

УДК 616-001-089: 616-002-154

НАНОВОЛОКНА ХИТОЗАНА В ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ГНОЙНЫХ РАН

Машель В. В., Кондратенко Г. Г., Неверов П. С., Протасевич А. И., Слабко И. Н.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Повышение эффективности лечения инфицированных и длительно незаживающих ран остается актуальной проблемой в современной хирургии. Одним из вариантов ее решения является разработка новых подходов к местному лечению, в частности, создание новых высокоэффективных раневых покрытий с антибактериальными и репаративными свойствами. В последние годы внимание исследователей обращено к хитозану — натуральному биополимеру, обладающему собственной антимикробной активностью, гемостатическим действием, а также способностью к биодegradации с образованием безопасных для человеческого организма продуктов. С помощью специальной технологии из хитозана получены нановолокна со сверхразвитой структурой, пористостью и высокой сорбционной емкостью. Выполнены экспериментальные исследования, в которых в сравнительном плане оценены антибактериальные и ранозаживляющие свойства нановолокон хитозана на модели гнойной раны. Полученные данные свидетельствуют о наличии у нановолокон хитозана ранозаживляющих свойств при отсутствии выраженной антимикробной активности. С учетом способности нановолокон хитозана быть носителем различных соединений, сделан вывод о целесообразности модификации нановолокон антибактериальными агентами в целях создания высокоэффективного композиционного средства местного действия.

Ключевые слова: хронические раны, раневой процесс, нановолокна, хитозан.

Введение. Важной медико-социальной проблемой является лечение длительно незаживающих дефектов кожи и мягких тканей, осложненных инфекционным процессом [1]. Объективная оценка и разграничение фаз раневого процесса, а также применение местных лекарственных средств с определенным механизмом действия требует наличия большого арсенала таковых, что дорогостояще и не всегда возможно. В связи с этим существует необходимость в разработке более универсальных лекарственных композиций, которые можно было бы эффективно использовать в разные фазы раневого процесса, исключая фазу ремоделирования рубца. К основным требованиям, предъявляемым к таким раневым покрытиям для оптимального заживления инфицированных дефектов кожи, относятся: поддержание влажной раневой среды; сорбция избытка раневого экссудата и токсинов; прямое антимикробное и регенеративное действие; атравматичность и безболезненность при удалении с раневой поверхности во время перевязки [2].

Наиболее полно современным требованиям отвечают раневые покрытия из модифицированных полисахаридов. Одним из перспективных для создания таких раневых покрытий является хитозан — производное линейного полисахарида, макромолекулы которого состоят из случайно связанных (β -(1-4) D-глюкозаминовых звеньев и N-ацетил-D-глюкозамина [3]. Получают хитозан из пчелиного хитина, в природе он встречается в клеточных стенках грибов отдела *Zygomycota* и панцирях ракообразных. Большое число свободных аминогрупп позволяет молекуле хитозана образовывать значительное количество водородных связей, что объясняет способность вещества связывать и прочно удерживать органические водорастворимые вещества, в том числе бактериальные токсины. Благодаря наличию реакционноспособной аминогруппы, хитозан также обладает гемостатическими свойствами за счет деполяризации гемовых групп гемоглобина и агглютинации эритроцитов. Описана собственная антимикробная активность хитозана *in vitro* [3, 4], при этом хитозан

и продукты его биодegradации практически безопасны для человеческого организма.

Особый интерес в последние годы обращен к медицинскому применению наноматериалов. Было показано, что при переходе на нанометровый уровень (диапазон от 1 до 100 нм) у материалов изменяются физико-химические свойства, которые невозможно предсказать [5]. С применением специальной технологии недавно были получены нановолокна хитозана, обладающие сверхразвитой структурой и пористостью.

Учитывая актуальность и возможность создания композитных средств на основе нановолокон хитозана для лечения инфицированных раневых дефектов, возникла необходимость экспериментальной оценки влияния самих нановолокон хитозана на течение раневого процесса.

Цель работы — определить в эксперименте антимикробную активность и влияние нановолокон хитозана на динамику раневого процесса в условиях инфицирования.

Материалы и методы. После одобрения протокола исследования этической комиссией, был проведен эксперимент с использованием 30 самок крыс линии Wistar массой 200–220 г. Животные находились на содержании и стандартном рационе в виварии УО «Белорусский государственный медицинский университет» в отдельных клетках. Температура воздуха и его влажность поддерживались на постоянном уровне. Все работы проводились в соответствии с международными правилами и принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и с другой научной целью (Страсбург, 18.03.1986), а также в соответствии с Положением о порядке использования экспериментальных животных в научно-исследовательских работах и учебном процессе в УО «БГМУ» [6].

Моделирование гнойной раны выполнялось по методике, разработанной В. А. Гинюком с модификациями [7]. Под внутрибрюшным тиопенталовым наркозом, потенцированным при необходимости ингаляционно изофлюраном, на кожу животного после выбривания шерсти на холке несмываемым маркером наносили разметку таким образом, чтобы получился раневой дефект округлой формы с диаметром 1 см. Опера-

ционное поле двукратно обрабатывали антисептиком Септоцид. Для облегчения последующих манипуляций в центр разметки подкожно вводили 2 мл 0,25%-го раствора новокаина. Далее по маркерным точкам ножницами Купера иссекали кожу вместе с подкожной клетчаткой и поверхностной фасцией.

Затем губками иглодержателя раздавливали кожные края и дно раны экспозицией 5 с в целях создания в ране массы нежизнеспособных тканей и благоприятной среды для развития инфекции. Для изоляции раневого процесса от внешних механических факторов и микробных агентов на получившийся раневой дефект помещали и фиксировали ограничительную камеру, изготовленную с помощью технологии 3D-печати из фотополимера (заявка на патент). Одноразовым шприцем с тонкой иглой поверхностно, а также путем инфильтрации краев и дна в рану вносили 2 мл суспензии *S. aureus*, плотностью от $1,0 \cdot 10^9$ до $2,0 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, подготовленной лабораторией внутрибольничных инфекций научно-исследовательской части УО «Белорусский государственный медицинский университет» по McFARLAND STANDARD с использованием соответствующей калибровки прибора (денситометра). Рану закрывали стерильным марлевым шариком, который рыхло заполнял внутреннее пространство ограничительной камеры и удерживался с помощью фиксатора. В послеоперационном периоде все животные получали обезболивание кеторолом внутримышечно 0,5 мг/кг раз в день. В дальнейшем каждые двое суток проводились перевязки с оценкой и документированием динамики раневого процесса, а также микробиологическим мониторингом. Внешний вид инфицированной раны после удаления струпа на вторые сутки приведен на рисунке 1.

Животные были разделены на три группы по 10 особей в каждой. Животные первой контрольной группы не получали местного лечения раны, им присвоены номера 1–10. Животные второй контрольной группы начиная со вторых суток получали местное лечение аппликацией мази «Меколь», им присвоены номера 11–20. Мазь «Меколь» в качестве средства сравнения выбрана не случайно: она является дженериком импортного лекарственного средства «Левомеколь»

(Украина) и широко применяется в отечественной клинической практике при местном лечении инфицированных ран. Входящий в ее состав макрогол является водорастворимым гелеобразующим линейным полимером, способным удерживать с помощью водородных связей молекулы воды; она также содержит метилурацил, который ускоряет процессы регенерации и заживления ран, и антимикробный агент — хлорамфеникол. Изложенное выше позволяет в сравнительном плане оценить аналогичное влияние нановолокон хитозана на течение раневого процесса в условиях исследования. В третьей группе (опытная с номерами 21–30) местное лечение проводили с помощью нанесения на рану нановолокон хитозана.

Нановолокна хитозана в виде квадратных салфеток площадью 1 см² были изготовлены и предоставлены УО «Белорусский государственный технологический университет». Полученные образцы имели следующие характеристики: плотность нанесения нановолокон хитозана — 10 г/м², они содержали волокна диаметром менее 100 нм. Электронная микрофотография образца нановолокон хитозана представлена на рисунке 2.



Рисунок 1 — Внешний вид экспериментальной инфицированной раны на момент первичного учета (2-е сутки)

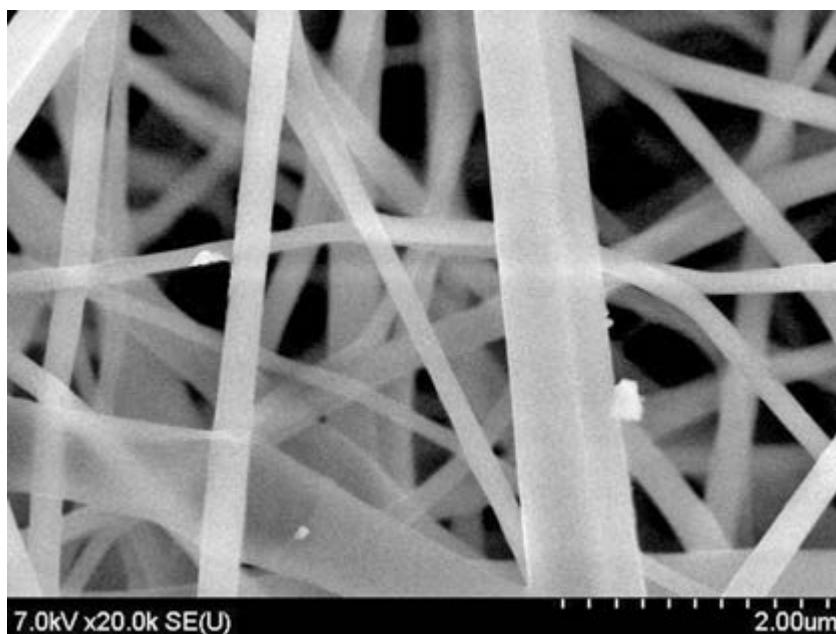


Рисунок 2 — Электронная микрофотография поверхности образца нановолокон хитозана

Образцы были упакованы, загружены в камеру для стерилизации, где обработаны парами перекиси водорода в сочетании с

низкотемпературной (не более 56 °С) плазмой. Цикл стерилизации состоял из последовательных фаз: вакуумирования, впрыски-

вания стерилизующего агента, включения источника электромагнитного излучения, под действием которого образуется плазма и пероксид водорода разлагается на химически активные радикалы с выделением видимого и ультрафиолетового излучения. Такой способ стерилизации позволяет избежать ускоренной биодеградации нановолокон хитозана.

Учет результатов и оценка скорости заживления ран проводились с применением цифровой планиметрии, которая выполнялась каждые двое суток методом цифрового фотографирования. В условиях одинаковой освещенности фотографировали рану и условный эталон площади встроенной камерой мобильного устройства. Полученные цифровые изображения подвергались анализу специализированным программным комплексом LesionMeter версии 1.0.8 (с открытой лицензией) на операционной системе Android. Отношение количества точек в изображении дефекта кожи к количеству точек в изображении условного эталона площади, умноженное на площадь эталона, определялось как площадь дефекта кожи. Полученные результаты заносились в память устройства и регистрационные карты.

Микробиологический мониторинг осуществлялся путем забора из раны микробиологических образцов каждые двое суток (со 2-х по 8-е сутки) с помощью желатиновых тампонов (стерильные стеклянные палочки обмакивали в 5,0%-й желатин, стерилизованный в течение 15 мин при 121 °С). В пробирку с желатиновым тампоном перед посевом добавляли 0,9 мл физиологического раствора (разведение 1:10) и расплавляли при 37 °С, готовили разведения (1:100; 1:1000). Каждое разведение высевали по 0,1 мл на плотные питательные среды: мясо-пептонный агар, желточно-солевой агар. Чашки с посевами инкубировали в термостате 24 ч при 37 °С, затем определяли количество микроорганизмов в 1 мл. Отслеживалась выраженность микробной контаминации раневой поверхности по количеству колониобразующих единиц (КОЕ/мл).

В ходе проведения микробиологического мониторинга у двух животных выявлено

присоединение вторичной раневой инфекции (*Proteus mirabilis*), эти особи были исключены из исследования. На начальных этапах моделирования из-за быстрой ретракции краев раны к исходу вторых суток было отбраковано еще 7 крыс, в итоге в каждой группе осталось по 7 животных.

Полученные цифровые данные сводились в таблицы, предварительная проверка соответствия вариационных рядов нормальному распределению проводилась по критерию Колмогорова – Смирнова. Статистическая обработка производилась методом непараметрического анализа для малых выборок с применением критерия Манна – Уитни. В обработке данных применялся пакет программного обеспечения IBM SPSS Statistica 10. Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Визуально к исходу вторых суток после моделирования у всех животных развивались краевые некрозы кожи, ткани дна раны становилось дряблыми, серого цвета, с умеренным гнойным отделяемым и неприятным запахом. При этом крысы оставались активными, принимали пищу и воду, сохранялась исследовательская реакция.

У крыс группы 1 при перевязках каждое удаление марлевого шарика вызывало болевую реакцию из-за присыхания к краям раны, появлялась капиллярная кровоточивость раневой поверхности. Животные группы 2 переносили перевязку более спокойно, однако из-за высыхания мази «Меколь» перевязочный материал отделялся от раны с усилием, что вызывало беспокойство животных. Благодаря покрытию из нановолокон хитозана во время перевязок у животных группы 3 перевязочный материал всегда легко отделялся от раневой поверхности без дополнительной ее травматизации.

Согласно критерию Колмогорова – Смирнова, распределение показателей в группах оказалось ненормальным при значении $p = 0,05$ ($D_{\text{факт}} = 0,172$ для группы 1, $D_{\text{факт}} = 0,175$ для группы 2, $D_{\text{факт}} = 0,23$ для группы 3, что больше, чем $D_{0,05} = 0,113$ для существующего размера выборки), поэтому значения представлены в виде медианы Me и квартильного размаха [25–75 %].

Таблица — Планиметрия экспериментальных гнойных ран в динамике

Группа животных	Сутки					Процент уменьшения площади за 10 суток
	2-е	4-е	6-е	8-е	10-е	
	Площадь раны, см ² (медиана и квартили)					
Группа 1 (без лечения)	3,33 [2,84–3,33]	3,61 [2,51–4,25]	3,48 [2,51–3,88]	2,21 [1,54–2,65]	1,35 [0,85–1,64]	62,6 % [57,1–73,1 %]
Группа 2 (местное лечение мазью «Меколь»)	3,08 [2,58–4,17]	2,84 [2,38–4,42]	2,36 [1,61–2,94]	1,80 [0,75–2,38]	0,73 [0,42–0,89]	82,3 % [71,3–92,2 %]
Группа 3 (местное лечение нановолокнами хитозана)	3,19 [3,00–3,39]	3,25 [2,30–3,65]	2,51 [1,71–3,38]	1,77 [0,62–2,87]	0,77 [0,15–0,88]	76,1 % [73,0–89,5 %]

Согласно полученным результатам уменьшение площади ран в группе 1 происходило медленнее, чем в группе 2 и группе 3. За 10 суток медиана уменьшения площади ран в группе 1 составила 62,6 %, против 82,4 и 76,1 % для групп 2 и 3 соответственно, отличия были статистически достоверны ($p = 0,01$ для обеих групп). Уменьшение площади ран в группах 2 и 3 к 10-м суткам не имело статистически значимых различий ($p = 0,798$). Эти данные позволяют заключить, что местное применение мази «Меколь» и нановолокон хитозана сопоставимо влияет на заживление экспериментальных гнойных ран.

Результаты микробиологического мониторинга показали, что во всех группах наблюдалось достоверное снижение микробной контаминации ран в динамике в 10–1000 раз раз ($p = 0,04$ для группы 1, $p = 0,02$ для группы 2 и $p = 0,003$ для группы 3). Статистическое сравнение с применением непараметрического анализа и U -критерия Манна – Уитни не выявило между группами значимых отличий в сопоставимые сутки наблюдения ($p > 0,05$). Между тем в процент-

ном отношении снижение микробной контаминации раневой поверхности на 8-е сутки в группе 1 и группе 3 у животных имело одинаковые показатели (98,31 и 98,45 % соответственно). Последнее свидетельствует о недостаточной антибактериальной активности нановолокон хитозана.

Заключение. В эксперименте выявлено, что местное применение нановолокон хитозана оказывает положительное влияние на процесс заживления инфицированных ран, сопоставимое с широко используемым в клинической практике средством «Меколь». Собственные антибактериальные свойства нановолокон хитозана выражены недостаточно. Преимуществом применения нановолокон хитозана следует считать меньшую травматизацию раневой поверхности во время перевязок. Способность нановолокон хитозана быть носителем различных соединений антимикробных агентов делает перспективным получение подобной модификации нановолокон хитозана в целях со-здания нового высокоэффективного комбинированного средства для лечения гнойных ран.

Список цитированных источников

1. Bowler, G. Wound pathophysiology, infection and therapeutic options / G. Bowler // Ann.Med. — 2002. — Vol. 34. — P. 419–427.
2. Cardona, F. Skin and soft-tissue infections: a critical review and therole of telavancin in their treatment / F. Cardona, S. E. Wilson // Clin. Infect. Dis. — 2015. — Vol. 61. — P. 69–78.
3. Mechanism of action of electrospun chitosan-based nano fibers against meat spoilage and pathogenic bacteria / M. Arkoun [et al.] // Molecules. — 2017. — Vol. 22. — P. 585–602.
4. Goy, R. C. A review of the antimicrobial activity of chitosan / R. C. Goy, D. D. Britto. O. B. Assis // Polimeros. — 2009. — Vol. 19. — P. 241–247.

5. Rzheussky, S. Silver nanoparticles in medicine / S. Rzheussky // Vestnik VGMU. — 2022. — Vol. 21 (2). — P. 15–24. DOI: 10.22263/2312-4156.2022.2.15.

6. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур : ГОСТ 33215–2014; введ. 01.07.2016. М. : Стандартинформ, 2016. — С. 19.

7. Гинюк, В. А. Методика моделирования острого местного гнойно-воспалительного процесса у лабораторных животных и проведения эксперимента по лечению полученных гнойных ран с помощью фоторегуляторной и фотодинамической терапии / В. А. Гинюк // Мед. журн. — 2009. — № 1. — С. 44–46

Chitosan nanofibers in the treatment of experimental purulent wounds

Mashel V. V., Kondratenko G. G., Neverov P. S., Protasevich A. I., Slabko I. N.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Increasing the effectiveness of the treatment of infected and long-term non-healing wounds remains an urgent problem in modern surgery. One of the options for its solution is the development of new approaches to local treatment, in particular, the creation of new highly effective wound dressings with antibacterial and reparative properties. In recent years, the attention of researchers has been drawn to chitosan, a natural biopolymer that has its own antimicrobial activity, hemostatic effect, and the ability to biodegrade to form products that are safe for the human body. With the help of a special technology, nanofibers were obtained from chitosan, with an overdeveloped structure, porosity and high sorption capacity. Experimental studies have been carried out in which the antibacterial and wound-healing properties of chitosan nanofibers were evaluated in a comparative way on a model of a purulent wound. The data obtained indicate the presence of wound healing properties in chitosan nanofibers in the absence of pronounced antimicrobial activity. Taking into account the ability of chitosan nanofibers to be a carrier of various compounds, it was concluded that it is expedient to modify nanofibers with antibacterial agents in order to create a highly effective composite agent of local action.

Keywords: chronic wounds, wound healing, nanofibers, chitosan.

Поступила 11.08.2023