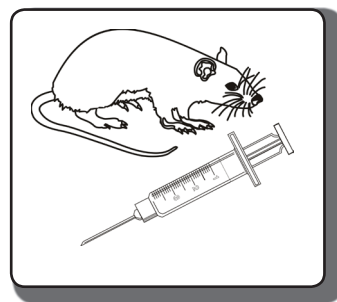


Теоретическая и экспериментальная медицина



УДК 616-002.3-089:615.468:616-006

С.В. Белова, И.В. Бабушкина, Е.В. Гладкова, И.А. Мамонова, Е.В. Карякина, Г.В. Коршунов

РЕГЕНЕРАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГНОЙНОЙ РАНЫ И ПРОЦЕССЫ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ И ХИТОЗАНА

*Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии,
410002, ул. Чернышевского, 148, тел. 8-(8452)-39-32-03, e-mail: sarniito@yandex.ru, г. Саратов*

Резюме

В данном исследовании проводилось изучение репаративной регенерации экспериментальной гнойной раны и процессов свободнорадикального окисления при использовании наночастиц металлов и хитозана.

В процессе заживления гнойной раны наблюдалось ускорение репаративной регенерации на фоне оптимизации показателей липопероксидации (снижение содержания малонового диальдегида) и антиоксидантной системы защиты организма (повышение активности ферментного антиоксиданта церулоплазмينا).

Результаты исследования показали позитивное влияние комбинации на основе наночастиц металлов и природного биополимера хитозана на процессы свободнорадикального окисления и репаративную регенерацию в условиях экспериментальной гнойной раны.

Ключевые слова: свободнорадикальное окисление, экспериментальная гнойная рана, наночастицы металлов, хитозан.

S.V. Belova, I.V. Babushkina, E.V. Gladkova, I.A. Mamonova, E.V. Karyakina, G.V. Korshunov

REGENERATION OF THE EXPERIMENTAL SEPTIC WOUND AND PROCESSES OF FREE-RADICAL OXIDATION USING NANOPARTICLES OF METALS AND CHITOSAN

Federal Government-Financed Institution «Saratov Research Institute of Traumatology and Orthopaedics» of Ministry of Public Health and Social Development of the Russian Federation, Saratov

Summary

In the presented research a reparative regeneration of the experimental septic wound and processes of free-radical oxidation in use of nanoparticles of metals and chitosan were studied.

In the process of healing of a septic wound, acceleration of reparative regeneration was observed against the background of optimization of lipoperoxidation indices (drop of malondialdehyde content) and antioxidant system of defense of the organism (increase in the activity of ceruloplasmin enzymatic antioxidant).

Research results showed positive effect of the combination of nanoparticles of metals and a natural biopolymer chitosan on free-radical oxidation processes and reparative regeneration in conditions of an experimental septic wound.

Key words: free radical oxidation, experimental purulent wound, metal nanoparticles, chitosan.

Разработка стратегии и тактики комплексного лечения обширных гнойных ран, составляющих порядка 35 % в общей структуре хирургической заболеваемости, является одним из главных научно-практических направлений в травматологии и ортопедии [2].

Оптимизация репаративной регенерации кожи и мягких тканей требует создания раневых покрытий, обладающих такими свойствами как биосовместимость, биodeградируемость, низкая токсичность при сохранении антимикробной активности [9].

Одним из основных аспектов состоятельности репаративной регенерации является выраженность процессов свободнорадикального окисления. В условиях полнослойной инфицированной раны свободнорадикальные процессы приобретают особенно агрессивный характер, что, посредством активации процессов липопероксидации, оказывает существенное влияние на функциональную активность клеточных и субклеточных структур.

Актуальным представляется оценка влияния местного применения наночастиц металлов в комплексе с хитозаном, проявляющим антиоксидантную активность [10], на динамику заживления полнослойной инфицированной раны. Известно, что наночастицы металлов проявляют регенерирующие и антибактериальные свойства, что делает перспективным их использование для лечения гнойно-воспалительных осложнений [1]. При комбинированном воздействии наночастиц металлов и низкомолекулярного хитозана их регенеративные и антибактериальные свойства взаимно усиливаются. Проведены исследования по изучению действия комплекса наночастиц металлов и хитозана на раневой процесс, выявлены ранозаживляющие свойства, ускорение процесса регенерации кожи в 3,5 раз по сравнению с контролем [6]. Однако большой практический интерес вызывает возможность комбинированного использования наночастиц металлов и низкомолекулярного хитозана при гнойном раневом процессе, вызванном клиническими полиантибиотикорезистентными штаммами *Staphylococcus aureus*, являющимися одним из основных возбудителей раневой инфекции [11].

Целью настоящего исследования явилось изучение репаративной регенерации и процессов свободнорадикального окисления при использовании наночастиц металлов и природного биополимера хитозана в условиях экспериментальной гнойной раны.

Материалы и методы

Исследование проводили на 60 белых беспородных крысах половозрелых самцах, массой тела 180-230 г. Модель полнослойной гнойной раны была сформирована в межлопаточной области спины под наркозом посредством иссечения кожного лоскута с подкожной клетчаткой в виде квадрата размером 20×20 мм по контуру, предварительно нанесенному по трафарету, при этом дно и края раны раздавливались зажимом Кохера. Инфицирование раны проводилось при помощи внесения в нее марлевого тампона весом 0,5 г с взвесью суточной культуры *Staphylococcus aureus*, выделенной у больных остеомиелитом и другими гнойными посттравматическими и послеоперационными осложнениями, в дозе 2×10^6 КОЕ/мл. Сформированная рана подвергалась ежедневному замеру границ до полного ее заживления. Развитие типичной картины полнослойной раны с признаками гнойного воспаления фиксировалось на 3-5-е сутки [3].

Учитывались следующие параметры течения раневого процесса: наличие и характер воспалительной реакции, состояние краев и дна раны, сроки очищения раны от некротических тканей, появления грануляций и их характер, сроки эпителизации ран, планиметрические характеристики на 3-и, 5-е, 7-е, 10-е, 14-е сутки.

Экспериментальные животные разделялись на 3 группы по 20 животных в каждой: 1-я группа – интактные животные; 2-я группа – опытная (животные с полнослойной раной с аппликацией смеси, состоящей из наночастиц металлов и хитозана); 3-я группа – группа сравнения, животные с полнослойной раной, которую обрабатывали 0,9 % изотоническим раствором хлорида натрия. Содержание животных, их питание и уход за ними проводилось по «Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) от 06.04.1973», эвтаназия экспериментальных животных осуществлялась согласно «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение 3, 4 к приказу Минздрава СССР от 12.08.1977, № 755).

Коррекцию полнослойной гнойной раны у животных опытной группы проводили с помощью комплекса, состоящего из наночастиц металлов и хитозана, на 3-и сутки однократно. В работе использовались наночастицы металлов, полученные плазмохимическим методом с дисперсностью 30-40 нм, и природный биополимер хитозан пищевой, произведенный ЗАО «БИОПРОГРЕСС», г. Москва.

Нанесение смеси осуществлялось однократно равномерным слоем посредством накожной аппликации в количестве 1 г.

Лабораторные исследования проводились в динамике: до формирования раны, до коррекции и после нее. Биохимическими методами исследования определялись: уровень малонового диальдегида в реакции с тиобарбитуровой кислотой для оценки активности процессов липопероксидации [5], активность сывороточного ферментного антиоксиданта церулоплазмينا для оценки состояния ферментного звена антиоксидантной системы по окислению раствора парафенилендиамина [4], выражавшаяся в условных единицах в соответствии с указанием В.П. Пишак, Г.М. Ярмольчук (1998) [8].

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы «Medstat», предназначенной для обработки результатов медицинских и биологических наблюдений.

Результаты и обсуждение

После формирования полнослойной гнойной раны при визуальном осмотре отмечалась гиперемия и отечность краев и дна раны. На 3-и сутки на раневой поверхности отмечалось появление экссудата, а у некоторых животных имелось скудное гнойное отделяемое. При бактериологическом исследовании высевался *St. aureus* в количестве 3×10^8 КОЕ/мл. Животные выглядели вялыми, неопрятными, часто отказывались от еды и теряли в весе.

У животных с гнойной раной до коррекции при биохимическом исследовании процессов липопероксидации и состояния антиоксидантной системы было обнаружено повышенное содержание вторичного продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида ($4,19 \pm 0,23$ мкмоль/л) по сравнению со здоровыми крысами ($2,84 \pm 0,17$ мкмоль/л), что свидетельствовало об интенсификации процессов свободнорадикального окисления. Изменялось и состояние

антиоксидантной системы: имелось снижение активности ферментного антиоксиданта церулоплазмينا до $19,15 \pm 0,76$ у. е. по сравнению с показателями у интактных животных ($26,12 \pm 0,50$ у. е.).

У крыс опытной группы после нанесения изучаемой смеси на раневую поверхность уже на 5-е сутки наблюдения было отмечено, что область раневой поверхности имеет четкие границы, при этом площадь поверхности раны меньше, чем у крыс группы сравнения (таблица). В дальнейшем у крыс, леченых наночастицами металлов и хитозана, отмечалось ускоренное заживление раны по сравнению с крысами без лечения. К 7-м суткам отмечалось уменьшение площади раневой поверхности без признаков воспаления (рис. 2). Под влиянием смеси уже на 10-е сутки после формирования полнослойной инфицированной раны у отдельных представителей опытной группы наблюдалось формирование раневого струпа ровной окантовки, полная эпителизация и равномерное заживление раны, а также восстановление волосяного покрова. У остальных представителей опытной группы полная эпителизация имелаась на 14-е сутки. Принципиально иная динамика раневого процесса наблюдалась у животных группы сравнения. На коже вокруг раны имелаась выраженная гиперемия, а у некоторых особей и участки некроза. Наблюдалось отсутствие верхних слоев кожи с местами отторжения струпа и нагноения (рис. 1). К 10-14-м суткам полной эпителизации у животных этой группы не наблюдалось. Данные по изменению площади раневой поверхности у крыс с полнослойной гнойной раной представлены в таблице.

Таблица

Площадь раны у экспериментальных животных (М $\pm$ м, мм²)

Сутки	Группа сравнения, мм ²	Опытная группа, мм ²
1-е	386,2 $\pm$ 4,5	380,4 $\pm$ 3,9
3-и	360,1 $\pm$ 3,7	317,2 $\pm$ 4,1*
5-е	347,1 $\pm$ 3,2	254,6 $\pm$ 5,7*
7-е	294,0 $\pm$ 2,8	167,9 $\pm$ 5,7*
10-е	260,4 $\pm$ 2,4	53,1 $\pm$ 3,4*
14-е	192,7 $\pm$ 3,9	полное заживление

Примечание. * – достоверная разница показателей ($p < 0,05$) между животными опытной группы и группы сравнения.

Приведенные выше значения по изменению размеров раневой поверхности под влиянием комплекса, состоящего из наночастиц металлов и биополимера хитозана, показывают ускоренную регенерацию полнослойной гнойной раны у животных опытной группы.

При оценке состояния процессов свободнорадикального окисления под влиянием накожной аппликации комплекса из биополимера хитозан и наночастиц металлов в дозе 1 г было выявлено снижение интенсификации процессов липопероксидации, что проявлялось статистически достоверным ($p < 0,05$) снижением уровня малонового диальдегида до $3,25 \pm 0,19$ мкмоль/л. Также было отмечено и позитивное изменение состояния антиоксидантной системы с увеличением активности церулоплазмينا до $23,18 \pm 0,52$ у. е.

На 14-е сутки наблюдения в группе сравнения у животных, не получавших лечения, уровень малонового диальдегида продолжал увеличиваться и составил $4,90 \pm 0,36$ мкмоль/л, а активность церулоплазмينا снижалась до $17,46 \pm 0,48$ у. е., что свидетельствовало о дальнейшей интенсификации свободнорадикальных процессов.



Рис. 1. Раневая поверхность у экспериментальных животных группы сравнения на 7-е сутки



Рис. 2. Раневая поверхность у экспериментальных животных опытной группы после коррекции на 7-е сутки

По утверждению некоторых авторов, на заживление раневой поверхности влияют как общие факторы (вирулентность и патогенность микроорганизмов), так и изменение местных процессов в раневой зоне в виде угнетения местного иммунитета, активации свободно-радикального окисления, повышения уровня эндотоксинов и т. д. [7].

В условиях гнойной раны воспалительная реакция сопровождается интенсификацией процессов свободно-радикального окисления (в данном случае повышение уровня малонового диальдегида), вызываемого активными формами кислорода, продуцируемыми полиморфоядерными лейкоцитами в процессе фагоцитоза при поглощении кислорода. При несостоятельности антиоксидантной системы отмечается снижение активности некоторых ее показателей, в данном исследовании ферментного антиоксиданта церулоплазмينا.

В процессе заживления гнойной раны под влиянием комплекса, состоящего из наночастиц металлов и природного биополимера хитозана, наблюдалось ускорение репаративной регенерации на фоне оптимизации показателей липопероксидации (снижение содержания малонового диальдегида) и антиоксидантной системы защиты организма (повышение активности ферментного антиоксиданта церулоплазмينا).

Выводы

Результаты данного исследования демонстрируют позитивное влияние комбинации на основе наночастиц металлов и природного биополимера хитозана на

процессы свободноадикального окисления и репаративную регенерацию в условиях экспериментальной гнойной раны.

Литература

1. Арсенььева И.П., Зотова Е.С. и др. Аттестация наночастиц металлов, используемых в качестве биологически активных препаратов // Нанотехника. – 2007. – № 2. – С. 72-77.
2. Гостищев В.К. Инфекции в хирургии. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 768 с.
3. Даченко Б.М. Теория и практика местного лечения гнойных ран. – Киев: Здоровье, 1995.
4. Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия (пособие для врачей-лаборантов). – Минск: Беларусь, 1976. – 311 с.
5. Коробейникова Э.Н. Модификация определения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой // Лабораторное дело. – 1989. – № 7. – С. 8-10.
6. Глущенко Н.Н., Варламов В.П. и др. Наночастицы меди и наночастицы хитозана в составе ранозаживляющих средств // Микроэлементы в медицине. – 2008. – Т. 9, № 12. – С. 51.
7. Толстых М.П. Лечение ран антиоксидантами. – М., 2004. – 110 с.
8. Пишак В.П., Ярмольчук Г.М. Материал для осуществления внешнего контроля качества определения церулоплазмина // Клиническая лабораторная диагностика. – 1998. – № 4. – С. 38-44.
9. Парамонов Б.А., Антонов С.Ф., Нугаев Т.Ш. и др. Ранозаживляющая эффективность коллаген-хитозановых губок серии «Хитоскин» // Инфекции в хирургии. – 2011. – Т. 9, № 3. – С. 17-23.
10. Хасина Э.И., Сребнева М.Н., Ермак И.М., Горбач В.И. Хитозан и неспецифическая резистентность организма // Вестник ДВО РАН. – 2005. – № 1. – С. 62-71.
11. Дехнич А.В., Эдельштейн И.А., Нарезкина А.Д. и др. Эпидемиология антибиотикорезистентности нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в России: результаты многоцентрового исследования // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2002. – Т. 4, № 4. – С. 325-336.

Literature

1. Arsentieva I.P. Certification of Metallic Nanoparticles Used as Biologically Active Drugs // Nanotechnics. – 2007. – № 2. – P. 72-77.
2. Gostishchev V.K. Surgical Infections. – M.: GEOTAR-Media, 2007. – 768 p.
3. Datsenko B.M. Theory and Practice of Local Treatment of Septic Wounds. – Kiev: Zdorovje, 1995.
4. Kolb V.G., Kamyshnikov V.S. Clinical Biochemistry (Manual for Laboratory Doctors). – Minsk: Belarus, 1976. – 311 p.
5. Korobeynikova E.N. Modification of Detection of Lipid Peroxidation Products in the Reaction with Thiobarbituric Acid // Laboratornoe delo. – 1989. – № 7. – P. 8-10.
6. Glushchenko N.N. Copper Nanoparticles and Chitosan Nanoparticles as Components of Pharmaceutical Compositions on Wound Healing // Trace Elements in Medicine. – M., 2008. – Vol. 9, № 12. – P. 51.
7. Tolstykh M.P. Wound Healing by Antioxidants. – M., 2004. – 110 p.
8. Pishak V.P., Yarmolchuk G.M. Material for Carrying Out External Control of Quality of Detection of Ceruloplasmin // Clinical and Laboratory Diagnostics. – 1998. – № 4. – P. 38-44.
9. Paramonov B.A., Antonov S.F. Wound Healing Effectiveness of Collagen-Chitosan Sponges of the Series «Chitoskin» // Surgical Infections. – 2011. – Vol. 9, № 3. – P. 17-23.
10. Khasina E.I., Sgrebneva M.N., Ermak I.M., Gorbach V.I. Chitosan and Nonspecific Resistance of the Organism // Bulletin of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences. – 2005. – № 1. – P. 62-71.
11. Dekhnich A.V., Edelstain I.A. Epidemiology of Antimicrobial Resistance of Nosocomial Strains of *Staphylococcus aureus* in Russia: Results of Prospective Multicenter Study // Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. – 2002. – Vol. 4, № 4. – P. 325-336.

Координаты для связи с авторами: Белова Светлана Вячеславовна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела фундаментальных клинико-экспериментальных исследований СарНИИТО, тел. 8-(8452)-39-32-02, e-mail: sarniito-lab@yandex.ru; Бабушкина Ирина Владимировна – канд. мед. наук, старший научный сотрудник отдела фундаментальных клинико-экспериментальных исследований СарНИИТО; Гладкова Екатерина Вячеславовна – канд. биол. наук, руководитель отдела фундаментальных клинико-экспериментальных исследований СарНИИТО; Мамонова Ирина Александровна – младший научный сотрудник отдела фундаментальных клинико-экспериментальных исследований СарНИИТО; Карякина Елена Викторовна – д-р мед. наук, профессор, главный научный сотрудник отдела фундаментальных клинико-экспериментальных исследований СарНИИТО; Кориунов Геннадий Васильевич – д-р. мед. наук, профессор, главный научный сотрудник отдела фундаментальных клинико-экспериментальных исследований СарНИИТО.