## ИЗУЧЕНИЕ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ГЕЛЯ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА С ТАУРИНОМ И АЛЛАНТОИНОМ

## Федосов П.А.<sup>1</sup>, Сливкин А.И.<sup>1</sup>, Николаевский В.А.<sup>1</sup>, Провоторова С.И.<sup>1</sup>, Бузлама А.В.<sup>1</sup>, Михайлов Е.В.<sup>2</sup>

 $^{1}$ ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», г. Воронеж, Россия (394006, ул. Студенческая, 3), e-mail: Fedosov91@gmail.com

 $^2$ ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», г. Воронеж, Россия (394087 ул. Мичурина, 1)

В скрининговых исследованиях на модели экспериментальных полнослойных ран изучены ранозаживляющие свойства геля на основе хитозана с таурином и аллантоином в сравнении с препаратами: гель «Солкосерил» и мазь «Левомеколь». Установлено, что гель на основе хитозана, содержащий таурин и аллантоин, оказывает выраженное ранозаживляющее действие, сокращает сроки регенерации на 4 дня, увеличивая скорость заживления ран в 1,5 раза относительно контроля и обеспечивает полную эпителизацию раневого дефекта. Заживление ран после применения геля на основе хитозана с таурином и аллантоином на 9-е сутки происходило более эффективно относительно геля «Солкосерил» и мази «Левомеколь» — на 25,38% и 40,24% (p<0,05) соответственно, без формирования грубой соединительной ткани рубца. По данным гистологических исследований установлено, что разработанный гель ускоряет ремоделирование рубцовой ткани, стимулирует регенераторные процессы и способствует трансформации рубцов в регенераты кожного типа.

Ключевые слова: хитозан, таурин, аллантоин, гель, заживление ран

# STUDY OF WOUND-HEALING EFFECT GEL, BASED ON CHITOSAN TAURINE AND ALLANTOIN

# Fedosov P.A.<sup>1</sup>, Slivkin A.I.<sup>1</sup>, Nikolaevskiy V.A.<sup>1</sup>, Provotorova S.I.<sup>1</sup>, Buzlama A.V.<sup>1</sup>, Mihaylov E.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Federal state budgetary educational institution of higher professional education «Voronezh State University», Voronezh, Russia (394006, street. Student 3), e-mail: Fedosov91@gmail.com

<sup>2</sup>Federal state budgetary educational institution of higher professional education «Voronezh State Agricultural University afterPeter I», Voronezh, Russia (394087, street. Michurina 1)

In the screening studies of a full-thickness skin wound model, studied wound healing effect of the combination gel based on chitosan with taurine and allantoin in comparisons with gel Solcoseryl and ointment Levemecol. effect, reduces the period of recovery for 4 Determined that the gel based on chitosan containing taurine and allantoin has a pronounced wound-healing days, increasing the rate of wound healing by 1.5 times compared to the control and provides complete epithelialization of the wound defect. Wound healing after application of the gel based on chitosan with taurine and allantoin to 9 hours more efficiently with respect to gel "Solkoseril" and ointments "Levomekol" on 25,38% and 40,24% (p <0,05), respectively, without forming the rough connective tissue scar. According to histological studies revealed that the developed gel accelerates remodeling of scar tissue, stimulates the regenerative processes and promotes the transformation of scarring in the skin regenerates type.

Keywords: chitosan, taurine, allantoin, gel, wound healing

Лечение ран является одной из важнейших проблем современной медицины. Каждый десятый житель России ежегодно подвергается травмам [1]. За последние десятилетия появилось большое количество раневых покрытий, разнообразных по составу действующих веществ, используемых основ или их комбинаций [4]. Среди множества основ особое внимание уделяется природным биополимерам. Так, хитозан, получаемый из панцирей ракообразных, используется в различных лекарственных формах, дает достоверные результаты в хирургии для ускорения очищения ран от мертвых клеток, кроме того, обладает антибактериальным действием и выступает в роли гелеобразующего средства [5]. В

комбинации с лекарственными веществами хитозан способен пролонгировать их действие [7]. Использование гелей для местного лечения ран имеет определенные преимущества по сравнению с другими лекарственными формами: это длительный лечебный эффект, высокая биодоступность входящих в состав геля лекарственных веществ, а также возможность локального действия. Гели удобны и просты в применении, хорошо поглощают кожные экскреторные продукты, способствуют росту грануляционной ткани, не пачкают одежду и быстро образуют тонкую пленку на поверхности кожи [2]. Создание комбинации хитозана с другими веществами может способствовать повышению регенерации тканей. Такими веществами могут быть таурин и аллантоин. Таурин (2-аминоэтансульфоновая кислота) – незаменимая аминокислота, проявляющая антиоксидантное, условно мембраностабилизирующее действие, уменьшающая перекисное окисление липидов, процессы Аллантоин – стимулирующая репаративные [8]. низкомолекулярное обладающее гетероциклическое соединение, антиоксидантным, противомикробным, противовоспалительным, кератолитическим, регенераторным действием, что приводит к более быстрому заживлению ран [9]. В результате проведенного анализа литературы и патентного поиска не обнаружено сведений о комбинации геля на основе хитозана с таурином и аллантоином, в связи с чем актуальны и перспективны разработки геля на основе хитозана с таурином и аллантоином (ХТА) и изучение его фармакологического действия.

### Цель исследования

Изучить ранозаживляющую активность комбинированного состава геля с хитозаном, таурином и аллантоином в сравнении с зарегистрированными лекарственными препаратами мазь «Левомеколь» и гель «Солкосерил» на модели экспериментальной полнослойной раны.

### Материал и методы исследования

Определение влияния разработанного геля, его компонентов по отдельности и лекарственных препаратов мазь «Левомеколь» и гель «Солкосерил» на динамику заживления полнослойных ран выполнено в опытах на 49 половозрелых самцах мышей массой 18–25 г. Исследования были проведены с соблюдением этических принципов экспериментов над животными в соответствии с положением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов, и Приказа МЗ РФ от 19.06.2003 № 267. За день до эксперимента на месте предполагаемого нанесения ран у мышей удаляли шерстный покров с помощью депиляционного крема Deep depil (ООО «Флоресан», Россия). Под ингаляционным эфирным наркозом по трафарету с помощью хирургических ножниц с закругленными концами вырезали круглый лоскут кожи площадью 60 мм² в шейнозатылочной области. Раны оставались открытыми до окончания эксперимента [3]. Мышей разделили на 7 групп по 7 животных в каждой. Первая группа была контрольной, рана

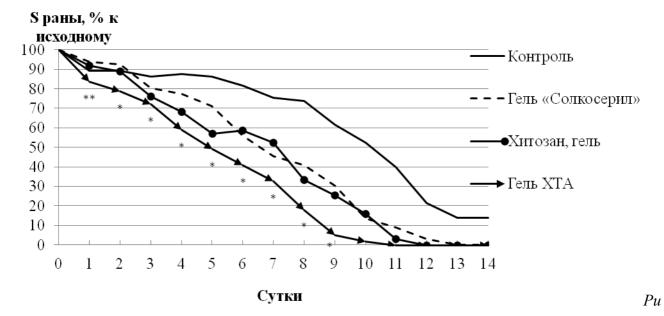
оставалась открытой без нанесения геля, заживление раны происходило самостоятельно. Во второй группе на рану наносили мазь «Левомеколь» (ОАО «Нижфарм», Россия). В третьей группе на рану наносили гель «Солкосерил» (Legacy Pharmaceuticals Switzerland GmbH, Швейцария). В четвертой группе на раневую поверхность наносили гель на основе хитозана (Sigma-Aldrich, Япония) в монокомпозиции. В пятой группе животным наносили раствор таурина (ЗАО «Вектон», Россия) на рану. В шестой группе рану орошали раствором аллантоина (Acros Organics, Бельгия). В седьмой группе на рану наносили гель на основе хитозана с таурином и аллантоином. Экспериментальным группам мышей сразу после операции наносили изучаемое средство в дозе 0,2 г и затем ежесуточно в течение 14 дней. Измерение площади раны осуществляли 1 раз в сутки [10]. Об эффективности применения средств судили на основании наблюдений за динамикой процессов заживления ран. Оценивали общее состояние животных, наличие или отсутствие воспалительного процесса. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ «Місгосоft Ехсеl» и «Statistica». Достоверность отличий контрольных и экспериментальных результатов оценивали при помощи t-критерия Стьюдента.

Для выявления морфологических особенностей процесса заживления и способности исследуемых препаратов влиять на клеточный состав и качественно-количественное заполнение межклеточного вещества в самих рубцах были проведены гистоморфологические исследования. Для данного исследования на 14-е сутки после нанесения ран животных выводили из эксперимента и проводили забор кожного лоскута с раневой областью. Материал фиксировали в 10%-ном нейтральном растворе формалина (ЗАО «Вектон», Россия), обезвоживали в спиртовых растворах возрастающей концентрации и заливали в парафиновые блоки. Срезы толщиной 4-5 микрон получали на ротационном микротоме «MПC-2» (Точмедприбор, CCCP) И окрашивали гематоксилин-эозином [6]. Микрофотографические снимки осуществляли с помощью микроскопа «Биомед-4» (Биомед, Россия), совмещенным с цифровой камерой для микроскопа «DCM510» (Scopetek, Китай) и компьютером.

### Результаты исследования и их обсуждение

Результаты проведенных исследований показали, что мыши хорошо переносят применение геля на основе хитозана с таурином и аллантоином. Гель не оказывал раздражающего действия, не вызывал гиперемии и отека кожных покровов и не влиял на двигательную активность подопытных животных. За период наблюдения не было выявлено ни одного случая нагноения раны и осложненного течения раневого процесса у животных. Разработанный гель легко наносился на раны, сорбировал раневые выделения, не высушивая

дно раны, останавливал кровотечение. На основании полученных данных были построены динамические кривые изменения площади (S) раны (рис. 1).



 $c.\ 1.\ Динамика изменения площади ран контрольных и леченных животных (* — P<0,05; ** — P<0,01 — достоверность различий в группе XTA по сравнению с контролем).$ 

Анализ динамики изменения площади ран показал, что в контрольной группе наблюдалось последовательное уменьшение площади раны на протяжении всего периода наблюдения. Во второй группе применение мази «Левомеколь» достоверно уменьшало площадь раны на 9-е сутки на 16,38% относительно контроля. В третьей группе гель «Солкосерил» сокращал сроки заживления ран на 2 суток, оказывал положительное влияние на уменьшение площади ран на 7-е сутки на 29,93% относительно контроля (р<0,05). В четвертой группе, где раны обрабатывались гелем на основе хитозана, сокращались сроки заживления ран на 3 суток, на 6-е сутки наблюдалось уменьшение площади раны на 22,81% (р<0,05); на 8-е сутки максимальный эффект уменьшения площади ран составил 40,51% относительно контроля. В пятой группе после нанесения раствора таурина на место повреждения наблюдалось уменьшение площади ран на 5-е сутки на 21,07%, на 8-е сутки отмечено уменьшение на 35,75% по сравнению с контролем (р<0,05). В шестой группе животным наносили раствор аллантоина на рану, на 7-е сутки обнаружено ускоренное заживление ран на 25,38% (р<0,05).

Результаты исследования согласуются с известными сведениями о том, что растворы таурина и аллантоина обладают ранозаживляющим действием. В седьмой группе гель ХТА обеспечивает полное заживление ран на 4 дня раньше, чем в контроле, его ранозаживляющее действие проявлялось уже с 1-х суток после нанесения повреждения и характеризовалось уменьшением площади раны на 5,62%. За 7 суток наблюдений площадь раны уменьшилась

на 42,60%, к 9-му дню площадь раны уменьшилась на 56,62% относительно контроля (p<0,05). Гель XTA относительно мази «Левомеколь» сокращал время заживления ран на 4 дня и уменьшал площадь ран на 9-е сутки на 40,24% (p<0,05). Обработка ран гелем XTA в сравнении с гелем «Солкосерил» ускорила процесс заживления ран на 9-е сутки на 25,38% (p<0,05).

 Таблица 1

 Периоды полузаживления полнослойных экспериментальных ран

Группа животных	Период полузаживления, сут.
Контроль	10,43±0,98
Мазь «Левомеколь»	8,86±0,38*
Гель «Солкосерил»	6,57±0,79*
Гель хитозановый	7,14±0,38*
Раствор таурина	7,43±0,53*
Раствор аллантоина	7,29±0,49*
Гель XTA	5,43±0,54*

Примечание: \* — P<0,05; \*\* — P<0,01 — достоверность различий в опытной группе по сравнению с контролем.

Анализ динамики изменения площади ран контрольных и леченных животных позволил определить период полузаживления ран [10]. Полученные данные доказывают, что мазь «Левомеколь», гель «Солкосерил» и гель хитозановый сокращают сроки полузаживления ран на 15,05% и 37,01% и 31,54% (р<0,05) соответственно относительно контроля. Наибольшей активностью обладает гель ХТА, так как он уменьшает время полузаживления ран на 47,94% (р<0,05) относительно нелеченных животных. В сравнении с хитозановым гелем, гелем «Солкосерил» и мазью «Левомеколь» гель ХТА способствовал сокращению периода полузаживления ран на 23,95%, 17,35% и 38,71% (р<0,05) соответственно. На всех этапах течения раневого процесса наибольший эффект проявляется именно в группе ХТА, при этом на 14-й день эксперимента рубец от раны являлся значительно более тонким и менее грубым, чем в контрольной группе.

Анализ гистоморфологических исследований в контрольной группе животных показал, что на 14-й день эпидермис значительно увеличен, клетки всех слоев кожи приобрели атипичные формы и размеры. В шиповатом слое эпидермиса наблюдается вакуолизация клеток. Сосочковый слой дермы сглажен. Кровенаполнение сосудов неравномерное, одни сосуды в спавшемся состоянии, в виде «клеточных тяжей», другие — умеренно полнокровны со слабо выраженной лейкоцитарной инфильтрацией. Рост эпителия происходит по поверхности грануляционной и рыхлой соединительной ткани, которые

образуются в ходе регенерации дермы. Клетки грануляционной ткани размножаются вокруг сосудов в виде небольших скоплений. В регенерирующей ткани преобладают пролиферативные процессы, в результате которых образуются очаговые клеточные инфильтраты с разрастанием грануляционной и волокнистой соединительной ткани (рис. 2).

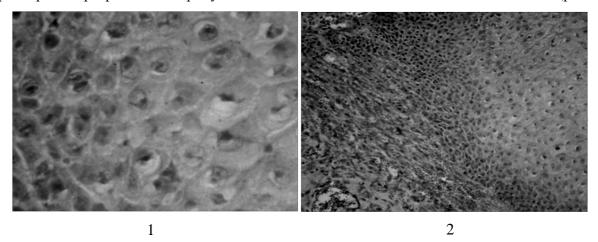
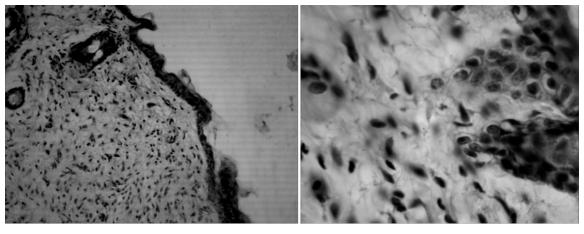


Рис. 2. Микроскопическое строение эпидермиса животных контрольной группы. Окраска гематоксилином и эозином,  $1 - y_{\rm B.} \times 400$ ;  $2 - y_{\rm B.} \times 200$ .

В группе животных, где применяли гель «Солкосерил», раневой дефект замещается коллагеновыми волокнами. Наблюдается отсутствие экссудации и отека, грануляционная ткань заполняет весь дефект. Сразу после образования рубца происходит образование эластических волокон и новой фиброзной сети, в дерме по базальному слою образуется небольшое количество волосяных фолликулов. Роговой слой тонкий. Выявлялись мелкие группы эпителиальных клеток базального слоя в состоянии внутриклеточного отека. Базальные кератиноциты плотно сомкнуты между собой, имеют вытянутую форму, ядра четко очерчены. В фиброзной ткани коллагеновые волокна имеют небольшую извитость. Эластические волокна сформированы по всему объему рубца, ближе к краю регенерата и располагаются вдоль коллагеновых волокон, образуя очень тонкие, едва заметные ответвления (рис. 3).



2

Рис. 3. Эпидермис кожи животных, после воздействия геля «Солкосерил». Окраска гематоксилином и эозином.  $1 - y_8 \times 200$ ;  $2 - y_8 \times 400$ .

У животных, на раны которых наносили гель XTA, происходила полная эпителизация области раневого дефекта. Наблюдаются гипертрофия эпителия и выросты базальной мембраны в подлежащую ткань, образована волокнистая соединительная ткань, полностью заполняющая объем раневого дефекта. Под эпителием сформирована рубцовая ткань. При этом происходит разрыхление рубцовой ткани и уменьшение числа сосудов. Преобладание фиброцитов и зрелых фибробластов над другими типами клеток может свидетельствовать об инволюции рубца. Отмечалось уменьшение пролиферативных воспалительных процессов в дерме и отсутствие очагов лейкоцитарной инфильтрации. На периферии бывшей раневой поверхности в дерме наблюдались процессы восстановления наружных эпителиальных влагалищ корней волос и сальных желез. Коллагеновые волокна формируют пучки различной толщины и направлений (рис. 4).

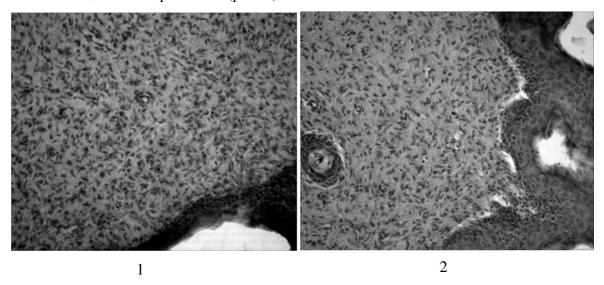


Рис. 4. Эпидермис кожи животных, после воздействия геля на основе хитозана с таурином и аллантоином. Окраска гематоксилином и эозином. 1,2 – ув. × 200;

### Выводы

Местное применение геля на основе хитозана с таурином и аллантоином сокращает сроки регенерации на 4 дня и увеличивает скорость заживления ран в 1,5 раза относительно контроля. Заживление ран после применения геля ХТА на 9-е сутки происходило более эффективно относительно геля «Солкосерил» и мази «Левомеколь» на 25,38% и 40,24% (р<0,05) соответственно, без формирования грубой соединительной ткани рубца. По данным гистологических исследований установлено, что наибольшей эффективностью обладает гель ХТА, он ускоряет ремоделирование рубцовой ткани, стимулирует регенераторные процессы и способствует трансформации рубцов в регенераты кожного типа.

## Список литературы

- 1. Абаев Ю.К. Справочник хирурга. Раны и раневая инфекция / Ю.К. Абаев. Ростов-на-Дону: Феникс, 2006. — 427 с.
- 2. Марченко Л.Г. Технология мягких лекарственных форм: учебное пособие для вузов / Л.Г. Марченко, А.В. Русак, И.Е. Смехова. СПб.: СпецЛит, 2004. 174 с.
- 3. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А.Н. Миронов. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
- 4. Оценка эффективности применения инновационных раневых биопокрытий на основе хитозана при лечении ожоговых ран у крыс / Н.В. Островский и др. // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: матер. одиннадцатой Международ. конф. Мурманск, 2012. С. 386–391.
- 5. Перспективы использования уникального биополимера хитозана при местном лечении ран кожи в хирургии / И.В. Ярема [и др.] // Хирург. 2008. № 4. С. 40–46.
- 6. Сулейманов С.М. Методы морфологических исследований: метод. пособие / С.М. Сулейманов. Воронеж: ВНИВИ патологии, фармакологии и терапии, 2012. 103 с.
- Экспериментальное исследование влияния хитозансодержащих композиций на ткани пародонта крыс / О.Н. Тумшевиц [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. 2006. № 4. С. 60–62.
- 8. Effect of taurine on wound healing / S. Dinger [et al.] // Amino Acids. 1996. Vol. 10. P. 59–71
- 9. Profile of wound healing process induced by allantoin // Acta Cir. Bras. -2010. Vol. 25,  $N_{2}$  5. P. 460–461.
- 10. Study of cutaneous wound healing in rats treated with Lactobacillus plantarum on days 1, 3, 7, 14, and 21 / N. M. Heydari [et al.] // African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2011. Vol. 5. P. 2395–2401.

#### Репензенты:

Булынин В.В., д.м.н., профессор кафедры госпитальной хирургии ГБОУ ВПО Воронежского государственного медицинского университета имени Н.Н. Бурденко Минздрава России, г. Воронеж;

Дьячкова С.Я., д.м.н., профессор кафедры фармакологии ФГБОУ ВПО Воронежского государственного университета, г. Воронеж.