

Министерство образования и науки Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии  
и физиологии растений

**ОЦЕНКА РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ L-И D-  
АСКОРБАТОВ ХИТОЗАНА НА МОДЕЛИ ОЖГОВОЙ  
РАНЫ У КРЫС**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы  
направления подготовки магистратуры 060401 Биология  
биологического факультета  
Тычиной Яны Олеговны

Научный руководитель  
к.б.н., доцент

\_\_\_\_\_

Е. В. Глинская

дата, подпись

Заведующий кафедрой  
д.б.н., профессор

\_\_\_\_\_

С. А. Степанов

дата, подпись

Саратов 2017

## ВВЕДЕНИЕ

Лечение термических поражений в практике хирургии до настоящего времени остается одной из наиболее сложных проблем, имеющих не только медицинскую, но и социально-экономическую значимость. Разнообразие лекарственных средств, имеющих на фармацевтическом рынке, ставит хирурга-комбустиолога перед необходимостью подбора наиболее эффективных препаратов в каждом конкретном случае [1].

В отечественной научной литературе имеется целый ряд сообщений об успешном лечении ран различной этиологии с помощью лекарственных средств, включающих в свой состав хитозан (ХТЗ) или его соль - аскорбат хитозана, получаемый из ХТЗ и аскорбиновой кислоты (АК) [2, 3]. Показано, что ХТЗ и его производные обладают ранозаживляющим [4] и противовоспалительным действием [5], а также антибактериальной [6, 7], фунгицидной [8] и антитоксической [9] активностями, что крайне важно при лечении ран. В качестве органического лиганда в составе соли выбрана АК, поскольку она определяет нормальное течение репаративных процессов за счет стимуляции синтеза коллагена [10].

Однако АК существует в виде *L*- и *D*-изоформ. Известно, что препараты, которые производятся в виде стереоизомеров, могут существенно различаться своими фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами, что не может не отражаться на эффективности проводимого лечения [11]. Более того, есть опасность, что эти лекарственные средства будут оказывать негативное терапевтическое действие [12, 13, 14].

В настоящее время отсутствуют какие-либо сведения о зависимости ранозаживляющей и биоцидной активности аскорбата ХТЗ от вида стереоизомера АК, который был использован при приготовлении препарата.

### **Цели и задачи исследования.**

Цель настоящей работы - сравнение антибактериальной и ранозаживляющей активностей гидрогелей *L*- и *D*-аскорбата хитозана в

условиях *in vivo*. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить антибактериальное действие гидрогелей на основе низкомолекулярного хитозана и *L*- и *D*-стереоизоформ аскорбиновой кислоты при аппликациях на ожоговую рану у крыс.
2. Сравнить с помощью планиметрических методов ранозаживляющую активность гидрогелей *L*- и *D*-аскорбатов хитозана на модели ожога ШБ у крыс.

**Материал и методы исследования.** Исследования проводились с 2015-2016гг. Объектами исследования служили концентрированные гидрогели ХТЗ·*L*-АК и ХТЗ·*D*-АК, предоставленные сотрудниками отдела ВМС ОНИ НС и БС ФГБОУ ВО Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского.

В качестве модели использовали 17 беспородных половозрелых крыс-самок с массой тела 220-250 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария. Термические ожоги ШБ воспроизводили высокотемпературным контактным способом в межлопаточной области крыс в проекции шейно-грудного отдела. При работе с экспериментальными животными руководствовались требованиями Европейской конвенции по защите лабораторных животных и приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г. Все болезненные для крыс манипуляции выполняли в условиях асептики под эфирным наркозом. В качестве препарата сравнения использовали противовоспалительную антимикробную мазь «Левомеколь-вет» (ООО НПФ «Агрофарм», РФ). Количественное определение микроорганизмов в 1 мл раневого отделяемого выполняли методом Lindsey (1982).

**Структура и объём работы.** Работа изложена на 56 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 5 таблицами и 12 рисунками. Список использованных источников включает 101 наименование.

**Научная новизна.** Впервые представлены результаты комплексного исследования ранозаживляющего действия солей ХТЗ, приготовленных на основе низкомолекулярного ХТЗ и *L*- и *D*-стереоизомеров АК. Впервые показано, что аскорбаты хитозана обладают выраженными антимикробным и репаративно-регенеративным свойствами при обработке экспериментальных ожоговых ран у крыс. Впервые доказано, что *D*-аскорбат ХТЗ способствует более быстрому заживлению ожога ШБ у крыс, чем *L*-аскорбат ХТЗ.

**Научная значимость.** Полученные результаты рекомендуют использовать ХТЗ·*D*-АК в качестве нового ранозаживляющего препарата, так как он не обладает побочными эффектами и способен подавлять развитие инфекционного процесса без применения антибактериальных препаратов.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Антибактериальная активность ХТЗ·*D*-АК статистически значимо превышает таковую у ХТЗ·*L*-АК.
2. Заживление ожога ШБ степени у крыс наиболее высокими темпами протекает на фоне применения гидрогеля ХТЗ·*D*-АК.

**Основное содержание работы**

В главе «Основная часть» представлен анализ литературных данных о влиянии пространственной структуры на биологическую активность соединений, хиральности и проблемы хиральной чистоты лекарственных препаратов, биологических свойствах хитозана и аскорбиновой кислоты, а также применение в медицине препаратов, содержащих в своем составе ХТЗ и АК.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные о оценке бактериальной обсемененности ожогов на фоне применения гидрогелей, о сравнение ранозаживляющей активности гидрогелей ХТЗ·*L*-АК и ХТЗ·*D*-АК.

Ранозаживляющее действие гидрогелей *L*- и *D*-аскорбатов ХТЗ изучали путем наблюдения за динамикой процессов заживления ожогов ШБ степени

у крыс. Оценивали также общее самочувствие животных и состояние окружающих рану тканей.

Нанесенный термический ожог составил 0,5 % относительно поверхности тела крыс. В связи с тем, что ожог ШБ степени является весьма болезненной и тяжелой травмой, то для снижения летальности экспериментальных животных на 3-и сутки провели процедуру острой некрэктомии - раннего удаления ожогового струпа. В результате этой операции средняя площадь поверхности раны составила  $304,2 \pm 4,7 \text{ мм}^2$ .

Всех прооперированных крыс разделили на контрольную (5 крыс) и две опытные (по 6 крыс) группы. Животным из группы контроля на обнаженную раневую поверхность тонким слоем наносили препарат «Левомеколь-вет» 1 раз в сутки ежедневно до выздоровления. Крысам из экспериментальных групп на поврежденный участок однократно наносили гидрогель ХТЗ·L-АК (группа № 1) или ХТЗ·D-АК (группа № 2). При проведении эксперимента поверхность раны не изолировали от внешней среды. На 2-е сутки после операции у крыс в раневом ложе формировалась раневая корка, состоящая из лимфы и форменных элементов свернувшейся крови. В экспериментальных группах у крыс в формировании раневой корки принимали участие также хитозановые гидрогели.

В ходе эксперимента осложнения течения раневого процесса у крыс не наблюдалось. Также было установлено, что гидрогели аскорбата ХТЗ не вызывали у подопытных животных каких-либо отрицательных реакций, не проявляли токсического и раздражающего действия.

Проведенный бактериологический анализ раневого отделяемого не выявил у крыс обсемененности ожоговых ран условно-патогенными и патогенными микроорганизмами в количестве, необходимом для развития инфекционного процесса. Первый посев раневого отделяемого выполняли на 3-й день после нанесения ожога ШБ в момент проведения ранней некрэктомии. Положительный результат бактериологического анализа

отмечался у 50 - 67 % животных, как в контрольной, так и в двух экспериментальных группах

Несмотря на то, что раны были обсеменены микроорганизмами, признаки нагноения или инфекционного процесса отсутствовали. В 100% случаев микроорганизмы, выделенные из ран, были представлены монокультурой условно-патогенных и патогенных бактерий *E. coli* и *S. aureus*. Однако их количество не превышало величины  $10^3$  КОЕ в 1 г раневого отделяемого.

После отторжения раневой корки (с 21-х по 28-е сутки) проводили повторный посев раневого отделяемого. Следует отметить, что у большинства крыс из-за их высокой подвижности происходило преждевременное отторжение раневой корки. При этом молодой эпителий травмировался, и наблюдалось капиллярное кровотечение. Кровь из ран собирали петлей и проводили бактериологический анализ.

Установлено, что в ранах крыс после отторжения раневой корки микрофлора сохранялась лишь у 1 (20,0 %) животного из контрольной группы и у 1 (16,7%) животного из группы № 1. В экспериментальной группе № 2 на протяжении всего срока культивирования рост микроорганизмов не отмечался.

Таким образом, бактериологический анализ показал, что во всех трех группах экспериментальных животных максимальная степень обсемененности ран в процессе заживления не превышала величину  $10^3$  КОЕ/г. Низкая обсемененность ран явилась причиной отсутствия развития инфекционного процесса.

Проведенные исследования сравнения ранозаживляющей активности гидрогелей показали, что в экспериментальных группах № 1 и № 2 сокращение раневой поверхности шло высокими темпами на протяжении всего эксперимента

Под гидрогелем ХТЗ·D-АК средний срок ранозаживления был на 10 суток короче ( $p \leq 0,05$ ), чем в группе контроля и на 7 суток, чем в экспериментальной группе № 1. В группе № 1, по сравнению с контрольной группой, ранозаживление шло в среднем на 3 дня быстрее ( $p \leq 0,05$ ).

Установлено, что под гидрогелем ХТЗ·D-АК средний срок ранозаживления был на 10 суток короче ( $p \leq 0,05$ ), чем в группе контроля, и на 7 суток короче ( $p \leq 0,05$ ), чем в экспериментальной группе № 1. В группе №1, по сравнению с контрольной группой, ранозаживление шло в среднем на 3 дня быстрее ( $p \leq 0,05$ ).

После проведения некрэктомии в период с 1-х по 3-и сутки убыль площади ( $\Delta S, \%$ ) раневой поверхности и скорость заживления ран у подопытных животных из экспериментальных групп № 1 и № 2 были статистически значимо выше по сравнению с аналогичными показателями в контроле. В группе № 2 (ХТЗ·D-АК) 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 %).

В период с 3-х по 21-е сутки во всех группах уменьшение площади поверхности раны шло равными темпами (0,3 мм<sup>2</sup>/сут). Это объясняется тем, что в этот период об изменении площадь раневой поверхности судили только по уменьшению площади поверхности раневой корки в результате ее подсыхания и резорбции. О скорости эпителизации раны можно было бы судить только при условии иссечения вторичного струпа, что не предполагалось условиями данного эксперимента.

В период с 21-х по 28-е сутки у всех подопытных животных раны полностью очистились от раневой корки. Средняя площадь поверхности раны в экспериментальной группе № 1 в этот период была в 2 раза меньше ( $7,3 \text{ мм}^2$ ), чем в контрольной группе животных, и это различие было статистически значимым. В группе контроля к 28-м суткам площадь раны уменьшилась в 20 раз и в среднем составила  $15,0 \text{ мм}^2$ .

К 28-му дню у крыс из экспериментальной группы № 2 наблюдалось полное заживление ран и восстановление волосяного покрова. Скорость заживления была в 2 раза выше по сравнению с аналогичными показателями в двух других группах.

Проведенные исследования показали, что крысы хорошо переносят местное применение гидрогелей на основе *L*- и *D*-аскорбатов ХТЗ. Препараты не оказывают раздражающего и токсического действия, не вызывают у подопытных животных отрицательные реакции и осложнение течения раневого процесса, не влияют на двигательную активность животных.

Несмотря на то, что животные из групп № 1 (ХТЗ·*L*-АК) и № 2 (ХТЗ·*D*-АК) содержались в виварии без закрытия раневого ложа и без антибактериальной терапии, бактериологический анализ раневого отделяемого не выявил ни одного случая обсемененности ран патогенными и условно-патогенными бактериями выше диагностического титра  $10^3$  КОЕ/мл.

В ходе планиметрического исследования было установлено, что после ранней некрэктомии заживление ожога IIIБ степени протекает более эффективно при нанесении на рану аскорбатов ХТЗ. В этих группах отмечались раннее купирование воспаления и более быстрые темпы развития репаративно-регенеративных процессов. По всей видимости, это связано со способностью молекул ХТЗ вызывать купирование воспалительных процессов в поврежденных тканях за счет подавления продукции медиаторов воспаления.

Кроме того, наши эксперименты показали, что ранозаживление под гидрогелем *D*-аскорбата ХТЗ протекает более активно, чем под *L*-аскорбатом ХТЗ, несмотря на то, что *D*-АК обладает более слабой способностью стимулировать синтез коллагена и пролиферацию фибробластов по сравнению с *L*-АК.

Установлено, что сроки заживления ран под гидрогелем *D*-аскорбата ХТЗ были 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 на данный момент не известны. Однако абсолютно очевидно, что стереоизомеры АК, взаимодействуя с хиральными молекулами на поверхности клеток, могут оказывать разное по силе воздействие.

## **ВЫВОДЫ:**

1. При заживлении ожогов ШБ у крыс под гидрогелями *L*- и *D*-аскорбата ХТЗ не установлены случаи развития инфекционного процесса. Бактериологический анализ показал, что во всех трех группах экспериментальных животных максимальная степень обсемененности ран в процессе заживления не превышала величину  $10^3$  КОЕ/г.

2. Применение гидрогеля *D*-аскорбата ХТЗ статистически значимо повышает среднюю линейную скорость заживления раны и темпы убыли площади раневой поверхности по сравнению с «Левомеколем-вет» и гидрогелем *L*-аскорбата ХТЗ. Сроки заживления ожога ШБ под гидрогелем *D*-аскорбата ХТЗ на 10 сут короче, чем в контроле, и на 7 сут короче, чем под гидрогелем *L*-аскорбата ХТЗ.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ:

1. Алексеев, А. А. Местное лечение ожоговых ран / А. А. Алексеев, М. Г. Крутиков // Рос. мед. журнал. 2000. № 5. С. 51–53.
2. Островский, Н. В. Наноструктурные биопокрытия на основе хитозана в практике клиники термических поражений / Н. В. Островский, И. Б. Белянина, Р. Д. Ермолова, Е. А. Хмельницкая, И. В. Зудина. Матер. одиннадцатой междунар. конф.: «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Росхит 2012). Мурманск, 25-30 июня 2012. С. 392–397.
3. Иванов, П. В. Противовоспалительный эффект аскорбата хитозана в комплексной терапии заболеваний пародонта. / П. В. Иванов, И. В. Зудина, Н. В. Булкина, А. П. Ведяева, Е. В. Иванова // Современные проблемы науки и образования: электронный журнал. 2013. № 4. Сведения доступны также по Интернет: [www.science-education.ru/110-9517](http://www.science-education.ru/110-9517). (дата обращения: 21.07.2014). Яз. рус.
4. Шеремет, А. С. Ранозаживляющие свойства низкомолекулярного хитозана / А. С. Шеремет, Т. А. Байтукалов, О. А. Богословская. Матер. 8-й междунар. конф.: «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана». М., 2006. С. 262–264.
5. Зудина, И. В. Противовоспалительный эффект аскорбата хитозана в комплексной терапии заболеваний пародонта / И. В. Зудина, Н. В. Булкина, П. В. Иванов, А. П. Ведяева, Е. В. Иванова // Российский стоматологический журнал. 2013. № 2. С. 16–19.
6. Куликов, С. Н. Природные поликатионы как средство повышения эффективности антибактериальных белков / С. Н. Куликов // Вестник

- Казанского технологического университета. 2014. Т. 17, № 23. С. 224–226.
7. Raafat, D. Development of in vitro resistance to chitosan is related to changes in cell envelope structure of *Staphylococcus aureus* / D. Raafat, N. Leib, M. Wilmes, P. François, J. Schrenzel, H. G. Sahl // *Carbohydr Polym.* 2017. Vol. 157. P. 146–155.
  8. Tikhonov, V. Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-(2-(3-(dodec-2-enyl)succinoyl)-derivatives / V. Tikhonov, E. Stepanova, V. Babak // *Carbohydrate Polymers.* 2006. Vol. 64. P. 66–72.
  9. Иванушко, Л. А. Антибактериальные и антитоксические свойства хитозана и его производных / Л. А. Иванушко, Т. Ф. Соловьева, Т. С. Запорожец, Л. М. Сомова, В. И. Горбач // *Тихоокеанский медицинский журнал.* 2009. № 3. С. 82–85.
  10. Sheldon, R. Regulation of Collagen Biosynthesis by Ascorbic Acid: A Review / R. Sheldon, M. D. Pinnell // *The Yale journal of biology and medicine.* 1985. № 58. P. 553–559.
  11. Chhabra, N. A review of drug isomerism and its significance / N. Chhabra, M. L. Aseri, D. Padmanabhan // *Int J Appl Basic Med Res.* 2013. Vol. 3, № 1. P. 16 - 18.
  12. Спасов, А. А. Фармакология стереоизомеров лекарственных веществ / А. А. Спасов и др.; ред. А. А. Спасов; Волгоградский медицинский университет (Волгоград), Волгоградский медицинский научный центр. Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2011. 348 с.
  13. Hutt, A. J. Chirality and pharmacokinetics: an area of neglected dimensionality / A. J. Hutt. *Drug Metabol Drug Interact.* 2007. Vol. 22, № 2–3. P. 79-112.

14. Testa, B. Types of stereoselectivity in drug metabolism: a heuristic approach / B. Testa // Drug Metab Rev. 2015. Vol. 47, № 2. P. 239–251.