

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ ПОЛИЛАКТИДНОГО МИКРОКАМЕРНОГО РАНЕВОГО ПОКРЫТИЯ В ОБЛАСТИ ПОЛНОСЛОЙНОЙ КОЖНОЙ РАНЫ

Иванов А.Н.¹, Сахань М.А.¹, Ермаков А.В.¹, Ленгерт Е.В.¹, Савкина А.А.¹,
Степанова Т.В.¹, Лойко Д.Д.¹, Смышляева И.В.¹, Федоров А.Н.¹, Кириязи Т.С.¹

¹ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Минздрава России, Саратов, e-mail: maksimsahan425@gmail.com

Травматические повреждения кожного покрова – актуальная проблема современной медицины, что заставляет искать новые подходы к лечению данной патологии. Перспективным решением проблемы является применение раневых поверхностей из полилактида. В настоящее время появилась возможность модернизировать используемый ранее полилактид с однородной структурой за счет изменения микроархитектоники полимера и включения в его структуру микрорезервуаров для активных веществ. Изменение структуры полимера создает риск непредсказуемых реакций *in vivo*. Целью настоящего исследования явилась оценка биосовместимости полилактидного микрокамерного раневого покрытия в области экспериментальной кожной раны при помощи морфологического анализа тканей. Исследование проводилось на крысах-самцах, разделенных на три группы: контрольную группу (10 intactных животных), группу сравнения (30 крыс, которым выполнена модель острой эксцизионной кожной раны), опытную группу (30 крыс, которым выполнена модель острой эксцизионной кожной раны, которая была закрыта полилактидным микрокамерным раневым покрытием). В результате исследований выявлено, что после формирования острой экспериментальной эксцизионной кожной раны отмечаются характерные гистоморфологические изменения в тканях, связанные с воспалительным процессом и ремоделированием. Применение полилактидного раневого покрытия не усугубляет течение раневого процесса, а в некоторых аспектах даже способствует более быстрому заживлению. Основываясь на результатах исследования, можно сделать однозначный вывод, что микрокамерное раневое покрытие из полилактида является полностью биосовместимым.

Ключевые слова: полилактид, раневые покрытия, морфология, раневой дефект кожи.

MORPHOLOGICAL ASSESSMENT OF THE BIOSCOMPATIBILITY OF POLYLACTIDE MICRO-CHAMBER WOUND COATING IN THE FIELD OF FULL-THICKNESS SKIN WOUND

Ivanov A.N.¹, Sahan M.A.¹, Ermakov A.V.¹, Lengert E.V.¹, Savkina A.A.¹,
Stepanova T.V.¹, Loiko D.D.¹, Smyshlyayeva I.V.¹, Fedorov A.N.¹, Kiriyaizi T.S.¹

¹ FSBEI of Higher Education *Ç V.I. Razumovsky Saratov State Medical University, of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saratov, e-mail: maksimsahan425@gmail.com*

Traumatic injuries of the skin are an urgent problem of modern medicine that prompts the search for new approaches to the wound treatment. A promising way of solving this problem is the use of polylactide wound dressing. Recent technological designs provide opportunities of modernization of previously used polylactide homogeneous structure by changing the microarchitectonics and by including in the structure of wound dressing microchamber arrays for active substances download. But changing the structure of the polymer can cause side effects or reactions *in vivo*. The aim of this study was to evaluate the biocompatibility of a polylactide microchamber wound dressing in the area of an experimental skin wound using tissue morphological analysis. The study was carried out on male rats divided into three groups: the control group (10 intact animals), the comparison group (30 rats, subjected to modeling of an acute excisional skin wound), the experimental group (30 rats, subjected to modeling of an acute excisional skin wound, which was closed with a polylactide microchamber wound dressing). After the formation of an experimental excisional skin wound, characteristic histomorphological changes in tissues associated with the inflammatory process and remodeling was noted as a result of the research. The use of polylactide wound dressing does not cause additional alterative effect on tissues, and promote wound healing. Results of present study allow to conclude that that the microchamber wound dressing made of polylactide is completely biocompatible.

Keywords: polylactic acid, wound coverings, morphology, wound defect of the skin.

Кожные раневые повреждения являются актуальной проблемой современной медицины. Согласно данным Росстата, только за 2022 год зарегистрировано 230 428 случаев поверхностных повреждений и открытых ран [1]. С учетом возросшего количества вооруженных конфликтов в 2023 году ожидается кратное увеличение случаев по данной группе заболеваний. В связи с этим остро стоит проблема поиска новых эффективных средств лечения кожных ран.

Перспективным направлением лечения открытых поверхностных повреждений в настоящее время является применение синтетических раневых покрытий [2, 3]. Особое место среди всех известных раневых покрытий занимают покрытия на основе полимера молочной кислоты (полилактида) [4]. В экспериментальных исследованиях показано, что применение полилактида в качестве средства лечения открытых повреждений кожных ран позволяет значительно ускорить процесс заживления [5, 6].

В настоящее время широко применяются полилактидные полимерные покрытия, имеющие однородную фибриллярную структуру [7]. Известно, что разработана технология, позволяющая модифицировать трехмерную микроархитектонику полимера путем формирования в ней микрорезервуаров (микрокамер) [8]. Присутствие микрорезервуаров в структуре полимера позволило бы использовать их в качестве емкостей для химических веществ с физиологической активностью, влияя на течение раневого процесса.

Практическое применение полилактидного микрокамерного раневого покрытия обуславливает необходимость исследования его биосовместимости в области острой экспериментальной экцизионной кожной раны *in vivo*.

Цель исследования – провести морфологическую оценку биосовместимости полилактидного микрокамерного раневого покрытия при закрытии им полнослойной кожной раны.

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось на беспородных крысах-самцах массой 180–240 г, возрастом от 6 до 12 месяцев. Животные были разделены на три группы: контрольную группу (включала 10 интактных животных), группу сравнения (включала в себя 30 крыс, которым выполнена модель острой экцизионной кожной раны), опытную группу (30 крыс, которым выполнена модель острой экцизионной кожной раны, но рана которых была закрыта полилактидным микрокамерным раневым покрытием).

Эксперименты над животными проводились в соответствии с Директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22.09.2010 г. о защите животных, используемых для научных целей, с Федеральным законом от 27.12.2018 № 498-ФЗ (ред. от 27.12.2019) «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные

законодательные акты Российской Федерации», а также с учетом рекомендаций этического комитета СГМУ (протокол № 12 от 30.06.2022 г.).

Хирургические манипуляции проводились под наркозом. Для этого использовали внутримышечное введение раствора тилетамина и золазепам (Телазол 100 мг®, производитель «Zoetis Manufacturing & Research Spain, S.L.» Carretera Camprodon s/n – LaRiba, 17813-Valle de Bianya, Gerona, Испания) из расчета 10 мг/кг (0,1 мл/кг) массы тела и ксилазина гидрохлорида (Ксиланит®, производитель ООО «Нита-Фарм», Россия) в дозе 1 мг/кг (0,05 мл/кг) массы тела.

Модель острой эксцизионной кожной раны выполнялась по общепринятой технологии [9]. После депиляции в межлопаточной области кожу трехкратно обрабатывали растворами антисептиков. При помощи квадратного трафарета 10 x 10 мм и 5%-ного раствора йода наносили разметку будущей раны. С использованием пинцета, ножниц и скальпеля проводили иссечение всей толщины эпидермиса и дермы по разметке. Крысам опытной группы на образованный кожный дефект укладывали раневое покрытие.

Технология производства микрокамерных полилактидных раневых поверхностей описана по ссылке [10]. Готовому к применению раневому покрытию ножницами придавали форму, соответствующую раневому дефекту.

Морфологическую оценку изменений в области экспериментальной эксцизионной раны проводили на 7-е и 14-е сутки исследования. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином Майера (ООО «Биовитрум», Россия) и эозином (ООО «Биовитрум», Россия). Микроскопию препаратов зоны раневого дефекта выполняли с помощью микровизора проходящего света серии μ Vizo-103 (ООО «ЛОМО ФОТОНИКА», Россия). Оценивали состояние и кровенаполнение сосудов микроциркуляторного русла, инфильтрацию дна раны и ее перифокальной зоны лейкоцитами. При микроскопии срезов в 5 полях зрения при увеличении объектива х63 производили подсчет фибробластов и фиброцитов, а также макрофагов, полиморфоядерных лейкоцитов и лимфоцитов для оценки лейкоцитарной инфильтрации.

Для статистической обработки полученных результатов использовали программный пакет «Statistica 10» (StatSoft, США). Большинство данных не соответствовали закону нормального распределения, поэтому рассчитывали медиану, верхний и нижний квартили. Для сравнения полученных показателей применяли непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Различия значений считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

На 7-е сутки в зоне раневого дефекта у крыс группы сравнения визуализируются некротические массы, образующие струп. Края и дно раны инфильтрированы лейкоцитами. В

составе лейкоцитарной инфильтрации преобладают нейтрофилы, лимфоциты и макрофаги. По сравнению с интактной кожей у крыс данной группы на 7-е сутки эксперимента увеличивается количество фибробластов, но снижается количество фиброцитов, что отражает воспалительную активацию клеток фибробластического ряда. При этом значительно увеличивается количество полиморфоядерных лимфоцитов, лимфоцитов и макрофагов (таблица).

Динамика состава клеточных популяций дна и краев острой эксцизионной кожной раны у крыс разных групп на 7-е и 14-е сутки исследования, среднее количество клеток в поле зрения при увеличении объектива х63х

	Фибробласты	Фиброциты	Лимфоциты	Полиморфоядерные лейкоциты	Макрофаги
Контроль (n=10)	40 (20; 51)	19 (12; 25)	0 (0; 1)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
Группа сравнения 7-е сутки (n=15)	52 (46; 64) $p_1 = 0,023$	10 (7; 11) $p_1 < 0,001$	6 (3; 10) $p_1 = 0,021$	13 (4; 19) $p_1 < 0,001$	2 (0; 5) $p_1 = 0,031$
Группа сравнения 14-е сутки (n=15)	47 (41; 68) $p_1 = 0,036$ $p_2 = 0,607$	9 (6; 11) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,487$	15 (5; 21) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,025$	2 (0; 5) $p_1 = 0,584$ $p_2 < 0,001$	3 (0; 4) $p_1 = 0,011$ $p_2 = 0,918$
Опытная группа 7-е сутки (n=15)	60 (51; 68) $p_1 = 0,002$ $p_2 = 0,175$	7 (5; 10) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,132$	5 (1; 8) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,463$	3 (0; 17) $p_1 = 0,045$ $p_2 = 0,017$	3 (0; 5) $p_1 = 0,011$ $p_2 = 0,799$
Опытная группа 14-е сутки (n=15)	47 (44; 55) $p_1 = 0,031$ $p_3 = 0,835$ $p_4 = 0,018$	17 (14; 20) $p_1 = 0,459$ $p_3 < 0,001$ $p_4 < 0,001$	3 (2; 4) $p_1 = 0,019$ $p_3 < 0,001$ $p_4 = 0,966$	0 (0; 0) $p_1 = 0,901$ $p_3 = 0,632$ $p_4 = 0,031$	2 (0; 4) $p_1 = 0,046$ $p_3 = 0,114$ $p_4 = 0,075$

Примечание.

p_1 – уровень значимости по сравнению с интактной кожей крыс группы контроля.

p_2 – уровень значимости по сравнению с группой сравнения на 7-е сутки эксперимента.

p_3 – уровень значимости по сравнению с группой сравнения на 14-е сутки эксперимента.

p_4 – уровень значимости относительно значений опытной группы на 7-е сутки эксперимента.

К 14-м суткам при микроскопии в зоне раневого дефекта визуализируются некротические массы, образующие струп. По краям раневого дефекта отмечается пролиферация эпидермиса, характеризующая частичную эпителизацию раны. В перифокальной области кровеносные сосуды артериального и венозного русла имеют преимущественно повышенное кровенаполнение. В отдельных сосудах перифокальной

области визуализируются явления сладжа и сепарация крови на плазму и форменные элементы. В участках соединительной ткани, близко расположенных к краю дефекта, визуализируется большое количество мелких сосудов с тонкими стенками и неравномерным кровенаполнением. Отмечается лейкоцитарная инфильтрация, преимущественно лимфоцитарная. По краю раневого дефекта в неэпителизированных участках присутствуют нейтрофилы. В тканях зоны дефекта отмечаются большое количество сидерофагов и скопления свободно лежащего гемосидерина, являющиеся признаками старых кровоизлияний.

Данные, полученные при морфометрическом анализе препаратов и представленные в таблице, свидетельствуют, что в период с 7-х по 14-е сутки динамика состава клеточных популяций соединительной ткани краев и дна дефекта кожи, не закрытого раневым покрытием, проявляется значимым уменьшением полиморфоядерных лимфоцитов в составе лейкоцитарной инфильтрации и повышением количества лимфоцитов. Изменения количества фибробластических элементов в этот период статистической значимости не достигают.

Таким образом, морфологические изменения краев раневого дефекта характеризуются воспалительными сосудистыми и тканевыми реакциями. Сосудистые реакции проявляются полнокровием сосудов перифокальной зоны с формированием множества тонкостенных сосудов с неравномерным кровенаполнением в соединительной ткани по краю раневого дефекта. Тканевые реакции характеризуются выраженной активацией клеток фибробластического ряда и лейкоцитарной инфильтрацией, в составе которой на 7-е сутки преобладают полиморфоядерные клетки, а на 14-е – лимфоциты.

При микроскопии препаратов зоны раневого дефекта животных опытной группы на 7-е сутки в некротических массах струпа не визуализируется структура покрытия. По краям раневого дефекта отмечается пролиферация эпидермиса. В перифокальной зоне визуализируется повышенное кровенаполнение сосудов артериального и венозного русла. Также в перифокальной зоне присутствуют сидерофаги до 5 в одном поле зрения. Дно и края раны умеренно инфильтрированы лейкоцитами, преимущественно лимфоцитами. В отличие от крыс группы сравнения, нейтрофильная инфильтрация неэпителизированных участков раны для животных опытной группы не характерна. В соединительной ткани дна и краев раны присутствуют единичные тонкостенные перфузируемые сосуды.

Данные, представленные в таблице, свидетельствуют, что по сравнению с интактной дермой у крыс опытной группы на 7-е сутки эксперимента увеличивается количество фибробластов, но снижается количество фиброцитов. Количественные параметры воспалительной активации клеток фибробластического ряда у животных опытной группы на 7-е сутки эксперимента не имеют значимых различий относительно группы сравнения в тот

же срок наблюдения. Анализ состава лейкоцитарной инфильтрации свидетельствует, что у крыс опытной группы на 7-е сутки эксперимента значимо увеличивается количество лимфоцитов, полиморфоядерных лейкоцитов и макрофагов в соединительной ткани краев и в области дна раневого дефекта по сравнению с кожей интактных крыс. При этом у крыс, которым раневой дефект закрывался микрокамерным полилактидным раневым покрытием, количество нейтрофилов в соединительной ткани дна и краев раны значимо ниже, чем у животных группы сравнения на 7-е сутки эксперимента. Значимых различий количества лимфоцитов и макрофагов у крыс опытной группы и группы сравнения на 7-е сутки эксперимента не выявлено.

В области дна и краев раны отмечается большое количество мелких сосудов с тонкими стенками и преимущественно умеренным кровенаполнением. Сосуды артериального и венозного русла в перифокальной области также характеризуются преимущественно умеренным кровенаполнением. В участках соединительной ткани в области дна раневого дефекта отмечается присутствие единичных лимфоцитов. В перифокальной области преимущественно вокруг сосудов встречаются макрофаги до 4 в поле зрения объектива х63, цитоплазма некоторых из них заполнена гемосидерином. В ходе морфометрического анализа установлено, что к 14-м суткам эксперимента у крыс опытной группы отмечались снижение количества фибробластов и повышение количества фиброцитов по сравнению с 7-ми сутками эксперимента (таблица), что указывает на дифференцировку клеток фибробластического ряда. Однако среднее количество фибробластов в соединительной ткани дна и краев раневого дефекта у крыс опытной группы на 14-е сутки эксперимента значимо превышало таковое в коже интактных животных. При этом количество фиброцитов в соединительной ткани зоны раневого дефекта у крыс данной группы значимых отличий от параметров контроля не имело. Данные, представленные в таблице, свидетельствуют, что динамика лейкоцитарной инфильтрации у крыс опытной группы в период с 7-х по 14-е сутки эксперимента проявляется значимым снижением среднего числа нейтрофилов в поле зрения объектива х63 по сравнению с таковым на 7-е сутки эксперимента. Значимой динамики количества лимфоцитов и макрофагов в соединительной ткани зоны раневого дефекта у крыс опытной группы в период с 7-х по 14-е сутки не выявлено. Относительно группы сравнения у крыс опытной группы на 14-е сутки эксперимента отмечается значимое снижение количества лимфоцитов в соединительной ткани раневого дефекта, которое все же остается выше контрольных значений.

Таким образом, под влиянием полилактидного раневого покрытия без активных компонентов у крыс опытной группы снижается выраженность лейкоцитарной инфильтрации соединительной ткани зоны дефекта кожи за счет уменьшения среднего количества

нейтрофилов на 1-й неделе эксперимента и лимфоцитов на 2-й неделе. У крыс опытной группы, в отличие от животных группы сравнения, в период с 1-ю по 2-ю неделю эксперимента больше выражена дифференцировка клеток фибробластического ряда в дефинитивную форму фиброцитов. Также под влиянием микрокамерного полилактидного раневого покрытия уменьшаются морфологические признаки локальных нарушений кровотока, что проявляется нормализацией кровенаполнения как сосудов перифокальной зоны, так и мелких новообразованных сосудов в соединительной ткани зоны раневого дефекта. Влияние покрытия на кровоток в зоне регенерации более выражено на 2-й неделе эксперимента.

Заключение

После формирования острой экспериментальной экцизионной кожной раны отмечаются активация фибробластов, лейкоцитарная инфильтрация, в составе которой на 7-е сутки преобладают полиморфоядерные клетки, а на 14-е – лимфоциты, полнокровие сосудов перифокальной зоны, образование множества тонкостенных сосудов с неравномерным кровенаполнением в соединительной ткани в зоне дефекта.

Использование микрокамерного полилактидного покрытия без активных компонентов снижает лейкоцитарную инфильтрацию и способствует дифференцировке клеток фибробластического ряда в соединительной ткани зоны дефекта кожи, уменьшает морфологические признаки локальных нарушений кровотока. Указанные морфологические изменения свидетельствуют о биосовместимости микрокамерного полилактидного раневого покрытия. Данное раневое покрытие может применяться в дальнейших исследованиях с загрузкой микрорезервуаров активными веществами.

Список литературы

1. Бобылев С.Н., Бурлакова Е.А., Ваган И.С., Васильев И.В., Волков И.Н., Гохберг Л.М., Егоренко С.Н., Заварина Е.С., Зарубина Е.В., Кенчадзе Д.Д., Косарев А.Е., Лайкам К.Э., Малева Т.М., Нестеров В.Н., Окладников С.М., Оксенойт Г.К., Рыжикова З.А., Рябушкин Б.Т., Суринов А.Е., Шаповал И.Н. Российский статистический ежегодник. М., 2022. 691 с.
2. Zhang J., Song C., Han Y., Xi Z., Zhao L., Cen L., Yang Y. Regulation of inflammatory response to polyglycolic acid scaffolds through incorporation of sodium tripolyphosphate // European Polymer Journal. 2020. Vol. 122. P. 109349.
3. Hamad K., Kaseem M., Yang H.W., Deri F., Ko Y.G. Properties and medical applications of poly (lactic acid): A review // Express Polymer Letters. 2015. Vol. 9. P. 435–455.

4. Joseph B., Augustine R., Kalarikkal N., Thomas S., Seantier B., Grohens Y. Recent advances in electrospun polycaprolactone based scaffolds for wound healing and skin bioengineering applications // *Materials Today Communications*. 2019. Vol. 19. P. 319–335.
5. Thanusha A.V., Koul V. Biocompatibility evaluation for the developed hydrogel wound dressing - ISO-10993-11 standards - in vitro and in vivo study // *Biomedical Physics & Engineering Express*. 2021. Vol. 8. №1. P. 2057. DOI:10.1088/2057-1976/ac3b2b.
6. Bogdanova A.S., Sokolova A.I., Pavlova E.R., Klinov D.V., Bagrov D.V. Investigation of cellular morphology and proliferation on patterned electrospun PLA-gelatin mats // *Journal of Biological Physics*. 2022. Vol. 47. P. 205-214.
7. Surmenev R.A., Ivanov A.N., Saveleva M.S., Kiriiazi T.S., Fedonnikov A.S., Surmeneva M.A. The effect of different sizes of cross-linked fibers of biodegradable electrospun poly (ϵ -caprolactone) scaffolds on osteogenic behavior in a rat model in vivo // *Journal of Applied Polymer Science*. 2022. Vol.139. №22. P. 52244.
8. Mordovina E.A., Plastun V.O., Abdurashitov A.S., Proshin P.I., Raikova S.V., Bratashov D.N., Inozemtseva O.A., Goryacheva I.Y., Sukhorukov G.B., Sindeeva O.A. "Smart" Polylactic Acid Films with Ceftriaxone Loaded Microchamber Arrays for Personalized Antibiotic Therapy // *Pharmaceutics*. 2021. Vol. 14(1). P. 42. DOI:10.3390/pharmaceutics14010042.
9. Тихвинская О.А., Волкова Н.А., Рогульская Е.Ю., Ревенко Е.Б., Мазур С.П. Заживление эксцизионных кожных ран у мышей в присутствии матриц из плазмы крови // *Вісник проблем біології і медицини*. 2018. № 4 (147). С. 307-312.
10. Ermakov A.V., Kudryavtseva V.L. Demina P.A., Verkhovskii R.A., Zhang J., Lengert E.V., Sapelkin A.V., Goryacheva I.Yu., Sukhorukov G.B. Site-specific release of reactive oxygen species from ordered arrays of microchambers based on polylactic acid and carbon nanodots // *Journal of Materials Chemistry B*. 2020. Vol. 8. P. 7977-7986.