

О.С. Очиров ¹, Я.Г. Разуваева ², Н.С. Бадмаев ², С.А. Стельмах ¹, Д.М. Могнонов ¹

РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ГИДРОГЕЛЯ НА ОСНОВЕ ПОЛИГУАНИДИНОВ

¹ ФГБУН «Байкальский институт природопользования» СО РАН, Улан-Удэ, Россия² ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, Улан-Удэ, Россия

Синтезирован гидрогель на основе полигексаметиленгуанидин гидрохлорида путём сшивания концевых аминогрупп полимера формальдегидом. Так как полигуанидины обладают высокой антимикробной активностью, было предположено, что гидрогель на этой основе окажет влияние на течение раневого процесса. В условиях линейной кожно-мышечной раны установлено, что гидрогель обладает выраженным ранозаживляющим действием. Исследование гидрогеля методами ранотензиометрии рубца и патоморфологии срезов показало ускоренное созревание грануляционной ткани и формирование рубца.

Ключевые слова: полигексаметиленгуанидин гидрохлорид, гидрогель, ранозаживляющее действие, ранотензиометрия

WOUND-HEALING EFFECT OF POLYGUANIDINE-BASED HYDROGEL

O.S. Ochirov ¹, Y.G. Razuvaeva ², N.S. Badmaev ², S.A. Stelmakh ¹, D.M. Mogonov ¹¹ Baikal Institute of Nature Management SB RAS, Ulan-Ude, Russia² Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude, Russia

This article presents the evaluation of polyhexamethyleneguanidine hydrochloride hydrogel influence on the course of wound healing processes. Synthesis of hydrogel is based on the interaction of amino-end groups of the polymer with carbonyl compounds.

The presence of significant biocidal properties of the gel-forming polymer is allowed to consider the hydrogel as a wound healing agent. Since most wound healing agents for external use are made in the form of gels, ointments, polymer-based, it was decided to use the wound healing agent "Levomekol", a gel which consists of poly (ethylene oxide) as a comparison drug. So, in terms of linear skin-muscle wound we established the pronounced wound-healing effect of a polyhexamethyleneguanidine hydrochloride hydrogel. The results of pathomorphological studies revealed that in animals of the experimental "hydrogel" group on the eighth day of the experiment, the wound was undergoing a process of rejection of the scab, the presence of mature granulation tissue and no exudate was also observed. In the comparison group, the healing process was more slow, on the eighth day of the experiment in the animal group we observed the presence of fluid under the eschar, and lower amount of mature granulation tissue. Tensiometry of the scar has shown that the strength of scar rupture in the "hydrogel" group requires 65 % more force compared to the control group, while in the group of comparison this parameter made only 48 %.

Key words: polyhexamethyleneguanidine hydrochloride, hydrogel, wound-healing effect, tensiometry

При лечении ран и ожогов возникает вероятность заражения повреждённой поверхности кожных покровов микроорганизмами, которые вызывают осложнения в виде инфекционных заболеваний. Подходы к решению этой проблемы не меняют своей актуальности и основываются на поиске новых и модификации старых материалов, способных препятствовать заражению, обеспечивать длительную защиту от повторного проникновения патогенных микроорганизмов, а также способствовать заживлению повреждённых тканей.

Одним из наиболее перспективных в этом плане материалов являются полимерные гидрогели [7, 8]. Полимеры, обладающие свойствами биосовместимости, комплексообразования, биоразложения и наличием собственной антимикробной активности, можно назвать полигуанидинами [2, 3]. Отнесение этих полимеров к IV классу опасности при наружном

применении, а также наличие вышеперечисленных свойств позволяет рассмотреть возможность использования гелей на основе полигуанидинов не только в качестве носителей лекарственных средств, но и в качестве самостоятельных ранозаживляющих средств.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценка ранозаживляющего действия гидрогеля, синтезированного на основе полигексаметиленгуанидин гидрохлорида (ПГМГх).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез. ПГМГх был получен путём поликонденсации (рис. 1) в расплаве гуанидин гидрохлорида (ГГХ) (произведён фирмой «Across Organics», использовался без предварительной очистки (99 %; $T_{пл} = 185-189\text{ }^{\circ}\text{C}$; $[\text{H}_2\text{O}] \leq 0,2\text{ \%}$)) и гексаметилендиамина (ГМДА) (очищен методом перегонки при темпе-

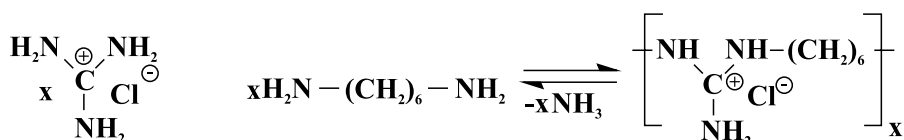


Рис. 1. Схема синтеза ПГМГх.

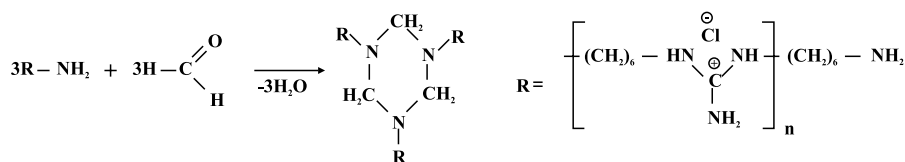


Рис. 2. Схема синтеза гидрогеля ПГМГх/ф.

ратуре 205 °С, фракция собиралась при температуре 202–205 °С) при $T = 165$ °С в течение 3 ч.

Гидрогель ПГМГх/ф (рис. 2) был получен путем добавления к раствору полимера ($C = 30$ г/дл) различного количества растворов 10%-го формальдегида (ГОСТ 1625-89) – от эквимольного до пятикратного избытка относительно количества концевых аминогрупп ПГМГх [5]. Реакция проходила при комнатной температуре в течение одного часа. Очистка гидрогеля от золь-фракции проводилась путём многократного промывания дистиллированной водой на воронке Бюхнера.

Экспериментальные исследования. Исследования выполнены на 24 белых крысах линии Wistar обоих полов с исходной массой 200–220 г. Содержание животных соответствовало «Правилам лабораторной практики» (GLP) и Приказу МЗ РФ № 708Н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Перед началом экспериментов животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, распределялись на группы с учётом пола, возраста, массы и принципа рандомизации. Экспериментальную работу осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977), «Правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Протокол исследования утверждён этическим комитетом Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (протокол № 6 от 05.06.2015).

Перед началом экспериментов животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, с учётом пола, возраста, массы и принципа рандомизации были распределены на 3 группы: контрольная, опытная 1 и опытная 2. Раневое повреждение кожи у белых крыс вызывали нанесением в области спины линейного разреза (до собственной фасции) размером 5 см. Затем на равном расстоянии от краёв раневого дефекта был наложен один шов, в результате чего эпителий боковых краёв раны не соприкасался, и заживление происходило вторичным натяжением [6]. Все хирургические процедуры (операционные вмешательства) на животных проводили под общим наркозом (тиопентал-натрий, внутривенно, 42 мг/кг) в асептических условиях. Сразу после нанесения линейной кожной раны и затем ежедневно 1 раз в сутки животным первой опытной группы на область раны наносили 100 мг гидрогеля на основе ПГМГх/ф (далее – гидрогель), крысам второй опытной группы – левомеколь (Диоксометилтетрагидропиримидин + Хлорамфеникол) по аналогичной схеме. Контрольной группой служили животные с «естественным заживлением» ран. На 8-е сутки животных выводили из эксперимента методом декапитации под лёгким эфирным наркозом. О ранозаживляющем действии гидрогеля судили по данным тензиометрических и патоморфологических исследований.

Тензиометрию раневого рубца проводили на приборе ВЕ-5307 [1]. Для патоморфологических исследований вырезали участки раневой поверхности кожи с прилежащими неповреждёнными тканями, включая подкожную клетчатку, и фиксировали в 10%-м водном растворе формалина. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином [4].

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью пакета программ «Biostat-2006» с использованием t -критерия Стьюдента. Различия между сравниваемыми группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные тензиометрических исследований (табл. 1) свидетельствуют о том, что у животных первой опытной группы прочность рубца была на 65 % выше аналогичного показателя крыс контрольной группы. При этом препарат сравнения повышал данный показатель по отношению к контролю лишь на 48 %.

Таблица 1
Тензиометрические исследования

Группы животных	Прочность рубцовой ткани, кг
Контрольная ($n = 8$)	$0,25 \pm 0,02$
Опытная 1, гидрогель ($n = 8$)	$0,41 \pm 0,03^*$
Опытная 2, левомеколь ($n = 8$)	$0,37 \pm 0,02^*$

Примечание: * – различия статистически значимы при $p \leq 0,05$ между данными животных контрольной и опытной групп; n – количество животных в группе.

Данные патоморфологических исследований показали, что в контрольной группе у 3 животных ещё сохранялась раневая щель, а также выраженная воспалительная инфильтрация, преимущественно полиморфно-ядерными лейкоцитами и макрофагами, и отёк прилежащих к раневому дефекту тканей. Наблюдали кровоизлияния и явления пропитывания тканей экссудатом. Рост грануляционной ткани происходил с боков раны, которая имела рыхлую структуру и содержала большое количество вновь образованных капилляров. У 4 животных рана была покрыта струпом, под которым обнаруживали слой экссудата, содержащий эритроциты, полиморфно-ядерные лейкоциты, макрофаги и отдельные незрелые фибробласты (рис. 3). Грануляционная ткань, расположенная с боков и на дне раневого дефекта, была незрелой, в ней чётко не прослеживались горизонтальные слои фибробластов, коллагеновые волокна не были сформированы, что свидетельствует о вялотекущем процессе регенерации. В краях раны сохранялась полиморфно-клеточная инфильтрация и геморрагии.

ческое пропитывание. На границе грануляционной и аморфной некротической ткани у краёв раневого дефекта наблюдался рост недифференцированной эпителиальной ткани (рис. 4).

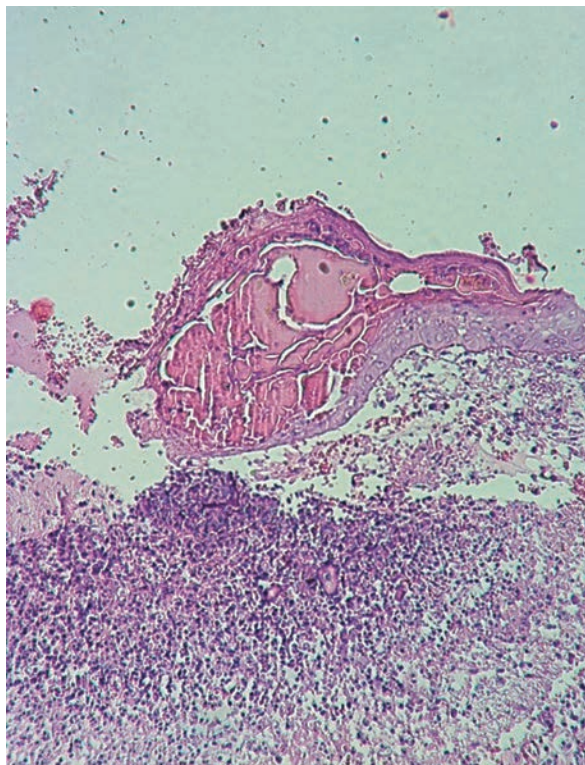


Рис. 3. Линейная рана кожи белых крыс контрольной группы; 8-е сутки эксперимента. Поверхность раны покрыта слоем некротических тканей, фибриноидным экссудатом, содержащим полиморфно-ядерные лейкоциты и макрофаги. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 10×10 .

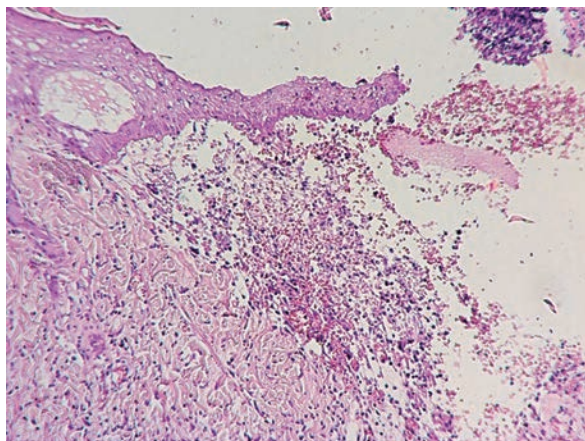


Рис. 4. Линейная рана кожи белых крыс контрольной группы; 8-е сутки эксперимента. Субэпителиальная инфильтрация полиморфно-ядерными лейкоцитами и эритроцитами. Отмечается рост эпителия на границе некротизированной дермы и мало дифференцированной грануляционной ткани. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 10×10 .

На фоне использования гидрогеля у всех животных опытной группы 1 наблюдалась регенерация эпителия по краям раневого дефекта, а также хорошо развитая грануляционная ткань с большим количеством фибробластов, гистиоцитов и мононуклеарных лейкоцитов. В грануляционной ткани

были видны ориентированные в горизонтальном направлении небольшие тяжи фибробластов и нити коллагена, сформированные в пучки, вертикальные капилляры, вокруг которых наблюдались скопления макрофагальных элементов, практически полностью замещающие полиморфно-ядерные лейкоциты. У 3 животных опытной группы 1 отмечалось полное отторжение струпа, у оставшихся животных он находился в процессе десквамации (рис. 5). В отличие от контроля отсутствовали некротические изменения, отек и воспалительная инфильтрация в прилежащих к раневому дефекту тканях, очевидно связанная с особенностями действия полигуанидинов [3, 8].

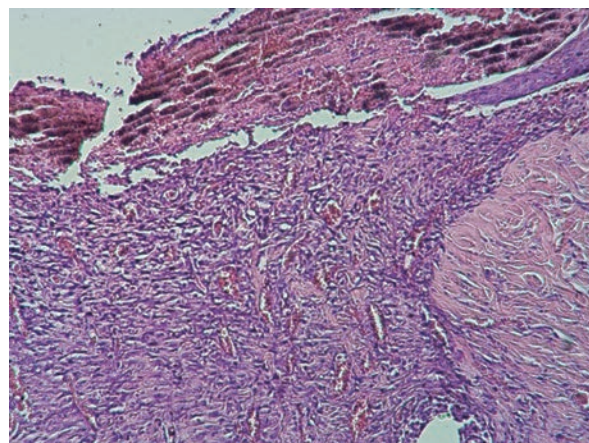


Рис. 5. Линейная рана кожи белой крысы, на которую наносили гидрогель; 8-е сутки эксперимента. Отторжение струпа. Под струпом находится грануляционная ткань, содержащая вертикальные сосуды. Краевая эпителизация раневого дефекта. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 10×10 .

У животных второй опытной группы, которым на рану наносили препарат сравнения левомеколь, также наблюдали заживление раны. При этом у 2 животных под струпом был отмечен экссудат, содержащий эритроциты, полиморфно-ядерные лейкоциты, макрофаги и единичные лимфоциты (рис. 6).

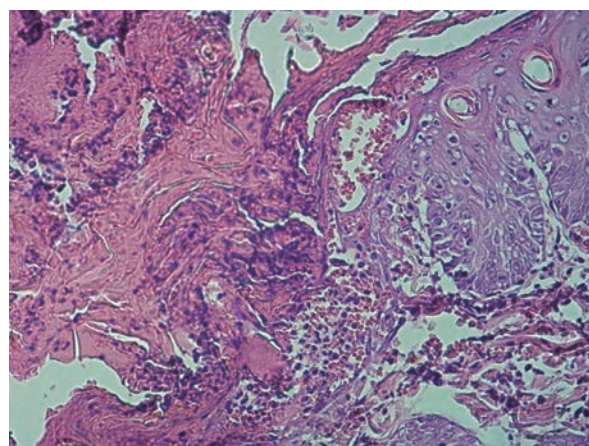


Рис. 6. Линейная рана кожи белой крысы, на которую наносили левомеколь; 8-е сутки эксперимента. Отторжение струпа. Под струпом находится грануляционная ткань, содержащая вертикальные сосуды. Краевая эпителизация раневого дефекта. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 10×20 .

Грануляционная ткань была менее зрелой, чем в первой опытной группе; в большем количестве

преобладали клеточные элементы, в сравнении с волокнистой структурой. В окружающей рану дерме, клетчатке и подлежащей мышечной ткани сохранялся отёк и воспалительная инфильтрация.

Таким образом, на модели линейной раны установлено выраженное ранозаживляющее действие гидрогеля ПГМГх/ф, о чём свидетельствуют результаты ранотензометрии и данные патоморфологических исследований, которые показали более высокую степень созревания грануляционной ткани и прочность рубца. Следует отметить, что гидрогель ПГМГх/ф, исследованный в данной работе, не содержал в себе активные антибиотические и антисептические соединения, поэтому в дальнейшем планируется создание комплексов гидрогеля с лекарственными средствами, в том числе и растительного происхождения.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Абаев Ю.К. Справочник хирурга. Раны и раневая инфекция. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2006. – 427 с.
Abaev YK (2006). Surgeon's guide. Wounds and wound infection [Spravochnik khirurga. Rany i ranevaya infektsiya], 427.
2. Афиногенов Г.Е., Панарин Е.Ф. Антимикробные полимеры. – СПб.: Гиппократ, 1993. – 264 с.
Afinogenov GE, Panarin EF (1993). Antimicrobial polymers [Antimikrobnye polimery], 264.
3. Ефимов К.М., Гембицкий П.А., Снежко А.Г. Полигуанидины – класс малотоксичных дезсредств пролонгированного действия // Дезинфекционное дело. – 2000. – № 4. – С. 32.
Efimov KM, Gembitskiy PA, Snezhko AG (2000). Polyguanidines – a class of low-toxic long acting disin-

fectants [Poliguanidiny – klass malotoksichnykh dez-sredstv prolongirovannogo deystviya]. *Dezinfektsionnoe delo*, (4), 32.

4. Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. – М., 1996. – 544 с.

Sarkisov DS, Perov YL (ed.) (1996). Microscopy equipment: manual [Mikroskopicheskaya tekhnika: Ru-kovodstvo], 544.

5. Очиров О.С., Могнонов Д.М., Стельмах С.А. Полимерные гидрогели на основе полигексаметилен-гуанидин гидрохлорида и формальдегида // ЖПХ. – 2015. – Т. 88, Вып. 2. – С. 332–335.

Ochirov OS, Mognonov DM, Stelmakh SA (2015). Polymer polyhexamethilenguanidine hydrochloride- and formaldehyde-based hydrogel [Polimernye gidrogeli na osnove poligeksametilenguanidin gidrokhlorida i formal'degida]. *Zhurnal prikladnoy khimii*, 88 (2), 332-335.

6. Убашеев И.О. Природные лекарственные средства при повреждениях органов и тканей. – Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 1998. – 224 с.

Ubasheev IO (1998). Natural drugs in organ and tissue injuries [Prirodnye lekarstvennye sredstva pri povrezhdeniyakh organov i tkaney], 224.

7. Flores FC, De Lima JA, Da Silva CR, Benvegna D, Ferreira J, Burger ME, Beck RCR, Rolim CMB, Rocha MIUM, Da Veiga ML, Da Silva CDB (2015). Hydrogels containing nanocapsules and nanoemulsions of tea tree oil provide antiedematogenic effect and improved skin wound healing. *J. Nanosci. Nanotech.*, 15 (1), 800-809.

8. Shi L, Yang N, Zhang H, Chen L, Tao L, Wei Y, Liu H, Luo Y (2015). A novel poly(glutamic acid)/silk-sericin hydrogel for wound dressing: Synthesis, characterization and biological evaluation. *Mater. Sci. Engin. C*, 48 (1), 533-540.

Сведения об авторах Information about the authors

Очиров Олег Сергеевич – инженер лаборатории химии полимеров ФГБУН «Байкальский институт природопользования» СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6; e-mail: olegoch@rambler.ru)

Ochirov Oleg Sergeyevich – Engineer of the Laboratory of Polymer Chemistry of Baikal Institute of Nature Management SB RAS (670047, Ulan-Ude, Sakhyanova str., 6; e-mail: olegoch@rambler.ru)

Разуваева Янина Геннадьевна – доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории безопасности биологически активных веществ ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, старший преподаватель медицинского института ФГБОУ ВПО «Бурятский государственный университет» (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6; тел.: 8 (3012) 43-37-13, факс: 8 (3012) 43-30-34; e-mail: tatur75@mail.ru)

Razuvaeva Yanina Gennadyevna – Doctor of Biological Sciences, Senior Research Officer of the Laboratory of Safety of Biologically Active Substances of Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Senior Lecturer of Medical Institute of Buryat State University (670047, Ulan-Ude, Sakhyanova str., 6; tel.: +7 (3012) 43-37-13, fax: +7 (3012) 43-30-34; e-mail: tatur75@mail.ru)

Бадмаев Никита Семёнович – аспирант лаборатории безопасности биологически активных веществ ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН (e-mail: morgan.1987@list.ru)

Badmayev Nikita Semyonovich – Postgraduate of the Laboratory of Safety of Biologically Active Substances of Institute of General and Experimental Biology SB RAS (e-mail: morgan.1987@list.ru)

Стельмах Сергей Александрович – кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории химии полимеров ФГБУН «Байкальский институт природопользования» СО РАН, старший преподаватель химического факультета ФГБОУ ВПО «Бурятский государственный университет» (e-mail: s_stelmakh@bk.ru)

Stelmakh Sergey Aleksandrovich – Candidate of Chemical Sciences, Research Officer of the Laboratory of Polymer Chemistry of Baikal Institute of Nature Management SB RAS, Senior Lecturer of the Department of Chemistry of Buryat State University (e-mail: s_stelmakh@bk.ru)

Могнонов Дмитрий Маркович – доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории химии полимеров ФГБУН «Байкальский институт природопользования» СО РАН, профессор химического факультета ФГБОУ ВПО «Бурятский государственный университет» (e-mail: dmog@binm.bscnet.ru)

Mognonov Dmitry Markovich – Doctor of Chemical Sciences, Chief Research Officer of the Laboratory of Polymer Chemistry of Baikal Institute of Nature Management SB RAS, Professor of the Department of Chemistry of Buryat State University (e-mail: dmog@binm.bscnet.ru)