

ОЦЕНКА РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ *L*- И *D*-ИЗОФОРМ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ИХ СОЛЕЙ С ХИТОЗАНОМ НА МОДЕЛИ ОЖОГОВОЙ РАНЫ У КРЫС

Аль Зубейди Адавия Ф.А.¹, Малинкина О.Н.², Зудина И.В.², Ковалева Я.О.², Ксенофонтова О.Ю.², Островский Н.В.³

¹Медицинский колледж при факультете микробиологии, Университет Дияла, Ирак, e-mail: adwa_a2000@yahoo.com

²ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», Саратов;

³ГУЗ «Областной клинический центр комбустиологии», Саратов, e-mail: nvoistrovsky@mail.ru

Сравнивали ранозаживляющую активность двух стереоизоформ аскорбиновой кислоты и их солей с хитозаном (ХТЗ) при лечении ожога IIIБ степени у беспородных крыс. В работе были использованы *L*- и *D*-аскорбиновая кислота, чда, и ХТЗ со средневязкостной молекулярной массой 32 кДа и степенью деацетилирования 70 мольн. % (ЗАО «Биопрогресс», РФ). Применение гидрогеля *D*-аскорбата ХТЗ статистически значимо повышает среднюю линейную скорость заживления раны и темпы убыли площади раневой поверхности по сравнению с препаратом «Левомеколь-вет» («Агрофарм», Россия) и гидрогелем *L*-аскорбата ХТЗ. Сроки заживления ран под гидрогелем *D*-аскорбата ХТЗ на 10 суток короче, чем в контроле, и на 7 суток короче, чем под гидрогелем *L*-аскорбата ХТЗ.

Ключевые слова: хитозан, *L*- и *D*-изоформы аскорбиновой кислоты, ранозаживляющая активность, хиральность лекарственных веществ.

EVALUATION ASSESSMENT OF WOUND HEALING ACTIVITY OF *L*- AND *D*-ASCORBIC ACID ISOFORMS AND THEIR SALTS WITH CHITOSAN ON BURN MODEL IN RATS

Al-Zubaidi Adawia F.A.¹, Malinkina O.N.², Zudina I.V.², Kovaleva Ya.O.², Ksenofontova O.Yu.², Ostrovsky N.V.³

¹Department of microbiology, University of Diyala, Iraq, e-mail: adwa_a2000@yahoo.com;

²Saratov State University, Saratov, e-mail: ksenofontova64@mail.ru;

³Regional Clinical Center of Combustiology, Saratov, e-mail: nvoistrovsky@mail.ru

The wound healing activities of two ascorbic acid stereoisofoms and their chitosan (CHs) salts were compared in the treatment of third-degree burns in outbred rats. *L*- and *D*-ascorbic acids (analytical grade) and CHs (Bioprogress Ltd., RF) with a viscosity-averaged molecular weight of 32 kDa and a deacetylation degree of 70 wt. % were used. The application of our CHs *D*-ascorbate hydrogel significantly increased the average linear rate of wound healing and the shrinkage rate of wound surface area in comparison with Levomekol-vet[®] and our CHs *L*-ascorbate hydrogel. The wound healing duration under the CHs *D*-ascorbate hydrogel was by 10 days shorter than in the reference group, and by 7 days shorter than under the CHs *L*-ascorbate hydrogel.

Keywords: chitosan, *L*- and *D*-ascorbic acid isoforms, wound healing activity, drug chirality.

Лечение термических поражений до настоящего времени остается одной из наиболее сложных проблем, имеющих не только медицинскую, но и социально-экономическую значимость. Это связано с существенным удельным весом такого рода травм среди всех остальных видов повреждений (4.1-4.5%), высокими показателями летальности и инвалидизации, а также со значительными финансовыми затратами здравоохранения на проведение лечения и реабилитации пострадавших. Разнообразие медицинских препаратов на фармацевтическом рынке ставит врача-комбустиолога перед необходимостью подбора наиболее эффективных лекарственных средств в каждом конкретном случае, и этот выбор

должен основываться как на знании свойств препаратов, так и на оценке особенностей течения раневого процесса.

В настоящее время арсенал ранозаживляющих препаратов и перевязочных средств заметно расширился за счет фармацевтической продукции, имеющей в своем составе аминополисахарид хитозан (ХТЗ, 2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкан) [1; 8]. Этот уникальный полимер и его производные обладают не только ранозаживляющей, противовоспалительной и иммуностропной активностями, но и сильным биоцидным действием, что является крайне важным, поскольку раневая поверхность нуждается в антимикробной терапии с момента возникновения раны и до полного ее закрытия [9].

Показано, что более высокую биологическую активность проявляют водорастворимые соли ХТЗ, которые нередко используются в медицинских целях в виде гидрогелей, стабилизированных сеткой ковалентных и физико-химических связей (ионных, водородных) и гидрофобных взаимодействий [7; 10]. В ряде отечественных и зарубежных публикаций сообщается о хороших ранозаживляющих и противовоспалительных свойствах гидрогелей на основе аскорбата ХТЗ - соли ХТЗ и аскорбиновой кислоты (АК) [2]. В данном случае выбор АК в качестве органического лиганда в составе данной соли обусловлен, прежде всего, ее важностью для нормального развития репаративных процессов за счет стимуляции синтеза коллагена и пролиферации фибробластов.

Тем не менее хотелось бы отметить, что при конструировании новых препаратов, в том числе ранозаживляющих, следует учитывать существование тесной взаимосвязи между пространственной структурой веществ и их фармакологической активностью [6]. Известны случаи, когда только один из стереоизомеров лекарственного средства оказывает требуемое терапевтическое действие, а его хиральный антипод проявляет более слабую биологическую активность или вызывает нежелательные побочные эффекты. Бывает также, что каждый из стереоизомеров обладает своим специфическим действием. Так, например, у антигельминтного препарата левамизола активен исключительно S-стереоизомер, тогда как R-стереоизомер вызывает тошноту.

Соль аскорбата ХТЗ образована двумя оптически активными химическими соединениями: ХТЗ проявляет оптическую активность вследствие наличия асимметрично замещенных атомов углерода в глюкопиранозных циклах макромолекул, а асимметрический атом углерода в фурановом кольце молекулы АК обуславливает существование двух оптических диастереомеров, называемых L- и D-изоформами. И если L-АК (витамин С) отличается высокой биологической активностью, то в отношении D-изоформы имеется ряд сообщений о ее слабых коллагенстимулирующих свойствах. При промышленном синтезе АК получается, как правило, смесь ее L- и D-стереоизоформ в разных соотношениях, поэтому

препараты, содержащие искусственно полученную АК, могут существенно различаться своими фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами, что не может не отразиться на эффективности проводимого лечения. В литературе отсутствуют какие-либо сведения о влиянии знака вращения хирального органического лиганда на биологические свойства его соли с ХТЗ. В связи с этим целью данного исследования явилась сравнительная оценка ранозаживляющей активности препаратов на основе *L*- и *D*-аскорбатов ХТЗ.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили гидрогели на основе *L*- и *D*-аскорбатов АК, предоставленные специалистами отдела ВМС ОНИ НС и БС при ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», г. Саратов. В качестве исходных субстанций были использованы *L*- и *D*-стереоизоформы аскорбиновой кислоты ($C_6H_8O_6$) производства ООО «Люми» (г. Санкт-Петербург) и ЗАО «Вектон» (г. Санкт-Петербург), соответственно, аналитической степени чистоты, а также порошок водорастворимого ХТЗ со средневязкостной молекулярной массой 32 кДа и степенью деацетилирования 70 мольн.% (ЗАО «Биопрогресс», г. Щелково). Навески ХТЗ предварительно стерилизовали в ламинарном боксе NUAIRE Biological Safety Cabinets (Франция) в течение 15 мин. Гидрогели аскорбатов ХТЗ (ХТЗ·*L*-АК и ХТЗ·*D*-АК) готовили порционным смешиванием твердой навески ХТЗ с 9%-ными водными растворами *L*- или *D*-АК в количестве, обеспечивающем молярное соотношение ХТЗ : АК = 1 : 0.6. Для приготовления растворов использовали дистиллированную воду, дегазированную от CO₂ и O₂ кипячением при 100 °С в течение 1 ч.

В качестве животной модели использовали половозрелых беспородных крыс-самок с массой тела 220-250 г. Животных содержали по одной особи в клетке в стандартных условиях вивария с контролируемым режимом температуры (+24 °С) и освещения (в течение 12 ч) и свободным доступом к воде и пище. При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г. и требованиями Европейской конвенции по защите лабораторных животных. Все болезненные для крыс манипуляции выполняли под эфирным наркозом в условиях асептики.

Термические ожоги IIIБ степени воспроизводили контактным высокотемпературным способом в межлопаточной области крыс в проекции шейно-грудного отдела [3]. С этой целью участок кожи животных депилировали и наносили термическую травму путем прикладывания на 14 сек разогретой до +240 °С медной пластины (площадь поверхности – 225 мм²) с силой 1.6 н. На 3-и сутки сформировавшийся струп и патологически измененные ткани удаляли методом острой некрэктомии, при этом средняя площадь поверхности сочетанной раны составляла 304.2 ± 4.7 мм².

Далее крыс делили на три группы: контрольную (5 крыс) и две опытные (по 6 крыс). В контрольной группе животных лечили препаратом «Левомеколь-вет» (ООО НПП «Агрофарм», РФ) в соответствии с инструкцией по применению, нанося мазь тонким слоем на пораженную поверхность 1 раз в сутки ежедневно до выздоровления. Животным из экспериментальных групп на обнаженную раневую поверхность однократно наносили гидрогель ХТЗ·L-АК (группа № 1) или ХТЗ·D-АК (группа № 2) (рис. 1). Раневая поверхность не изолировалась от внешней среды, и заживление проходило под струпом.



Рис. 1. Нанесение гидрогеля ХТЗ·D-АК на поверхность ожоговой раны после острой некрэктомии

Оценку динамики заживления осуществляли планиметрическими методами. Сразу после некрэктомии и потом через каждые 3 суток на рану накладывали пластинку стерилизованного в автоклаве плотного целлофана с разметкой в виде квадратов (длина стороны ячейки - 2.5 мм), фломастером обводили контур раны или фотографировали.

Абсолютную площадь (S , мм²) поверхностного дефекта кожи рассчитывали по формуле (1), предложенной Ф.Я. Божиновой [5]:

$$S = (n + \frac{1}{2}k) \cdot C, \quad (1)$$

где n - количество квадратов размером 2.5×2.5 мм², полностью находящихся в пределах контура раны; k - количество квадратов размером 2.5×2.5 мм², частично находящихся в пределах контура раны; C - площадь одного квадрата размером 2.5×2.5 мм².

Относительную убыль площади поверхности раны (ΔS , %) вычисляли по формуле (2):

$$\Delta S = \frac{(S_o - S_t) \cdot 100\%}{S_o \cdot t}, \quad (2)$$

где S_o - площадь раневой поверхности при предшествующем измерении; S_t - площадь раневой поверхности через промежуток времени t .

Величину периметра раны (P , мм) определяли с помощью курвиметра по обведенному контуру на целлофановой пластине. Среднюю линейную скорость заживления ожоговой раны (v , мм²/сут) вычисляли по формуле (3) [4]:

$$v = \frac{2 \cdot (S_o - S_t)}{t \cdot (P_o + P_t)}, \quad (3)$$

где P_o и S_o - периметр и площадь раневой поверхности при предшествующем измерении; P_t и S_t - периметр и площадь раневой поверхности через промежуток времени t .

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью методов непараметрического анализа с использованием пакетов прикладных программ Statistica 8.0 for Windows (StatSoft-Russia) и Microsoft Office Excel 2007. Количественные показатели представлены в виде $M \pm m$, где M – среднеарифметическое значение, а m – стандартная ошибка среднеарифметического значения. Критический уровень значимости - $p < 0.05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Общий срок заживления открытой раны определяется скоростью течения репаративно-регенеративного процесса, направленного на постепенное уменьшение раневой поверхности вплоть до ее полного закрытия. В связи с этим об эффективности ранозаживляющего действия того или иного препарата можно судить по темпам убыли площади поверхности раны [3-5]. В клинической практике для объективизации оценки темпов заживления поверхностных дефектов используют планиметрические методы, которые, как правило, включают замер контура раны через определенные промежутки времени и вычисление на основе полученных данных процента сокращения площади раневой поверхности за единицу времени.

На рисунке 2 представлены графики, отражающие результаты планиметрии ожоговых ран у крыс в динамике лечения с помощью гидрогелей ХТЗ·L-АК и ХТЗ·D-АК и препарата «Левомеколь-вет».

Как видно из рисунка 2, на двух участках графиков - с 1-х по 3-и сутки и с 3-х по 21-е сутки - зависимость средних величин площади поверхности ран S от времени t близка к линейной; а на третьем участке – с 21-х по 39-е сутки - кривая $S(t)$ сильно выполаживается. Наиболее высокими темпами уменьшение абсолютных значений площади раневой поверхности шло в ранний период (с 1-х по 3-и сутки) у крыс из экспериментальных групп № 1 и № 2. Динамика сокращения площади ран под гидрогелем ХТЗ·D-АК была выше во все сроки наблюдения.

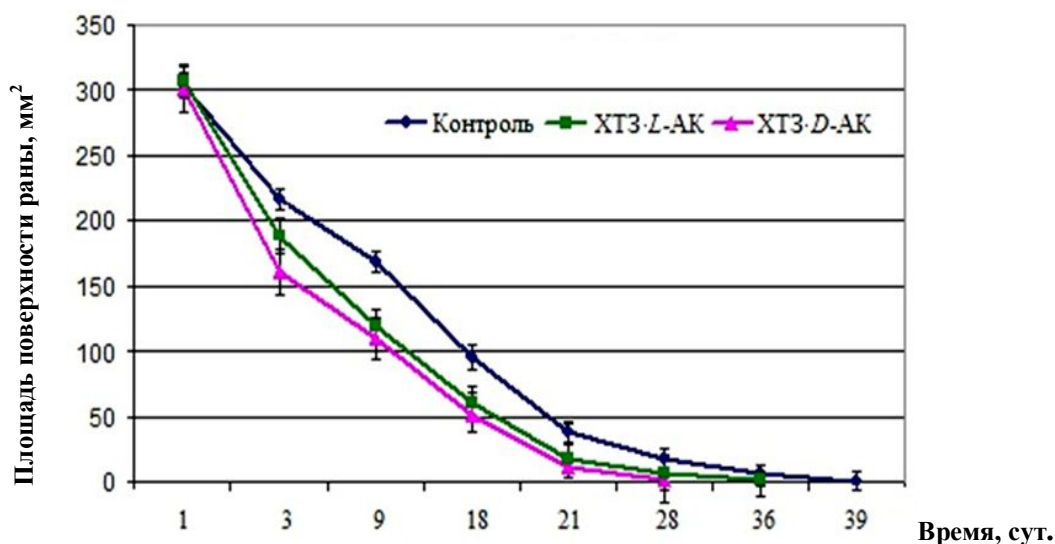


Рис. 2. Динамика изменения средних величин площади поверхности ожоговой раны (S , мм^2) у крыс на фоне применения гидрогелей XT3-L-AK и XT3-D-AK и препарата «Левомеколь-вет» (контроль)

Однако данный планиметрический метод не принимает во внимание тот факт, что заживление плоскостных ран происходит по периметру, а, как известно, раны с равной площадью поверхности могут иметь разные периметры, и при одинаковой скорости регенераторных процессов темпы убыли площади раневой поверхности будут выше у ран с бóльшим периметром. Более того, при условии равенства скоростей регенераторных процессов отношение величины периметра раны к ее площади будет разным у ран с различными размерами, так как при уменьшении размеров раны ее периметр уменьшается линейно, а площадь квадратично [4].

Учитывая вышеизложенное, у подопытных крыс в динамике лечения были определены периметры ран и рассчитаны средние линейные скорости заживления (v , $\text{мм}^2/\text{сут}$) методом, предложенным Е.Ю. Осинцевым и А.Б. Слободским (1998) [4]. По данным, приведенным в таблице, в период с 1-х по 3-и сутки после некрэктомии убыль площади раневой поверхности и скорость заживления ран у крыс из экспериментальных групп № 1 и № 2 была статистически значимо выше по сравнению с аналогичными показателями в контроле. В группе № 2 (XT3-D-AK) убыль величины S была максимальной (15.5% в сутки) и статистически значимо превышала аналогичные показатели в контроле (9.7%) и в группе № 1 (12.9%).

К концу 2-х суток у крыс из контрольной группы на поверхности раны образовалась плотная корочка из форменных элементов свернувшейся крови, высохшего экссудата,

лимфы, фибрина и др. (рис. 3). У крыс из опытных групп в формировании раневой корочки принимали участие также затвердевшие хитозановые гели. В связи с этим начиная с 3-х суток во всех группах животных ожоговые раны заживали под струпом, и об изменении площади раневой поверхности можно было судить только по сокращению размеров раневой корочки в результате ее подсыхания и частичной резорбции. Это объясняет, почему убыль площади поверхности ран у всех крыс в данный период времени шла близкими темпами – со средней линейной скоростью 0.3 мм²/сут (таблица). Скорость эпителизации раны можно было установить лишь при условии иссечения струпа, однако это не предполагалось условиями данного эксперимента.

Убыль площади раневой поверхности (ΔS , %) и средняя линейная скорость заживления (v , мм²/сут) ожоговой раны у крыс после некрэктомии в различные сроки наблюдения

Группы	Период наблюдения					
	с 1-х по 3-и сут		с 3-х по 21-е сут		с 21-х по 28-е сут	
	ΔS , %	v , мм ² /сут	ΔS , %	v , мм ² /сут	ΔS , %	v , мм ² /сут
Контроль	9.7	0.5	4.7	0.3	8.7	0.1
Группа № 1 (ХТЗ·L-АК)	12.9*	0.7*	5.0	0.3	8.3	0.1
Группа № 2 (ХТЗ·D-АК)	15.5*. [#]	0.8*. [#]	5.2	0.3	14.3*. [#]	0.2*. [#]

Примечание: (*) – статистически значимое различие с аналогичным показателем в контрольной группе (U -критерий Манна-Уитни, $p \leq 0.05$); ([#]) - статистически значимое различие с аналогичным показателем в группе № 1 (U -критерий Манна-Уитни, $p \leq 0.05$).

Во всех группах крыс отторжение раневой корочки и полное очищение поверхности ран завершалось к 21-м суткам. Это позволило установить, что средняя линейная скорость заживления в результате эпителизации и рубцевания ран в период с 21-х по 28-е сутки была в 2 раза выше в группе № 2 по сравнению с аналогичными показателями в двух других группах (таблица). Средний срок заживления раны в контрольной группе составил 39 ± 9.6 суток, в группе № 1 - 36 ± 10.4 суток, а в группе № 2 - 29 ± 8.5 суток.

Заключение

Проведенные исследования показали, что крысы хорошо переносят местное применение гидрогелей на основе L- и D-аскорбатов ХТЗ. Присутствие препаратов на ране не оказывает раздражающего и токсического действия, не вызывает аллергические или

какие-либо иные отрицательные реакции у подопытных животных. За весь период наблюдения не было отмечено ни одного случая нагноения раны или осложненного течения раневого процесса. При выполнении планиметрии было установлено, что заживление ожога IIIБ степени у крыс протекает более высокими темпами на фоне применения аскорбатов ХТЗ по сравнению с группой контроля, в которой животных лечили препаратом «Левомеколь-вет». Причем наиболее высокие темпы репаративно-регенеративных процессов в группах крыс № 1 и № 2 отмечались в ранние сроки сразу после проведения острой некрэктомии. По всей видимости, это связано со способностью молекул ХТЗ вызывать быстрое купирование воспалительных процессов в поврежденных тканях за счет альтернативной активации тканевых макрофагов и подавления продукции медиаторов воспаления (ФНО α , ИЛ-8 и др.) [2; 11].



Рис. 3. Динамика заживления ожоговых ран IIIБ степени у крыс на фоне лечения препаратом «Левомеколь-вет» (контроль) и гидрогелями ХТЗ·L-АК (Группа № 1) и ХТЗ·D-АК (Группа № 2)

Кроме того, как недавно было показано, фибробласты при непосредственном контакте с ХТЗ начинают в высоких концентрациях синтезировать такие ангиогенные факторы, как VEGF и GM-CSF, что необходимо для инициации процессов неоваскуляризации и ангиогенеза [11]. Быстрый переход воспалительного процесса в пролиферативную фазу и

восстановление микроциркуляторного русла являются определяющими для обеспечения скорейшего заживления раны и восстановления целостности кожного покрова.

По имеющимся в научной литературе немногочисленным данным, известно, что *D*-АК значительно уступает *L*-АК по способности стимулировать синтез коллагена и пролиферацию фибробластов [12]. Однако в наших экспериментах было установлено, что использование *D*-АК в качестве органического лиганда в составе соли с ХТЗ обеспечивало гидрогелю ХТЗ·*D*-АК более высокую ранозаживляющую активность. Так, сроки заживления ран под гидрогелем *D*-аскорбата ХТЗ были на 10 суток короче, чем в контроле, и на 7 суток короче, чем под гидрогелем *L*-аскорбата ХТЗ, а средняя линейная скорость заживления раны и темпы убыли площади раневой поверхности были статистически значимо выше, чем при использовании гидрогеля *L*-аскорбата ХТЗ. Молекулярные механизмы наблюдаемого явления еще предстоит установить. Тем не менее уже сейчас становится очевидным, что стереоизомеры АК, взаимодействуя с хиральными молекулами на поверхности клеток, могут оказывать разное по силе воздействие.

Выражаем глубокую благодарность Российскому фонду фундаментальных исследований и Министерству высшего образования и науки Ирака за оказанную материальную поддержку первому автору при выполнении данной работы.

Список литературы

1. Большаков И.Н. Биодegradируемые раневые покрытия на основе полисахаридных полимеров в лечении обширной ожоговой травмы (клиническое исследование) / И.Н. Большаков, А.В. Еремеев, Д.В. Черданцев, А.В. Каскаев, А.К. Кириченко, А.А. Власов, А.Н. Сапожников // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. Пластическая хирургия. - 2011. - Т. 38, № 3. - С. 56-62.
2. Иванов П.В. Патогенетическое обоснование и внедрение в практику новых регенеративных методов лечения генерализованного пародонтита : автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Саратов, 2013. – 50 с.
3. Клебановас Ю. Влияние препарата рекомбинантного гормона роста человека биосомы на процесс заживления глубокого ожога кожи крыс / Ю. Клебановас, Л. Лашас, Д. Лашене // Пробл. эндокринологии. - 2005. - № 1. - С. 42-46.
4. Осинцев Е.Ю., Слободской А.Б. Способ определения скорости заживления раневой поверхности : Пат. 2102755. Российская Федерация. Кл. G01N 33/483. Заявл.06.08.93. Опубл. 1998.

5. Пахомова А.Е. Новый способ экспериментального моделирования термических ожогов кожи у лабораторных животных, отвечающий принципам Good Laboratory Practice (надлежащей лабораторной практики) / А.Е. Пахомова, Ю.В. Пахомова, Е.Е. Пахомова // Медицина и образование в Сибири. - 2015. - Вып. № 3.
6. Смирнова И.Г. Оптическая изомерия и биологическая активность лекарственных средств / И.Г. Смирнова, Г.Н. Гильдеева, В.Г. Кукес // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. - 2012. - Т. 53, № 3. - С. 47-156.
7. Шиповская А.Б. Новые антимикробные препараты на основе комплексных солей хитозана с хиральным органическим лигандом / А.Б. Шиповская, И.В. Зудина, В.И. Фомина, О.Н. Малинкина // Бутлеровские сообщения. - 2015. - Т. 41, № 3. - С. 82-94.
8. Patrulea V. Chitosan as a starting material for wound healing applications / V. Patrulea, V. Ostafe, G. Borchard, O. Jordan // European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik E V 97(Pt B). - 2015. - P. 417-426.
9. Raafat D. Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey / D. Raafat, H.-G. Sahl // Microb Biotechnol. - 2009. - Vol. 2, № 2. - P. 186-201.
10. Tang F. Preparation and characterization of N-chitosan as a wound healing accelerator / F. Tang, L. Lv, F. Lu, B. Rong, Z. Li, B. Lu., K. Yu, J. Liu, F. Dai, D. Wu, G. Lan // International Journal of Biological Macromolecules. - 2016. – URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.101>.
11. Зудина И.В. Изучение воздействия хитозана на процесс заживления костного дефекта в экспериментах *in vivo* и *in vitro* / И.В. Зудина, А.П. Ведяева, Н.В. Булкина, П.В. Иванов, А.Ф.А. Альзубаиди // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. - 2016. - Т. 16, вып. 2. - С. 171-179.
12. Robertson W.V. D-Ascorbic acid and collagen synthesis // Biochim. Biophys. Acta. - 1963. - Vol. 74. - P. 135-137.