. В микропрепаратах оценивали линейные размеры толщины эпидермиса и его слоев, толщины струпа и слоя грануляционной ткани. С помощью сетки со 130 равноудаленными точками в дне раны, исключая струп, в процентах определяли удельную площадь, занимаемую полиморфно-ядерными лейкоцитами (ПЯЛ), лимфоцитами, макрофагами, плазматическими клетками, фиброцитами, фибробластами, волокнистыми структурами, сосудами. Иммуногистохимические реакции проводились по стандартному

стрептавидин — биотин — пероксидазному методу с использованием моноклональных и поликлональных антител («Novocastra», Великобритания) [22] к трансформирующему фактору роста β -1 (TGF- β -1) для оценки фиброгенных факторов, к кластеру дифференцировки макрофагов (CD68⁺) для характеристики моноцитарно-макрофагальной популяции клеток воспалительного инфильтрата, к фактору пролиферативной активности клеток (Ki-67) для оценки пролиферативной способности клеточных элементов ожоговой раны, к металлопротеазам (MMP-2, MMP-9) для оценки ремоделирования внеклеточного матрикса, к коллагену IV типа.

Морфометрия со статистической обработкой полученных данных проводилась при помощи светового микроскопа «Leica DMLB» и анализатора изображения «Q550IW», снабженного программой «Leica Qwin» для статистической обработки. Полученные данные подвергались анализу методом вариационной статистики с применением t -критерия Стьюдента с пороговым значением $p < 0,05$.

ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ АЛЛОФИБРОБЛАСТЫ В СОСТАВЕ БИОПОЛИМЕРНОЙ ГУБКИ

Исследование осуществлялось в несколько этапов: получение фетальных фибробластов, их культивирование, трансплантация фибробластов на раневое покрытие «Коллахит-Бол», оценка цитотоксического действия покрытия на клетки, аппликация полученного дермального эквивалента кожи и покрытия «Коллахит-Бол» на раневую поверхность в опытных группах животных, покрытий «Коллахит-Бол» с кондиционированной средой, «Коллахит-Г» и марлевых салфеток (без лечения) на раневую поверхность в контрольных группах, наблюдение и анализ изучаемых параметров в соответствии с основными направлениями исследования. Для получения эмбриональных фибробластов использовали фетусы крыс популяции Wistar (7–10 день беременности). Выделенные фетусы помещали в фосфатно-солевой буфер Дульбекко, содержащий антибиотики пенициллин+стрептомицин (100 мкг/мл), трижды отмывали. Затем переносили в среду ДМЕМ, где проводили отсечение кожных лоскутов. Далее материал переносили в раствор, содержащий трипсин и ЭДТА на фосфатно-солевом растворе, измельчали и культивировали 30 минут в термостате при +37 °С.

После инкубации пробы центрифугировали 5 минут при 1000 об/мин. Осадок переносили в полную среду ДМЕМ, содержащую 10% ЭТС (эмбриональной телячьей сыворотки), L-глутамин (1 мМ), стрептомицин+пенициллин (100 мкг/мл), и пересаживали в культуральные матрасы (NuClone). Для опытов использовалась культура 2–3-го пассажа. В экспериментах по исследованию влияния кондиционированной клетками среды проводился сбор среды на различных сроках и ее замораживание у культур, не достигших конfluence. Клетки снимались раствором Версена, по 4 мл взвеси рассеивались на коллаген-хитозановые матрицы (1 мл суспензии содержал 6×10^4 клеток), предварительно забуференные бикарбонатом, а затем использовались для трансплантации экспериментальным крысам. Для оценки степени цитотоксического потенциала исследуемых раневых покрытий осуществляли регистрацию программированной клеточной гибели фибробластов после культивирования на матрице. Для этого часть крысиных фибробластов снимали с флаконов 0,25% трипсином на фосфатном буфере Дульбекко и через 24, 48 и 72 часа, а также более длительный срок в клетках определялись признаки апоптоза с помощью Hoechst 33342 и Propidium iodide на микроскопе Olympus BX51 [5], микроскопической визуализации блеббинга и системы Annexin V-FITC на микроскопе «ЛЮМАМ» с использованием фазово-контрастной насадки с увеличением $\times 450$. Выявление апоптотических клеток осуществляется благодаря связыванию между annexin V и фосфатидилсеринем [12].

Статистический анализ и обработка результатов выполнена на персональном компьютере с помощью комплекса прикладных и программных средств, используя критерий U Вилкоксона-Манна-Уитни и t-критерий Стьюдента [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование в эксперименте на крысах коллаген-хитозанового раневого покрытия «Коллахит-Бол» с трансплантированными аллогенными эмбриональными фибробластами существенно ускорило заживление ожоговой раны III-Б степени. Так, уже на 7-е сутки наблюдения площадь раны составляет $20,3 \pm 0,36$ см². На 7-е сутки в контроле, где применялось пропитанное кондиционированной средой ДМЕМ биоматрица «Коллахит-Бол», площадь ожоговой раны составляла $22,9 \pm 0,39$ см² ($p < 0,05$). На 26-е сутки в опытной группе животных рана значительно меньше по площади, чем в предыдущий срок наблюдения, и составляет $6,8 \pm 0,46$ см² ($p < 0,05$). Рана — в стадии реорганизации рубца. На 26-е сутки эксперимента в контрольной группе животных, где применялось покрытие «Коллахит-Бол» и кондиционированная среда, раневая поверхность на всем протяжении заполнена струпом. Заживление раны происходит медленнее, чем в опыте, о чем свидетельствует ее площадь ($11,9 \pm 0,43$ см²) (рис. 5).

Гистологический анализ показывает, что на 16-е сутки эксперимента в контрольной ране наблюдается вал из полиморфноядерных лейкоцитов, ограничивающих струп от раневой поверхности. Значение толщины последнего больше, чем в ранах опытной серии — $193,26 \pm 8,83$ мкм против $58,68 \pm 5,39$ мкм ($p < 0,05$). Имеет место инфильтрация раны ПЯЛ. Развита макрофагальная реакция. В краях ожоговой раны опытной серии животных с применением коллаген-хитозанового комплекса «Коллахит-Бол» отмечается активная пролиферация эпидермиса, что выражается в большей величине слоев базальных и шиповатых клеток эпидермиса — $54,56 \pm 0,17$ мкм и $91,98 \pm 1,69$ мкм против



Рис. 5. а, б — Вид раны на 26-е сутки после ожога III-Б степени с применением дермального эквивалента кожи (а) и покрытия «Коллахит-Бол» с кондиционированной средой (б)

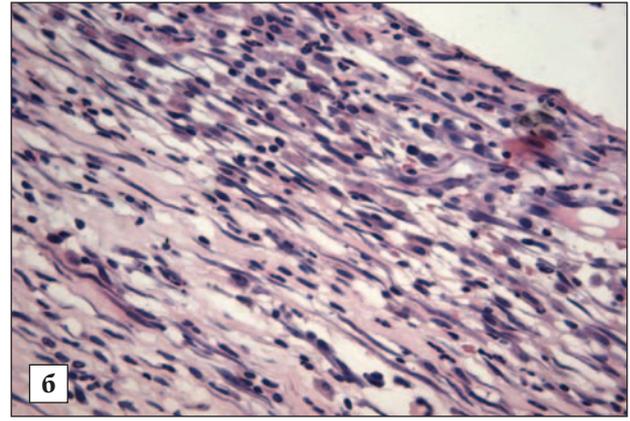
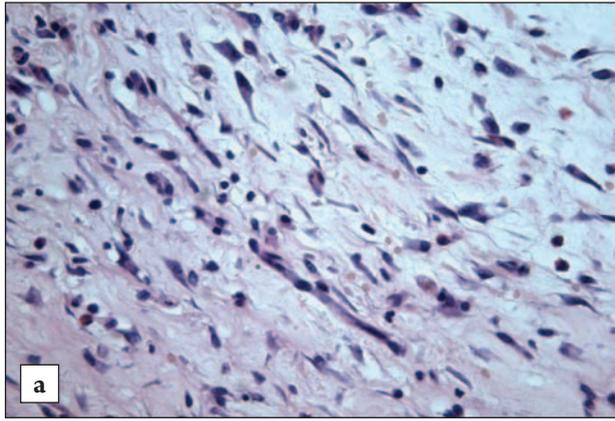


Рис. 6. а — дно раны на 16-е сутки после нанесения ожога III-Б степени с применением покрытий «Коллахит-Бол». Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100$; **б** — дно раны на 16-е сутки после нанесения ожога III-Б степени с применением покрытий «Коллахит-Г». Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100$

41,45 \pm 0,96 мкм и 65,3 \pm 1,27 мкм в контроле соответственно ($p < 0,05$). Ограничительный вал из ПЯЛ отсутствует. Репарация сопровождается более активным развитием в дне раны грануляционной и волокнистой соединительной ткани, о чем свидетельствует большее значение их толщины — 605,67 \pm 5,19 и 699,86 \pm 15,59 мкм по сравнению с контролем — 357,03 \pm 2,31 ($p < 0,01$) и 473,12 \pm 9,31 мкм ($p < 0,05$) соответственно. Имеет место полиморфно-клеточная инфильтрация раны. На дне раневой поверхности отсутствует микробная флора. Хорошо развита макрофагальная реакция (рис. 6, табл. 1, 2).

На 20-е сутки эксперимента раны опытной и контрольной групп на всем протяжении покрывает струп с участками грануляции до 6 мм в диаметре. По всему периметру раны — розовая кайма шириной до 4 мм. Тем не менее, заживление ран в обеих группах различно, в результате которого значительно отличаются их площади, а именно, в опыте 14,8 \pm 0,28 см² и 16,7 \pm 0,4 см² в контроле ($p < 0,05$). На 20-е сутки в ране после применения раневого покрытия «Коллахит-Бол» явно преобладает продуктивная тканевая реакция, развитие которой отражается на величине слоя грануляционной и волокнистой соединительной тканей ($p < 0,01$). Активная пролиферация краев эпидермиса подтверждается более высоким значением как базального (45,23 \pm 1,02 мкм, $p < 0,01$), так шиповатого слоев (88,49 \pm 1,08 мкм, $p < 0,05$), по сравнению с контролем — 20,37 \pm 0,84 мкм и 74,96 \pm 0,66 мкм, соответственно. Более быстрой смене фаз заживления способствует меньшее значение толщины струпа, величина которого составляет 150,63 \pm 4,93 мкм в отличие от

раны в контроле — 227,71 \pm 4,03 мкм ($p < 0,05$). В контрольной ране наряду с воспалительной инфильтрацией, наблюдается развитие грануляционной ткани с исходом в склероз, сопровождающееся меньшим значением ее толщины 423,55 \pm 10,79 мкм по сравнению с раной в опытной группе животных — 664,41 \pm 15,99 мкм ($p < 0,01$) (табл. 1, 2).

На 30-е сутки в опытной группе животных рану площадью 8,1 \pm 0,49 см², достоверно меньшую контрольной — 10,8 \pm 1,7 см² ($p < 0,05$), закрывает струп. По периметру ран обеих групп развитие краевой эпителизации в виде розовой каймы шириной до 5 мм. В ранах опытной серии животных при морфологическом исследовании явно преобладает продуктивная тканевая реакция. Наблюдается большее значение толщины волокнисто-соединительной ткани по сравнению с контролем — 525,06 \pm 10,43 мкм против 367,95 \pm 8,12 мкм ($p < 0,05$). Напротив значение грануляционной ткани в ранах опытной серии (412,37 \pm 4,25 мкм) меньше, чем в ранах контрольной (501,82 \pm 6,76) ($p < 0,05$). В контроле отмечается персистенция экссудативного воспаления, которое обуславливает увеличение удельного объема полиморфно-ядерных лейкоцитов до 6,15 \pm 0,5% по сравнению со значениями в опытной группе — 1,54 \pm 0,23 ($p < 0,05$) и менее активное развитие волокнисто-соединительной ткани. Доказательством является превосходство в образовании волокнистых структур и фиброцитов в опытных ранах, чем в контрольных ($p < 0,01$) (табл. 1, 2).

Иммуногистохимический анализ ожоговой поверхности указывает, что на 16-е сутки в обеих

Таблица 1

Морфометрические данные ран крыс после ожога III-B степени на разных сроках заживления после применения раневых покрытий «Коллахит-Бол» и «Коллахит-Г»

	Опыт 5 сутки	Контроль 5 сутки	Опыт 10 сутки	Контроль 10 сутки	Опыт 15 сутки	Контроль 15 сутки	Опыт 20 сутки	Контроль 20 сутки	Опыт 30 сутки	Контроль 30 сутки
1 Толщина эпидермиса на его границе (мкм)	136,19±3,08	128,36±7,29	175,01±2,89*	133,05±1,81	180,18±2,31	151,29±2,26	166,3±3,15	130,01±6,58	56,28±1,22	52,64±0,75
Базальный	34,53±1,22	33,87±1,95	69,62±0,32**	46,53±0,25	55,88±1,61*	28,95±1,62	45,23±1,02**	20,37±0,84	14,29±0,5	13,25±0,48
Шиповатый	72,69±2,18	86,41±5,28	75,06±1,08*	59,78±0,73	93,3±1,64	86,97±1,29	88,49±1,08*	74,96±0,66	22,42±0,67	20,73±0,46
2 Толщина струпа (мкм)	259,11±4,5**	175,44±3,17	212,1±6,04*	285,83±1,57	152,75±2,91*	213,49±4,23	150,63±4,93*	227,71±4,03	65,61±3,11**	175,15±6,35
3 Толщина слоя грануляционной ткани (мкм)	—	—	565,04±15,18**	286,15±2,81	631,77±11,89**	330,11±12,52	664,41±17,08*	423,55±10,79	412,37±4,25*	501,82±6,76
4 Толщина волокнисто-соединительной ткани (мкм)	—	—	517,34±4,99	443,46±5,07	514,22±12,66*	325,75±9,55	518,5±5,99**	324,07±8,75	525,06±10,43*	367,95±8,12
5 Дно раны (%)	—	—	16,15±0,47	15,38±0,68	2,16±0,34	2,31±0,4	1,54±0,44	3,08±0,33	1,54±0,23*	6,15±0,5
Фиброциты и волокнистые структуры	—	—	20,41±0,75	15,38±0,44	33,85±2,24	26,15±0,79	39,23±0,78	35,38±0,74	52,31±0,65**	38,46±0,6

Таблица 2

	Опыт 7 сутки	Контроль 7 сутки	Опыт 13 сутки	Контроль 13 сутки	Опыт 16 сутки	Контроль 16 сутки
1 Толщина эпидермиса на его границе (мкм)	259,91±5,22*	163,41±4,85	191,49±1,28**	157,99±2,32	175,85±2,90	143,07±2,48
Базальный	38,58±0,36**	23,13±0,95	50,43±1,15*	32,88±1,11	54,56±0,17*	41,45±0,96
Шиповатый	185,53±2,73**	105,63±1,41	97,92±1,7*	72,79±1,32	91,98±1,69*	65,3±1,27
2 Толщина струпа (мкм)	292,32±2,54*	255,07±2,08	327,23±1,21*	385,73±5,14	58,68±5,39*	193,26±8,83
3 Толщина слоя грануляционной ткани (мкм)	147,4±1,75*	96,25±3,16	406,01±6,78**	265,05±2,18	605,67±5,19**	357,03±2,31
4 Толщина волокнисто-соединительной ткани (мкм)	607,14±4,5**	512,76±3,6	796,83±21,20**	397,68±13,96	699,86±15,59*	473,12±9,31
5 Дно раны (%)	—	—	—	—	—	—
Макрофаги, плазматические клетки	13,08±0,55*	5,38±0,63	5,38±0,42	11,54±0,7	15,38±0,6	15,38±0,68
Фиброциты и волокнистые структуры	17,69±0,71	16,26±0,66	32,31±0,96*	23,08±0,62	33,85±2,24	26,15±0,79

Примечание: Достигнутый уровень значимости при сравнении площадей ожоговых ран после местного лечения коллаген-хитозановыми покрытиями «Коллахит-Бол» (опыт) и «Коллахит-Г» (контроль) * — (P<0,05); ** — (P<0,01).

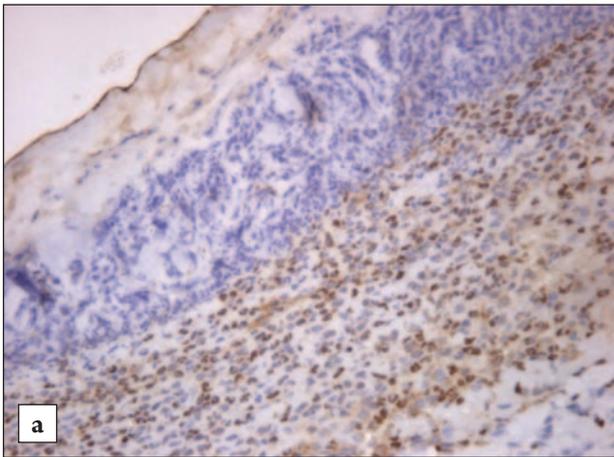


Рис. 7. а — высокий уровень экспрессии Ki-67 в глубоком слое ПЯЛ на 16-е сутки с применением «Коллахит-Бол». Ув. $\times 400$; б — высокий уровень экспрессии Ki-67 в грануляционной ткани на 16-е сутки с применением «Коллахит-Бол». Ув. $\times 100$

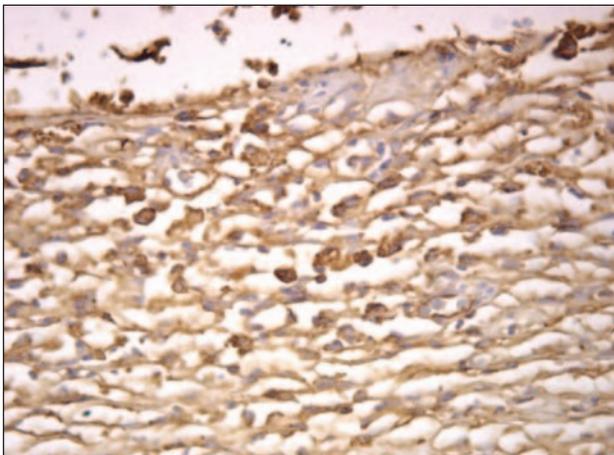


Рис. 8. Высокий уровень экспрессии CD68+ в клетках моноцитарно-макрофагального ряда в дне раны. Ув. $\times 400$

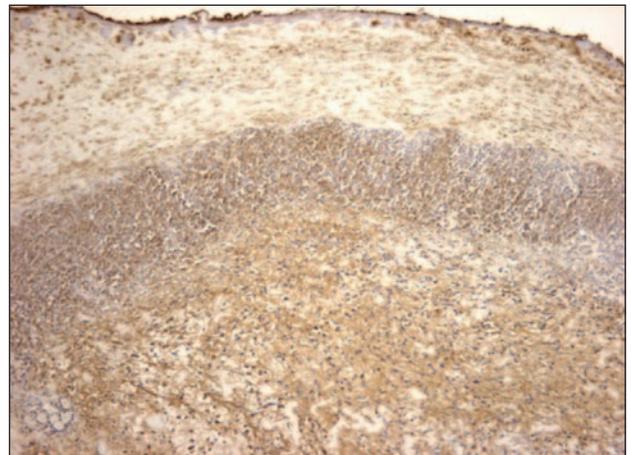


Рис. 9. Высокий уровень экспрессии MMP-9 в дне раны. Контроль. Ув. $\times 100$

группах возрастает экспрессия Ki-67 в макрофагах и эндотелии сосудов в дне раны, что обусловлено необходимостью фагоцитоза погибших тканевых компонентов, активацией иммунных реакций, развитием грануляционной и соединительной ткани. В опыте экспрессия Ki-67 фибробластами дна раны в этот срок выше, чем в контроле и составляет $2,8 \pm 0,08$ баллов ($p < 0,05$). Процесс указывает на интенсивную реконструкцию основных волокнистых структур внеклеточного матрикса. В контроле же на 16-е сутки в фибробластах, фиброцитах реакция оценивается как умеренная, снижаясь до минимальной по направлению к центру раны, и составляет $2,3 \pm 0,08$ баллов. На 16-е сутки в опыте происходит большее накопление CD68+ клеток во всех слоях ожоговой раны, опережающее контроль, что может

означать ранний переход в продуктивную фазу воспалительного процесса ($p < 0,05$). В опыте отмечается явное угнетение экспрессии MMP-9 в строме и фибробластах грануляционной ткани и соединительной ткани в дне раны. Представляется, что раннее снижение активности деструктивных изменений, вызываемых MMP-9, указывает на ускорение репаративных процессов. Выраженность экспрессии маркера MMP-2 и его локализация в обеих группах до 16-х суток не изменяется. Исключение составляет слой макрофагов в дне раны, граничащий с валом полиморфно-ядерных лейкоцитов, где экспрессия маркера достоверно выше, чем в контрольной группе. Вероятно, эта активность связана с резорбцией компонентов применяемого покрытия. В опыте в моноцитах и макрофагах дна раны

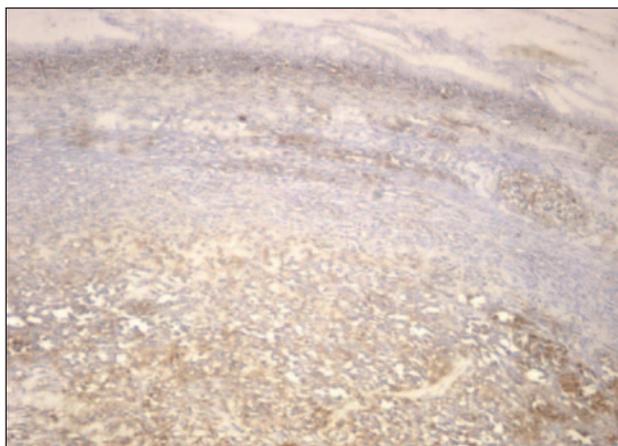


Рис. 10. Слабая активность MMP-9 в дне раны. Опыт. Ув. $\times 100$

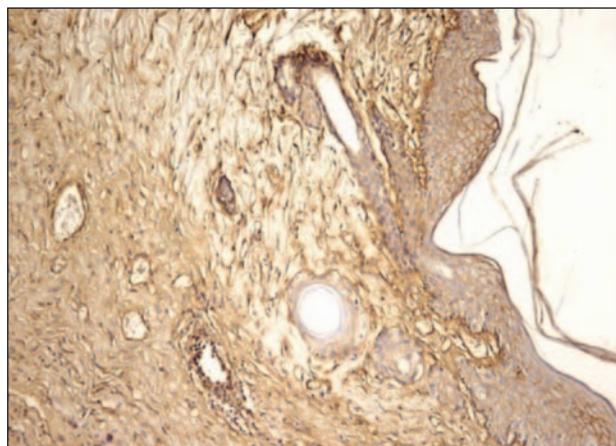


Рис. 11. Коллаген IV типа в базальных мембранах эпидермиса и сосудов края ожоговой раны. Ув. $\times 100$

Таблица 3

Интенсивность ИГХ-реакции маркеров MMP-2, MMP-9, TGF β

Структурный элемент	Интенсивность реакции (от 0 до 3 баллов)					
	на 7 сутки		на 13 сутки		на 16 сутки	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
	<i>MMP-2</i>					
Макрофаги в дне раны	1,7 \pm 0,07	1,8 \pm 0,08	1,9 \pm 0,08	1,8 \pm 0,09	2,4 \pm 0,1*	2,1 \pm 0,1
	<i>MMP-9</i>					
ПЯЛ под струпом (глубокий слой)	3,1 \pm 0,04	2,8 \pm 0,07	1,4 \pm 0,05*	2,4 \pm 0,1	1,7 \pm 0,08*	2,0 \pm 0,07
	<i>TGFβ</i>					
ПЯЛ под струпом (глубокий слой)	1,7 \pm 0,07	1,6 \pm 0,07	2,3 \pm 0,1**	2,4 \pm 0,08**	2,2 \pm 0,06*	1,2 \pm 0,06***
Макрофаги в дне раны	2,1 \pm 0,1*	1,7 \pm 0,08	2,4 \pm 0,1**	2,6 \pm 0,1**	2,8 \pm 0,07*	2,3 \pm 0,07
Строма дна раны	0,9 \pm 0,04	0,8 \pm 0,03	0,9 \pm 0,04	1,1 \pm 0,05	0,8 \pm 0,04	0,9 \pm 0,04
Фибробласты в дне раны	1,6 \pm 0,07	1,2 \pm 0,05	2,3 \pm 0,1**	2,1 \pm 0,09**	2,8 \pm 0,08*	2,3 \pm 0,08
Эндотелий в дне раны	0,8 \pm 0,04	0,7 \pm 0,03	1,7 \pm 0,09**	1,6 \pm 0,07**	2,7 \pm 0,08*	2,3 \pm 0,07***
	<i>коллаген IV</i>					
Строма дна раны	0,8 \pm 0,02	0,7 \pm 0,02	2,0 \pm 0,07*	1,4 \pm 0,05**	2,8 \pm 0,08*	2,5 \pm 0,07***

Примечание: MMP-2, MMP-9 — металлопротеазы 2 и 9, TGF- β -1 — трансформирующий фактор роста β -1;

* — достоверно различимые показатели, в сравнении с контролем; ** — в сравнении со сроком 7 дней,

*** — в сравнении со сроком 13 дней.

экспрессия фактора роста TGF β выше, чем в контроле ($p < 0,05$), дополняясь в опыте достоверно более высокой ИГХ-реакцией в глубоком слое лейкоцитарного вала, фибробластах, фиброцитах и эндотелии капилляров дна раны. Эти изменения свидетельствуют об активации основных этапов репарации — ограничении пораженного участка, фагоцитоза, васкулогенеза и фиброза. Учитывая более высокую экспрессию коллагена IV типа в опыте, коллагенизация дна раны наступает раньше и осуществляется активнее. Раньше, чем в контроле, и в большем объеме формируются базальные мембраны микрососудов в созревающей грануляционной ткани, заполняющей дно раны (рис. 7–11, табл. 3, 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, эффективное действие предлагаемых продуктов происходит, по крайней мере, по трем причинам.

1. Наличие в изделиях медицинского назначения структурированных частиц и комплексов на основе хитозана.

2. Длительный процесс биodeградации малых частиц полимера с помощью неспецифических клеточных ферментов.

3. Быстрый контакт с клеточным окружением и формирование внеклеточного модуля ткани в результате пролиферации контактирующих с биополимером клеток.

Интенсивность ИГХ-реакции маркеров Ki-67 и CD 68+ в ранах обеих групп на 13-е и 16-е сутки

Структурный элемент	13-е сутки		16-е сутки	
	Итоговое значение		Итоговое значение	
	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль
	<i>Ki-67</i>			
Макрофаги в дне раны	214,3* выражен.	185,0 умерен.	231,8* выражен.	211,8*** выражен.
Фибробласты в дне раны	137,8 умерен.	141,9 умерен.	192,5* умерен.	149 умерен.
Эндотелий сосудов в дне раны	177,0* умерен.	131,5 умерен.	198,8* умерен.	160,1*** умерен.
	<i>CD 68+</i>			
CD68+ — клетки на границе струпа с подлежащими тканями	195,6* умерен.	172,1** умерен.	136,5 умерен.	146,2 умерен.
CD68+ — клетки под струпом (неглубокие слои)	189,7* умерен.	158,7** умерен.	178,6* умерен.	149,6 умерен.

Ki-67 — фактор пролиферативной активности клеток, CD68+ — кластер дифференцировки макрофагов;
* — достоверно различимые показатели, в сравнении с контролем, ** — в сравнении со сроком 7 дней,
*** — в сравнении со сроком 13 дней.

Применение раневого покрытия на основе коллаген-хитозанового комплекса «Коллахит-Бол», содержащего гликозаминогликаны и сывороточный фактор роста крупного рогатого скота «адегелон», по сравнению с использованием коллаген-хитозанового покрытия «Коллахит-Г» в местном лечении ожогов кожи III-Б степени в эксперименте позволило увеличить суточную скорость заживления ран на 7,9%, ускорить образование на 7-е сутки грануляционной ткани при ожоге на 53,1%, волокнистой соединительной ткани в дне раны — на 18,4%, повысить пролиферативную реакцию эпидермиса края раны — на 59,1%.

Установлено, что при применении дермального эквивалента кожи, содержащего эмбриональные аллофибробласты, в лечении ожога III-Б степени у животных увеличивается суточная скорость заживления по сравнению с бесклеточной полимерной матрицей на 25,5%.

Применение раневых покрытий «Коллахит-Бол» при местном лечении термического ожога инициирует высокую экспрессию маркеров Ki-67, CD68+, TGFβ в моноцитах и макрофагах, Collagen IV в базальных мембранах эпителия и сосудов, супрессию маркеров MMP-2 и MMP-9 в стромальном компартменте грануляционной и соединительной тканей, что свидетельствует о выраженной активности фибробластов и фиброцитов, укорочении фазы альтерации и эксудации, раннем переходе в продуктивную фазу воспалительного процесса с активацией фагоцитоза и васкулогенеза в созревающей грануляционной ткани. Полученная клеточная характеристика ожоговой поверхности указывает на высокую степень готовности ожоговой поверхности к клеточным технологиям.

ЛИТЕРАТУРА

1. Влияние препарата рекомбинантного гормона роста человека биосомы на процесс заживления глубокого ожога кожи крыс / Ю. Клебановас, Л. Лашас, Д. Лашенеи др. // Проблемы эндокринологии. — 2005. — Т. 51, №1. — С. 42–46.
2. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ., под ред. Н.Е. Бузикашвили, Д.В. Самойлова. — М.: Практика, 1999. — 460 с.
3. Евтеев А.А., Тюрников Ю.И., Смирнов С.В. Место тангенциального иссечения гранулирующих ран в оперативном лечении глубоких ожогов // VIII научная конференция по проблеме «Ожоги». — СПб., 1995. — С. 63–65.
4. Ивашкин, А.Н. Восстановление эпителиальных тканей с использованием криоконсервированных жизнеспособных дермотрансплантатов и живого эквивалента кожи: автореф. дис... д-ра мед. наук / А.Н. Ивашкин. — М., 2009. — 54 с.

5. Изюмов, Д. С. Программируемая гибель клеток и окислительный стресс, вызванные ингибиторами митохондриальных функций: автореф. дис... канд. биол. наук / Д. С. Изюмов. — М., 2005. — 24 с.
6. Пат. 2342164 Российская Федерация. МПК7 А 61 L 27/60. Эквивалент кожи и способ его получения / Калмыкова Н. В. и др.; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «Центр клеточных технологий». — № 2006110711/15; опубл. 10.10.07 // Бюл. — 2007. — № 28 (1 ч.). — 1 с.
7. Пат. 233538 Российская Федерация. МПК7 С 12 N 5/06, С 12 N 5/08. Подобная ткани организация клеток и подобные ткани макроскопические конструкции, полученные при помощи культивирования макромассы клеток, и способ культивирования макромассы / Дешпанде М. Ш. (IN) и др.; заявитель и патентообладатель Релайанс лайф сайенсиз пвт лта. (IN) — № 2006134630/13; опубл. 20.02.09 // Бюл. — 2009. — № 5 (1 ч.). — 3 с.
8. Применение культивированных клеток для закрытия дефектов кожи / Н. М. Кузнецов, О. Н. Мазка, Л. Н. Шанина и др. // Новые методы лечения ожогов с использованием культивируемых клеток кожи: мат. межд. симп. — Саратов, 1998. — С. 20.
9. Сравнительное изучение динамики заживления глубоких ожогов ран при использовании аллогенных фибробластоподобных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, иммобилизованных на биодеградируемых мембранах или снятых с культурального пластика / М. Ф. Расулов, В. И. Севастьянов, В. А. Егорова и др. // Патол. физ. и эксп. тер. — 2005. — № 2. — С. 20–23.
10. Тактика лечения тяжелообожженных на основе применения культивированных аллофибробластов / А. А. Алексеев, Ю. Д. Кашин, А. Ю. Яшин и др. // Новые методы лечения ожогов с использованием культивируемых клеток кожи: мат. межд. симп. — Саратов, 1998. — С. 9–12.
11. Acceleration of diabetic wound healing with chitosan-crosslinked collagen sponge containing recombinant human acidic fibroblast growth factor in healing-impaired STZ diabetic rats / W. Wang, S. Lin, Y. Xiao et al. // Life. Sci. — 2008. — Vol. 82, № 3–4. — P. 190–204.
12. Annexins: Biological importance and annexin-related pathologies / Ed. J. Bandorowicz-Pikula. — N.Y.: Kluwer academic publishers, 2003. — 289 p.
13. A novel truncated TGF-beta receptor II downregulates collagen synthesis and TGF-beta I secretion of keloid fibroblasts / Y. Chu, F. Guo, Y. Li et al. // Connect Tissue Res. — 2008. — Vol. 49, № 2. — P. 92–98.
14. Bhushan, B. Production and characterization of a thermostable chitinase from a new alkalophilic Bacillus sp. BG-11 / B. Bhushan // J. Appl. microbiol. — 2000. — Vol. 88, № 5. — P. 800–808.
15. Chitosan per os: from dietary supplement to drug carrier, eds. R. A. A. Muzzarelli. -Grottamare: Atec, 2000. — 334 p.
16. Clinical efficacy and mechanism of bilayered living human skin equivalent (HSE) in treatment of diabetic foot ulcers / H. Brem, J. Young, M. Tomic-Canic et al // Surg Technol Int. — 2003. — Vol. 11. — P. 23–31.
17. Ehrlich, H. P. Understanding experimental biology of skin equivalent: from laboratory to clinical use in patients with burns and chronic wounds / H. P. Ehrlich // Am J. Surg. — 2004. — Vol. 187, № 5. — P. 29–33.
18. Interactions between chitosan and glycosaminoglycans (chondroitin sulfate and hyaluronic acid): physicochemical and biological studies / A. Denuziere, D. Ferrier, O. Damour et al. // Ann. Pharm. Fr. — 2000. — Vol. 58, № 1. — P. 47–53.
19. Human chronic wounds treated with bioengineered skin: histologic evidence of host-graft interactions / E. V. Badiavas, D. Paquette, P. Carson et al. // J. Am. acad. dermatol. — 2002. — Vol. 46, № 4. — P. 524–530.
20. Hunt, T.K. Physiology of wound healing / T.K. Hunt, H. Hopf, Z. Hussain // Adv Skin Wound Care. — 2000. — Vol. 13, Su. 2. — P. 6–11.
21. Jarrahi, M. An experimental study of the effects of Matricaria chamomilla extract on cutaneous burn wound healing in albino rats / M. Jarrahi // Nat. prod. res. — 2008. — Vol. 22, № 5. — P. 422–427.
22. Kiernan, J.A. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice / J.A. Kiernan — Bloxham, UK: Scion Publishing, 2008. — 606 p.
23. Leahy, P.J. Biologic enhancement of wound healing / P.J. Leahy, W. T. Lawrence // Clin. Plast. Surg. — 2007. — Vol. 34, № 4. — P. 659–671.
24. Reconstruction of epidermis by grafting of keratinocytes cultured on polymer support—clinical study / B. Dvorankova, Z. Holikova, J. Vacik et al. // Int J. Dermatol. — 2003. — Vol. 42, № 3. — P. 219–223.
25. Risbud, M. Growth modulation of fibroblasts by chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogel: implications for wound management? / M. Risbud, A. Hardikar, R. Bhone // J. Biosci. — 2000. — Vol. 25, № 1. — P. 25–31.
26. Sprung, P. Hydrogels and hydrocolloids: an objective product comparison / P. Sprung, Z. Hou, D.A. Ladin // Ostomy Wound Manage. — 1998. — Vol. 44, № 1. — P. 36–42, 44, 46.

Поступила в редакцию 06.05.2011

Утверждена к печати 20.05.2011

Авторы:

Большаков И. Н. — доктор медицинских наук, профессор кафедры оперативной хирургии с топографической анатомией ГОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздравсоцразвития России, г. Красноярск.

Сапожников А. Н. — генеральный директор ООО «Коллахит», г. Железногорск Красноярского края.

Еремеев А. В. — канд. биол. наук, заведующий лабораторией клеточных технологий ГОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздравсоцразвития России, г. Красноярск, старший научный сотрудник Красноярского центра репродуктивной медицины, г. Красноярск.

Кириченко А. К. — доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии ГОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздравсоцразвития России, зав. патологоанат. отделением железнодорожной больницы ст. Красноярск ОАО РЖД, г. Красноярск.

Власов А. А. — кандидат медицинских наук, ординатор кафедры урологии с курсом андрологии ГОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздравсоцразвития России, г. Красноярск.

Черданцев Д. В. — доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедры хирургических болезней № 1 ГОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздравсоцразвития России, г. Красноярск.

Каскаев А. В. — врач краевого ожогового центра, г. Красноярск.

Контакты:

Большаков Игорь Николаевич

Тел. моб. 8-913-523-34-35

e-mail: bol.bol@mail.ru.