ИССЛЕДОВАНИЕ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕГО ЭФФЕКТА АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И 5,10,15,20-ТЕТРАКИС(4'-КАРБОКСИЛФЕНИЛ) ПОРФИРИНА ПРИ ИХ ИММОБИЛИЗАЦИИ НА ПОВЕРХНОСТИ МОДИФИЦИРОВАННОГО НЕТКАНОГО ПОЛИПРОПИЛЕНОВОГО МАТЕРИАЛА

Криштоп В.В.¹, Томилова И.К.¹, Ленчер О.С.¹, Алексахина Е.Л.¹, Клюева М.Е.¹, Пахрова О.А.¹, Горнухина О.В.², Вершинина И.А.³

С целью создания новых раневых покрытий исследован ранозаживляющий эффект биологически активных соединений, таких как ацетилсалициловая кислота и 5,10,15,20-тетракис(4'-карбоксилфенил) порфирин, иммобилизованных на поверхности модифицированного нетканого полипропиленового материала. Активация поверхности полипропиленовых материалов проведена методом структурнохимической модификации поливиниловым спиртом. После моделирования у 30 самцов крыс аутбредного стока Вистар раневого дефекта на кожном покрове межлопаточной области рана закрывалась повязкой. Животные были разделены на три группы: группу сравнения (10 крыс), экспериментальную группу № 1 (10 крыс), в которой на материале повязки был иммобилизирован аспирин, и экспериментальную группу № 2 (10 крыс), на нетканом материале повязки которых был иммобилизирован. Проведено гистологическое исследование регенерата в области раневого дефекта. В результате через 21 сутки исследования выявлено сокращение сроков реэпителизации в экспериментальных группах по отношению к группе сравнения. Воздействие нетканого материала, содержащего иммобилизованный аспирин, сопровождалось развитием в эпидермисе кожи вакуольной дистрофии. Формирование более полноценного регенерата отмечено в экспериментальной группе № 2 (на нетканом материале повязки животных был иммобилизирован 5,10,15,20-тетракис(4'карбоксилфенил) порфирин). Это сопровождалось ростом толщины эпидермиса и достоверно большим количеством придатков кожи, локализующихся в области регенерата.

Ключевые слова: раны, крысы, раневые повязки, иммобилизация соединений, полипропилен, сополимеризация, порфирин, аспирин.

INVESTIGATION OF HEALING EFFECT OF ACETYLSALICYLIC ACID AND 5,10,15,20-TETRAKIS (4'-CARBOXYLPHENYL) PORPHYRIN IN THEIR IMMOBILIZATION ON THE SURFACE OF THE MODIFIED NONWOVEN POLYPROPYLENE MATERIAL

Chrishtop V.V.¹, Tomilova I.K.¹, Lencher O.S.¹, Aleksakhina E.L.¹, Klyueva M.E.¹, Pakhrova O.A.¹, Gornukhina O.V.², Vershinina I.A.³

Investigation of healing effect of acetylsalicylic acid and 5,10,15,20-tetrakis (4'-carboxylphenyl) porphyrin in their immobilization on the surface of the modified nonwoven polypropylene material. The wound healing effect of biologically active compounds such as acetylsalicylic acid and 5,10,15,20-tetrakis (4'-carboxylphenyl) porphyrin immobilized on the surface of a modified non-woven polypropylene material was investigated to create new wound coverings. The surface activation of polypropylene materials was carried out by the method of structural-chemical modification with polyvinyl alcohol. After modeling in 30 male rats of outbred Wistar drainage on the skin of the interlobular region of the wound defect, the wound was closed with a bandage. The animals were divided into three groups: the comparison group (10 rats), the experimental group No.1, in which aspirin and experimental group No.2 were immobilized on the bandage material, and the bandage was immobilized on the nonwoven material. A histological examination of the regenerate in the area of the wound defect was carried out. As a result, after 21 days of the study, a reduction in the periods of re-epithelialization in the experimental groups with respect to the comparison group was revealed. The effect of the nonwoven material containing immobilized aspirin was accompanied in the epidermis of the skin by the development of vacuolar

 $^{^{1}}$ ФГБОУ ВО Ивановская государственная медицинская академия Минздрава РФ, Иваново, e-mail: chrishtop@mail.ru;

² НИИ химии макрогетероциклических соединений «ИГХТУ», Иваново;

³Институт химии растворов Российской академии наук, Иваново

¹Federal State Budgetary Institution of Higher Professional Education «Ivanovo State Medical Academy» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Ivanovo, e-mail: chrishtop@mail.ru;

² Ivanovo State University of Chemistry and Technology, Ivanovo;

³G.A. Krestov Institute of Solution Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Ivanovo

dystrophy. The formation of a more complete regenerate was noted in the experimental group No.2 (5,10,15,20-tetrakis (4'-carboxylphenyl) porphyrin was immobilized on the non-woven material of the animal dressing, which was accompanied by an increase in the thickness of the epidermis and a significant number of skin appendages localized in the region of the regenerate .

Keywords: wounds, rats, wound dressings, immobilization of compounds, polypropylene, with polymerization, porphyrin, aspirin.

В структуре общей смертности от различных травм колото-резаные повреждения кожного покрова занимают одну из лидирующих позиций. Кроме того, они наносят экономический ущерб, связанный с временной нетрудоспособностью, которая затрагивает, как правило, наиболее молодые и социально активные группы населения [1, 2]. В связи с этим проблема ранозаживления на протяжении многовековой истории хирургии остается актуальной [3]. Использование раневого покрытия обеспечивает более эффективное лечение ожогов, ран и трофических язв. На сегодняшний день в клинической практике успешно применяется более 300 видов природных и синтетических раневых покрытий [4]. Так, полипропилен является одним из наиболее используемых медицинских материалов, что обусловлено его высокой инертностью по отношению к биологической среде организма. Поэтому он может быть идеальным полимером — носителем биологически активных соединений при создании комплексных материалов с терапевтическим эффектом [5].

Одним распространенных лекарственных ИЗ самых препаратов ограничивает ацетилсалициловая кислота. которая развитие экссудативной пролиферативной фаз воспаления, ингибируя действие циклооксигеназ и синтез простагландинов [6], последние играют значительную роль в обеспечении механизмов ранозаживления. Однако при пероральном применении этого соединения отмечен ряд побочных эффектов: аллергические реакции, тромбоцитопении и т.п. представляется продуктивным исследовать биологические эффекты этого соединения на местном уровне, исключая системные эффекты, что может быть достигнуто за счет иммобилизации на материале повязки [7].

Вторым направлением эффективности ранозаживляющих механизмов и снижения альтерации является борьба с микробной контаминацией раны, одним из примеров которой может быть бактерицидная и бактериостатическая эффективность порфиринов [7]. Для применения в биологических объектах наиболее перспективны порфириновые соединения, растворимые в воде при значениях рН, близких к нейтральным. Одно из таких соединений — 5,10,15,20-тетракис(4'-карбоксилфенил) порфирин, который является водорастворимым катионным производным порфиринов [8].

Области применения рассмотренных выше соединений можно значительно расширить за счет создания самоорганизующихся координационных систем. Однако порфириновые макромолекулы очень объемны, вследствие этого стерические препятствия

значительно затрудняют их иммобилизацию на поверхности полимерного носителя. Предварительная модификация поверхности полипропилена поливиниловым спиртом позволяет это избежать, так как привитые макромолекулы поливинилового спирта играют роль спейсера для дальнейшей иммобилизации аспирина и порфирина, однако выраженность биологических, ранозаживляющих эффектов соединений при этом может измениться.

Целью исследования являлась оценка морфофункционального состояния раневого дефекта при использовании раневых покрытий из модифицированного нетканого полипропиленового материала, на поверхности которого произведена иммобилизация ацетилсалициловой кислоты и 5,10,15,20-тетракис(4'-карбоксилфенил) порфирина.

Материал и методы исследования

В эксперименте использованы ацетилсалициловая кислота 99%-ная («Acros organics» Belgium, Geel) и 5,10,15,20-тетракис(4'-карбоксилфенил) порфирин (рис. 1).

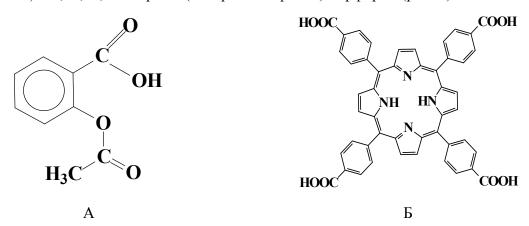


Рис. 1. Химические формулы иммобилизованных соединений:

A — ацетилсалициловая кислота. E — 5,10,15,20-тетракис(4'-карбоксилфенил) порфирин

55,10,15,20-тетракис(4'-карбоксилфенил) порфирин синтезирован по методике [9]. Поверхность образцов полипропилена подвергали химической активации 20%-ным водным раствором гидроксида в присутствии катализатора FeSO4×7H2O (c=0,0043 моль/л) при температуре кипения в течение 2 ч и промывали дистиллированной водой. Впоследствии химически активированная поверхность изучаемых образцов полипропилена подвергалась структурно-химической модификации поливинилового спирта [10]. Для изучения состава поверхностного слоя материалов был использован метод ИК МНПВО (спектрофотометр «Аvatar 360» FT-IR ESP) в диапазоне волновых чисел 400–4000 см⁻¹. Использовалась призма МНПВО, изготовленная из кристаллического селенида цинка. Угол падения луча на границу раздела сред составлял 45, число отражений 12. Накопление сигнала было проведено по результатам 132 сканирований.

Поверхность полипропилена была предварительно химически активирована последующей ее модификацией поливиниловым спиртом. В результате щелочного травления поверхности полипропиленового материала образуются кислородсодержащие группировки. Полученные данные позволяют полагать, что поливиниловый прививается химически активированной поверхности полипропилена путем полимераналогичных превращений и могут выступать В качестве спейсера для иммобилизации биологически активных соединений. Посредством этих групп были иммобилизованы аспирин и 5,10,15,20-тетракис(4'-карбоксилфенил) порфирин [7].

Исследование биологической активности выполнено на 30 белых крысах линии Вистар. Для формирования раны заранее, за 2 суток, в межлопаточной области животного удаляли шерсть с помощью лезвия и депиляционного крема, впоследствии операционное поле обрабатывали 0,05%-ным раствором хлоргексидина, после чего формировали полнослойную рану площадью 4 см². Все участвующие в исследовании животные были разделены на 3 группы. В группе сравнения крысам (n=10) ежедневно накладывалась повязка из модифицированного нетканого полипропиленового материала. В экспериментальной группе № 1 животным (n=10) накладывалась повязка из модифицированного нетканого полипропиленового материала, на котором был иммобилизирован аспирин. Животным экспериментальной группы № 2 (n=10) накладывалась повязка из модифицированного нетканого полипропиленового материала, на котором был иммобилизирован 5,10,15,20-тетракис(4'-карбоксилфенил) порфирин. На протяжении 21 суток животные подвергались ежедневному клиническому наблюдению, после чего выводились из эксперимента.

Для регистрации динамики ранозаживления (размеров раневого дефекта), а также для визуальной оценки состояния раны (для исключения развития раневых осложнений и оказания в случае необходимости животному необходимой ветеринарной помощи в соответствии со стандартами) повязка менялась ежедневно. Общее состояние животного тоже оценивалось ежедневно. При работе с животными мы руководствовались требованиями Европейской конвенции по охране позвоночных животных, используемых в эксперименте, а также директивами -86/609/EEC [11]. Выведение из эксперимента и обезболивание осуществлялись в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Иссеченный фрагмент регенерата фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине.

После стандартной гистологической проводки срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Макроскопическую оценку состояния ран проводили на 3-, 9-, 14-й день эксперимента. Для количественной оценки ранозаживляющего эффекта измеряли диаметр раны в каждые из представленных выше суток эксперимента с последующим

расчетом ее площади (см²). На гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, определялась толщина росткового слоя, включающего в себя базальные, парабазальные и зернистые кератиноциты, в микрометрах (мкм²).

Статистический анализ первичных данных проводили методами дисперсионного анализа. Динамика массы тела была представлена в процентах по отношению к показателям животного, определенным до начала эксперимента. На основе полученных первичных данных рассчитывали среднее значение и его стандартную ошибку. Статистическую значимость различия средних изучаемых групп оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Данные считали достоверными при p<0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

В исследованиях была показана стадийность раневого процесса: в первые три дня после операции животные были вялыми и адинамичными, снижалось потребление корма, потеря массы тела крыс во всех группах в среднем составила 9±3% от исходной массы тела.

На 3-и сутки после моделирования площадь раневого дефекта также не имеет достоверных отличий: до аппликации во всех исследуемых группах она составляла 4,0±0,2 см², на 3-и сутки после операции 3,8±0,2 см²; 3,7±0,3 см²; 3,7±0,3 см² у группы сравнения, экспериментальной группы № 1 и экспериментальной группы № 2 соответственно. На 9-й день исследования средняя площадь раневого дефекта у экспериментальных групп достоверно отличалась от аналогичного показателя группы сравнения (р<0,05). Она составила 2,6±0,2 см² в группе сравнения; 2,3±0,3 см² – в экспериментальной группе № 1; 2,1±0,3 см² – в экспериментальной группе № 2. На 14-й день после операции было отмечено достоверное отличие между средней площадью раневого дефекта у экспериментальных групп между собой и по сравнению с показателем контрольной группы (р<0,05). Для группы сравнения площадь раневого дефекта составила 1,5±0,3 см²; 1,2±0,3 см² – в экспериментальной группе № 2 (табл. 1).

Таблица 1 Динамика площади раневого дефекта (см²)

	Сутки эксперимента			
Группа животных	После	3	9	14
	моделирования			
Группа сравнения	4,0±0,2 см ²	$3,8\pm0,2 \text{ cm}^2$	$2,6\pm0,2 \text{ cm}^2$	1,5±0,3 cm ²
Экспериментальная группа № 1	4,0±0,2 см ²	$3,7\pm0,3 \text{ cm}^2$	$2,3\pm0,3 \text{ cm}^2$	1,2±0,3 cm ²
Экспериментальная группа № 2	4,0±0,2 см ²	$3,7\pm0,3 \text{ cm}^2$	$2,1\pm0,3 \text{ cm}^2$	$0.8\pm0.2~{\rm cm}^2$

Одним из важных факторов, обеспечивающих качество репаративных процессов регенерата, является состояние многослойного плоского эпителия, покрывающего раневой дефект. Так, в группе сравнения в краях эпителия области раневого дефекта толщина росткового слоя составила $23,5\pm0,3$ мкм, в экспериментальной группе № 1 (аспирин) — $26,6\pm0,2$ мкм и в экспериментальной группе № 2 (5,10,15,20-тетракис(4'-карбоксилфенил) порфирин) — $25,6\pm0,2$ мкм.

Вместе с тем у животных экспериментальной группы № 1 (аспирин) обращает на себя внимание снижение количества и размеров базофильных гранул в зернистом слое эпидермиса, покрывающего регенерат, которое можно трактовать как снижение количества кератогиалина и замедление процессов ороговения. Также характерны увеличение ядер парабазальных и шиповатых кератиноцитов, снижение количества последних, рост размеров клеток и просветление цитоплазмы. В целом вышеописанные изменения характеризуют снижение дифференцировки кератиноцитов и, как следствие, уменьшение защитных свойств эпителия. Вероятно, механизм формирования этих изменений аналогичен феноменам, наблюдаемым в эпителии желудка и двенадцатиперстной кишки при развитии аспириновых язв, и механизму аналогичных нарушений, возникающих при приеме нестероидных противовоспалительных средств: вакуолизация цитоплазмы, вакуолизация, или, наоборот, пикноз ядер эпителиоцитов [12]. В многослойном плоском ороговевающем эпителии кожи у животных экспериментальной группы № 1 при этом наблюдаются снижение толщины рогового слоя и увеличение количества межклеточного вещества между корниоцитами (рис. 2).

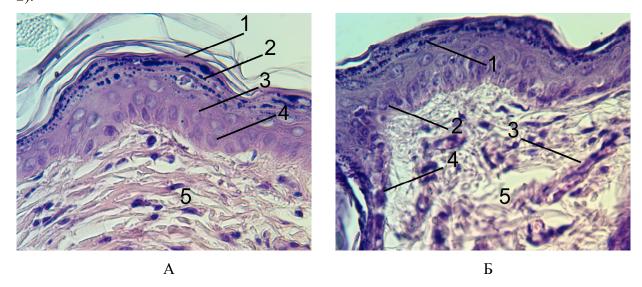


Рис. 2. Эпидермис, покрывающий регенерат. Окраска гематоксилином и эозином Примечание. Объектив 40. Фрагмент фотографии (цифровое увеличение 2 раза). А. Экспериментальная группа № 1 (аспирин). 1 — тонкий роговой слой; 2 — сниженное количество гранул кератогиалина в кератиноцитах зернистого слоя; 3 — низкодифференцированные парабазальные клетки с большим округлым ядром и большим количеством межклеточного вещества; 4 — клетки базального слоя; 5 — соединительная

ткань регенерата. Б. Эпидермис животного экспериментальной группы № 2 (порфирин). 1 – базофильные гранулы кератогиалина в кератиноцитах зернистого слоя; 2 – клетки базального слоя эпидермиса; 3 – новообразованные сосуды в соединительной ткани регенерата; 4 – формирование придатков кожи; 5 – соединительная ткань регенерата.

Со стороны подлежащей под эпителием плотной волокнистой неоформленной соединительной ткани фрагменты регенератов экспериментальных групп № 1 и № 2 характеризуются более выраженной пролиферацией фибробластов в субэпителиальной зоне регенерата. Это может свидетельствовать о более полном восстановлении раневого дефекта по сравнению с тканями группы сравнения и, как следствие, о сохранении ранозаживляющего эффекта данных изучаемых изделий при их иммобилизации. Также на микропрепаратах регенерата экспериментальной группы № 2 отмечено более частое и полноценное формирование придатков кожи и сосудов гемомикроциркуляторного русла. Ни на одном из изучаемых микропрепаратов регенерата не было выявлено очагов лимфогистиоцитарной инфильтрации. Последнее также можно рассматривать как показатель, характеризующий успешное заживление раневого дефекта. Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что иммобилизация представленных выше соединений на нетканом полипропиленовом материале не только сохраняет их ранозаживляющие механизмы, но и формирует новые, тестирование которых in vitro затруднено.

Из всех представленных образцов наиболее выраженный ранозаживляющий эффект характерен для повязки из нетканого полипропиленового материала с иммобилизованным на ней порфирином. Этот образец ускоряет реэпителизацию и способствует образованию более полноценного регенерата. Проведенное исследование открывает дальнейшие перспективы в создании гелей и мазей на основе иммобилизованного на поверхности модифицированного нетканого полипропиленового материала 5,10,15,20-тетракис(4'-карбоксилфенил) порфирина.

Модификация полимерного материала и исследование его физико-химических характеристик проведены в рамках выполнения государственного задания проект № 4.7305.2017/8.9 и с использованием ресурсов Центра коллективного пользования научным оборудованием Φ FbOy BO «ИГХТУ».

Исследование ранозаживляющего эффекта образцов нетканого полимерного материала в эксперименте выполнено в рамках выполнения государственного задания ФГБОУ ВО «ИвГМА» Минздрава России на 2018 год и плановый период 2019 и 2020 годов «Исследование биомедицинских эффектов макрогетероциклических соединений с противоопухолевой активностью для разработки новых лекарственных средств».

Список литературы

- 1. Бадяев В. В. Судебно-медицинская диагностика резаных повреждений кожного покрова по признаку остроты лезвия : автореф. дис. ... канд. мед. наук. Москва, 2014. 22 с.
- 2. Волокитина Е. А., Демидов В. А. Опыт организации медицинской помощи пострадавшим с сочетанной травмой в условиях травмоцентра 1-го уровня // Вестник Ивановской медицинской академии. 2017. Т. 22, № 4. С. 51-52.
- 3. Kong M., Chen X.G., Xing K. Park Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. International journal of food microbiology. 2010. Vol. 144. № 1. P. 51–63. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012.
- 4. Андреев Д. Ю., Парамонов Б.А., Мухтарова А.М. Современные раневые покрытия Ч. I // Вестн. хирургии им. И. И. Грекова. 2009. Т. 168, № 3. С. 98–102.
- 5. Razumov M., Gornukhina O., Golubchikov O., Vershinina I., Vashurin A. Polypropylene suture material with anti-inflammatory action. Iranian Polymer Journal. 2018. V.7. P. 629–634. DOI: 10.1007/s13726-018-0639-0.
- 6. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая Волна, 2006. 1200 с.
- 7. Вершинина И.А., Горнухина О.В., Голубчиков О.А. Иммобилизация 5,10,15,20-тетракис(4'-карбоксилфенил)порфирина на поверхность модифицированной полипропиленовой пленки // Российский химический журнал. 2014. Т. 58. № 3-4. С. 86-90.
- 8. Matsumoto J., Shinbara T., Tanimura S., Matsumoto T. et all. Water-soluble phosphorus porphyrins with high activity for visible light-assisted inactivation of Saccharomyces cerevisiae. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. 2011 V. 218. N.1. P.178-184. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2011.01.002.
- 9. Salnikova M.A., Lubimova T.V., Syrbu S.A., Semeikin A.S. Phenyl Substituted Porphyrins. 6. Acylation of Alcohols with Carboxyphenylporphyrins. Macroheterocycles. 2016. 9(2). P. 141-150. DOI: 10.6060/mhc151086s.
- 10. Горнухина О.В., Вершинина И.А., Голубчиков О.А. Исследование поверхностной структурно-химической модификации полипропиленовых пленок поливиниловым спиртом // Изв. Вузов. Хим. и химич. Технология. 2012. Т. 55, Вып. 1. С. 68-74.
- 11. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasburg: Council of Europe, 1986. 51 p.
- 12. Черанёва М.В. Воспроизведение в эксперименте и терапия химического гастрита у животных: дис. ... канд. биол. наук. Пермь, 2012. 204 с.