

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИХ СВОЙСТВ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ХИТОЗАНОВ

О.А. Богословская*, Н.Н. Глущенко*, Т.П. Алексеева*, Т.А. Байтукалов*,
И.П. Ольховская*, С.А. Лопатин**, А.В. Ильина**, А.Н. Левов**

*Институт энергетических проблем химической физики РАН,
Москва, E-mail: nnglu@mail.ru

**Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, E-mail: Enzyme@biengi.ac.ru

COMPARATIVE ANALYSIS OF WOUND-HEALING PROPERTIES OF CHEMICALLY MODIFIED LOW-MOLECULAR-WEIGHT CHITOSANS

O.A. Bogoslovskaya*, N.N. Glushchenko*, T.P. Alexeeva*, T.A. Baytukalov*,
I.P. Olkhovskaya*, S.A. Lopatin**, A.V. Ilyina**, A.N. Levov**

*Institute for Energy Problems of Chemical Physics RAS,
Moscow, E-mail: nnglu@mail.ru

**Center «Bioinzheneriya» RAS, Moscow, E-mail: Enzyme@biengi.ac.ru

ABSTRACT

The wound-healing activity of chemically modified low-molecular-weight chitosans (LMWCs) comprised in gels was studied. The sulfosuccinylchitosan exhibits high wound-healing activity. The studied LMWCs possess also antibacterial properties.

В настоящее время важной социальной и медицинской проблемой является разработка и создание новых ранозаживляющих средств, поскольку по статистике каждый десятый человек подвержен травматическим повреждениям, количество которых возрастает при проведении боевых операций, возникновении чрезвычайных ситуаций, террористических актах и т.д. Поэтому поиск новых и модификация существующих ранозаживляющих средств является одной из актуальных задач современной медицины.

В литературе имеются сведения о взаимосвязи биологической активности низкомолекулярных хитозанов с их химической структурой [1, 2].

Известно, что низкомолекулярные хитозаны (НМХ) нашли широкое применение в косметике, в качестве БАД, но в составе лекарственных средств еще не зарегистрированы [3]. Некоторые хитозаны обладают ранозаживляющими свойствами, поэтому на их основе сделаны препараты, которые используют для местного лечения ран и ожогов, в раневой хирургии [4, 5, 8]. Ранее нами было проведено исследование НМХ различной степени деацетилирования и показано, что НМХ с высокой степенью деацетилирования обладают как антимикробным, так и ранозаживляющим действием [6].

Целью работы являлось сравнительное изучение биологической активности низкомолекулярных хитозанов разной химической модификации и создание гелевой формы на их основе. В задачу исследований входило: исследование антибактериальной активности модифицированных НМХ; создание гелей на основе НМХ разных химических модификаций; изучение ранозаживляющих свойств модифицированных НМХ в составе гелей на модели экспериментальных полнослойных ран.

Материалы и методы. В работе использовали низкомолекулярный хитозан со степенью деацетилирования (СД) 89% (М.м. $56,0 \pm 2,8$ кДа) и полученные из него химически модифицированные НМХ: N-сукцинилхитозан (М.м. $56,0 \pm 2,8$ кДа) и N-сульфосукцинилхитозан (М.м. $56,0 \pm 2,8$ кДа).

Антимикробное действие химически модифицированных НМХ изучали на тест-культурах грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов: *Staphylococcus albus* и *Esherichia coli* АВ1157 методом диффузии в агар. По площади зон отсутствия или задержки роста тест-культур (мм), судили о бактерицидном или бактериостатическом действии НМХ испытуемого образца [7].

Спектрофотометрическим методом определяли степень подавления роста бактериальной культуры *Escherichia coli* K12 в жидкой питательной среде М9 в зависимости от концентрации внесенного в среду НМХ.

Для изучения действия химически модифицированных НМХ в составе гелей на скорость заживления ран использовали мышей-самок линии SHK, весом 18–20 г, содержащихся на общевиварийном рационе. Животных получали из Центрального питомника лабораторных животных РАМН, Московская область.

Все работы с животными проводили в соответствии с «Правилами использования лабораторных экспериментальных животных» от 1984 г, приложение 4. Исследование кинетики заживления ран под действием гелей с химически модифицированными НМХ проводили на модели экспериментальных полнослойных ран [6]. По кинетическим кривым изменения площадей ран в процессе регенерации рассчитывали период полузаживления ран $\tau_{1/2}$ и период полного заживления ран $\tau_{полн}$.

Результаты и их обсуждение. В современной медицинской практике при лечении раневых поверхностей наибольшее предпочтение отдается использованию лекарственных препаратов непосредственно наносимых на рану. Известно, что быстрый терапевтический и пролонгированный эффект могут обеспечивать гели. Гели хорошо поглощают кожные экскреторные и секреторные продукты, способствуют росту грануляционной ткани. Постепенное испарение воды обеспечивает охлаждение воспаленных тканей. Введение в состав геля глицерина увеличивает их осмотическую вязкость, что делает возможным лечение АФ на первой стадии раневого процесса. Гели не пачкают одежду, удобны в применении, быстро образуют тонкую пленку на поврежденном кожном покрове. Поэтому нами была выбрана именно гелевая форма и разработаны мягкие лекарственные формы — гидрофильные гели на основе метилцеллюлозы, содержащие исследуемые НМХ в разных концентрациях.

При лечении любой из фаз раневого процесса, особенно первой, очень важно проявление лекарственным средством антибактериального действия. Исследование антибактериальной активности, проведенное на штаммах *E.coli* 1157 и *St. albus*, позволило установить, что исследуемые нами химически модифицированные НМХ обладают антибактериальной активностью, зависящей от структуры хитозана — в отношении *E.coli* 1157 активен только НМХ СД = 89%, в отношении *St. albus* в разной степени были активны все исследуемые хитозаны. Антибактериальное действие НМХ СД = 89% показано также для штамма *E.coli* K12: введение его в жидкую питательную среду М9 подавляет рост бактериальной культуры в 14 раз по сравнению с контролем.

Исследование ранозаживляющей активности разработанных нами гелей с НМХ на модели полнослойных ран показало, что гели уменьшают период полузаживления ран. Наибольшей регенерирующей активностью обладал гель с N-сульфосукцинилхитозаном — период полузаживления ран снижался до 0,7 сут, а также гель с НМХ СД = 89% — наблюдалось снижение значения периода полузаживления ран до 1,1 сут. Различия для данных групп по сравнению с контролем статистически значимы. Применение геля с N-сукцинилхитозаном также уменьшало период полузаживления по сравнению с контролем, однако, различия были статистически недостоверны.

Таким образом, установлено, что период полузаживления ран для группы животных, леченной гелями с N-сульфосукцинилхитозаном, на 65% меньше периода полузаживления ран контрольной группы. Применение геля с НМХ СД = 89% уменьшало период полузаживления ран в 2 раза.

Показано, что минимальный период полного заживления ран — 12,4 сут — наблюдался в группе животных, леченных гелем с N-сульфосукцинилхитозаном. В остальных случаях период полного заживления ран составлял в среднем 13,5 сут.

Формализация кинетических кривых с использованием полулогарифмических координат позволила оценить скорость протекания процессов ранозаживления. Так, показано, что применение гелей с N-сульфосукцинилхитозаном и НМХ СД = 89% способствует увеличению скорости ранозаживления по сравнению с контрольной группой животных в 2,5 и 1,6 раз соответственно.

В настоящее время предполагается существование двух механизмов, посредством которых хитиновые соединения могут вносить свой положительный вклад в процесс

ранозаживления. Это либо активация иммунного ответа через стимуляцию макрофагов, либо использование ацетилглюкозамина (структурная единица хитинов) в качестве предшественника мукополисахаридов, непосредственно участвующих в создании биоструктур [8]. Нами установлено, что ранозаживляющие свойства гелей, содержащих в качестве активного компонента модифицированные НМХ, зависят от химической структуры НМХ. Гели, содержащие НМХ СД = 89% и N-сульфосукцинилхитозан, являются перспективными для дальнейших исследований с целью создания новых лекарственных препаратов, обладающих ранозаживляющим действием.

Результаты исследований представлены на сайтах: www.chitin.ru и nanobiology.parod.ru.

Работа поддержана грантом РФФИ-ОФИ № 07-04-12200.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корнилова Г.В., Макарова Т.В., Гамзаде А.И. и др. Сульфатированные производные хитозана как ингибиторы ВИЧ-инфекции // Иммунология. 1995. №1. С. 13–16.
2. Евдокимов Ю.М. Нуклеиновые кислоты и хитозан / Хитин и хитозан: получение, свойства и применение.— М.: Наука, 2002. С. 178–201.
3. Варламов В.П. Место российской науки в мировом хитозановом буме // Новые достижения в исследовании хитина и хитозана: Материалы Шестой Международной конференции. Москва-Щёлково, 2001 г. М.: Изд-во ВНИРО, 2001.
4. Никонов Б.А., Панов В.В., Парамонов Б.А. и др. Антибактериальные свойства губок на хитозан-коллагеновой основе // Матер. VII Междунар. конф. «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана». Спб.: ВНИРО, 2003. С. 181–183.
5. Панов В.В., Парамонов Б.А., Никонов Б.А. и др. Опыт применения хитозан-коллагеновых губок при лечении огнестрельных ран мягких тканей // Матер. VII Междунар. конф. «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана». Спб.: ВНИРО, 2003. С. 185–186.
6. Байтукалов Т.А., Богословская О.А., Ольховская И.П. и др. Регенерирующая активность и антибактериальное действие низкомолекулярного хитозана // Известия РАН. Сер. Биологическая. 2005. №6. С. 659–663.
7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Ремедиум, 2000. С. 264–266.
8. Berger J., Reist M., Mayer J. M., Felt O., Gurny R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications // Eur. J. of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2004. V. 57. P. 35–52.