

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ

Д.К. Гармаева, Н.Н. Петрова, С.Ф. Иванова, П.В. Никифоров,
Л.И. Аржакова

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО КЛЕЯ НА ОСНОВЕ МЕСТНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ КОЖНЫХ РАН

УДК. 615.262.55.076.9:59

В статье изложены результаты экспериментальных исследований разработанного биологического клея на основе плавательного пузыря осетровых рыб. С помощью ИК-спектроскопии исследован состав клея, его клеящая способность при соединении полосок натуральной кожи, методами оптической и атомно-силовой микроскопии изучена структура клея. Получены результаты планиметрических исследований экспериментальной модели кожной раны на лабораторных животных при использовании разработанного тканевого клея. Выявлено, что покрытие раны биологической пленкой с лекарственными наполнителями показывает хорошую адгезию на раневой поверхности, отсутствие раздражающего действия, а также оказывает стимулирующее влияние на процессы заживления кожных ран.

Ключевые слова: биологический клей, плавательный пузырь осетра, раневая поверхность кожи, эксперимент.

Article presents the results of experimental studies of biological adhesive developed by the swimming bladder of sturgeon. Glue composition were investigated by IR-and UV-spectroscopy, adhesive properties in tying two strips of leather was investigated by measurement of tensile strength. Glue structure was investigated by light and atomic force microscopes. Results are obtained planimetric studies of experimental model of cutaneous wounds in laboratory animals using the developed tissue adhesive. The covering of a wound biological film with drug excipients shows good adhesion on the wound surface, the lack of irritation, as well as a stimulating effect on the healing process of skin wounds.

Keywords: biological glue, swimming bladder of sturgeon, wound surface, experiment.

В настоящее время активно разрабатываются и внедряются медицинские тканевые клеи различной природы, совершая революционные изменения в хирургии [3, 5]. Вместе с тем существующие клеи имеют свои преимущества и недостатки. В частности, биологические клеи на фибриновой основе не выдерживают нагрузок при растяжениях, синтетические клеи (цианокрилаты) гистотоксичны, слабо скрепляются с тканями [3–5]. Вышеперечисленные недостатки существующих тканевых клеев ограничивают возможность применения этих композиций в хирургии. Все изложенное свидетельствует о большой актуальности вопроса разработки новых оптимальных физиологически активных неиммунотенных композиций для повышения эффективности хирургических технологий и консервативного лечения, стимулирует проведение совместных исследований химиков, морфологов и хирургов.

В последнее время в лечении кожных ран стали активно разрабатывать и внедрять биodeградирующие материалы на основе биологических

полимеров – коллагена, желатина, хитозана. Основными преимуществами данных материалов являются высокая адсорбирующая способность, высокая адгезия в ране, отсутствие токсичности и раздражающего действия, благоприятное влияние на репаративные процессы кожи [1,2,6,7]. Вместе с тем в доступной литературе мало исследований по применению биологических композиций на основе коллагена рыб в лечении ран. В то же время в работах В.И. Лукьяненко выявлено, что состав рыбного коллагена практически родственен коллагену человека [1,2,6,7].

Учитывая вышеизложенное, для изготовления тканевого клея нами выбран биологический полимер – коллаген из плавательного пузыря северных осетровых рыб. Издавна у народа саха осетровые рыбы шли в пищу, а из их плавательных пузырей варили клей, который применялся для склеивания древесины, приклеивания шкуры оленя к лыжам и других бытовых нужд, а также в народной медицине.

Цель исследования: разработка биологического тканевого клея на основе плавательного пузыря северных осетровых рыб, и экспериментальное изучение его в лечении кожных ран у животных.

В соответствии с поставленной целью сформулированы следующие задачи:

1. Разработка технологии получения клея и его рецептур на основе биополимера (коллаген плавательного пузыря северных осетровых рыб).

2. Изучение химического состава,

физико-химических свойств биологического композиционного материала.

3. Моделирование кожной раневой поверхности у экспериментальных животных.

4. Изучение влияния полученного тканевого клея на основе биополимера на процесс заживления раневой поверхности у экспериментальных животных.

Материалы и методы исследования. Экспериментальное исследование проводилось в несколько этапов: 1-й – изучение химического состава, физико-химических свойств биологического материала из плавательного пузыря северных осетровых рыб, 2-й – разработка технологии получения биологических пленок на основе рыбьего коллагена и их рецептур, 3-й – опытные работы на экспериментальных животных.

В качестве подопытных животных выбраны лабораторные крысы массой 180–220 г. При этом были использованы самки, поскольку у них менее грубый подшерсток. Все манипуляции проводились под эфирным наркозом согласно «Правилам работы с экспериментальными животными». Перед началом проведения эксперимента в течение недели животные выдерживались в специальной аудитории кафедры анатомии Медицинского института СВФУ им. М.К. Аммосова для адаптации к новым условиям, на стандартном рационе питания со свободным доступом к пище и воде. Предварительно все животные взвешивались, тщательно осматривались на наличие

ГАРМАЕВА Дарима Кышектовна – д.м.н., проф. Медицинского института СВФУ им.М.К. Аммосова, dari66@mail.ru; **ПЕТРОВА Наталья Николаевна** – д.х.н., зав. кафедрой БГФ СВФУ, pnn2002@mail.ru; **ИВАНОВА Светлана Федоровна** – магистрант БГФ СВФУ, isf1990@mail.ru; **НИКИФОРОВ Петр Владимирович** – студент 5 курса МИ СВФУ, nicciforov85@gmail.ru; **АРЖАКОВА Лена Игнатьевна** – к.м.н., доцент МИ СВФУ.

видимой патологии и признаков болезней, при выявлении патологии животные выбраковывались и в эксперимент не включались.

Экспериментальная модель кожной раны выполнялась после тщательного удаления волосного покрова верхнего отдела дорсальной части туловища животного. В межлопаточной области маркером при помощи картонного шаблона наносили контур будущей раны. Затем скальпелем иссекалась кожа до подкожно-жировой клетчатки. Для изучения заживляющей способности полученного биологического клея на основе коллагена плавательного пузыря осетра были изготовлены два вида пленок: 1) биологические пленки без добавления лекарственных компонентов; 2) биологические пленки с добавлением лекарственных компонентов. В результате животные были распределены на три группы: 1-я – контрольная, с экспериментальной кожной раневой поверхностью без коррекции; 2-я – опытная, с покрытием раневой поверхности биологической пленкой без лекарственных компонентов, 3-я – опытная, с покрытием раневой поверхности биологической пленкой с содержанием лекарственных компонентов.

Для оценки эффективности лечения проводилось тщательное динамическое наблюдение за общим состоянием животных, местным течением раневого процесса, ходом заживления раны. Экспериментальная модель кожной раны исследовалась на 3-, 7-, 10-, 17-, 23-и сутки от начала эксперимента. Клиническая оценка результатов проводилась на основе динамического визуального и планиметрического подходов. Для расчета суточной скорости сокращения площади раны при заживлении использовали формулу, предложенную Л.Н. Поповой (1942): $V = (S - S_n) \times 100 / S \times t$, где S – величина площади при предшествующем измерении, S_n – величина площади раны в момент очередного контроля, t – число дней между первым и последним измерением [4].

Результаты и обсуждение. При физико-химическом исследовании нами выявлено, что плавательный пузырь осетровых рыб почти полностью состоит из чистого коллагена. На микротографиях, полученных нами на оптическом микроскопе Olimpus Bh-2, можно выделить отдельные фибриллы коллагена размером 19–23 мкм, собранные в пучки в виде волокон размером до 300–400 мкм (рис. 1).

По данным атомно-абсорбционного анализа, содержание тяжелых метал-

лов не превышало предельно-допустимой концентрации. Исследование химического состава показало, что клей из плавательного пузыря осетровых рыб представляет собой водный раствор белка коллагена, полимерная молекула которого состоит из более чем 20 аминокислот. В полученных на ИК-спектрометре Paragon-1000 спектрах плавательного пузыря и клея из него выявлены несколько относительно сильных полос поглощения, которые, как правило, относятся к колебаниям пептидной группы как общему структурному компоненту белковых молекул. В плавательном пузыре в области 1660,1 см⁻¹ проявляется сильная полоса, которая относится к валентному колебанию группы –СО и называется амид I, также вблизи области 1510–1570 см⁻¹ проявляется полоса амид II. Полосы амид I и II свидетельствуют о наличии α-спирали. При сравнении спектров плавательного пузыря (нативный коллаген) и клея из него (денатурированный коллаген) выявлено исчезновение полос поглощения амид I и амид II, т.е. происходит полное разрушение α-спирали, связанное с денатурацией нативного коллагена при термической обработке (рис. 2).

Для оценки адгезионной способности приготовленного клея проводили модельные эксперименты на образцах натуральной кожи, пластины которой склеивали с помощью разработанного клея и клея БФ-6. Клей БФ-6 представляет собой спиртовой раствор на основе поливинилбутирала и бакелитового лака, это один из самых известных в России медицинских клеев на основе синтетических полимеров. Усилие расслаивания предварительно склеенных пластин определяли в соответствии с ГОСТ 6768-75 «Метод определения прочности связи между слоями при расслаивании».

Анализ графиков зависимости силы расслаивания от времени для образцов, соединенных медицинским клеем БФ-6 (рис. 3, а) и клеем из плавательного пузыря (рис. 3, б), показывает, что разработанный нами клей обладает высокой клеящей способностью. При склеивании образцов натуральной кожи усилие расслаивания для клея из плавательного

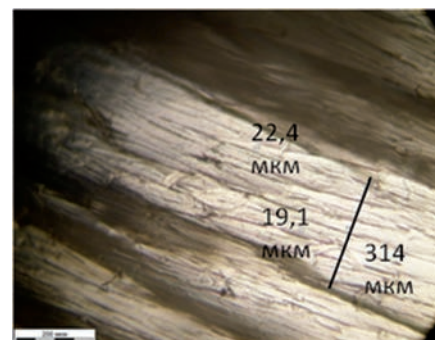
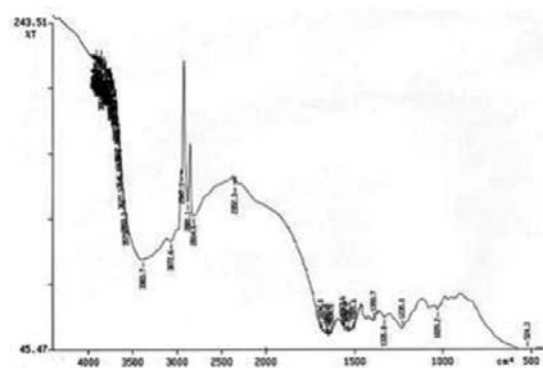


Рис. 1. Структура коллагена из плавательного пузыря осетровых рыб, снятая на оптическом микроскопе (1 см – 200 мкм)

пузыря в 4,5 раза выше, чем аналогичный показатель для БФ-6.

При исследовании структуры коллагена и ее изменения при приготовлении клея методом атомно-силовой микроскопии наблюдается различие рельефов поверхности образцов пленок разного состава по сравнению с исходным плавательным пузырем (рис. 4). В случае плавательного пузыря поверхность более рельефная (рис. 4, а) и соответствует фибриллярной структуре, что хорошо соотносится с данными оптической микроскопии. После термической обработки наблюдается аморфная структура пленок, что соответствует переходу коллагена

а



б

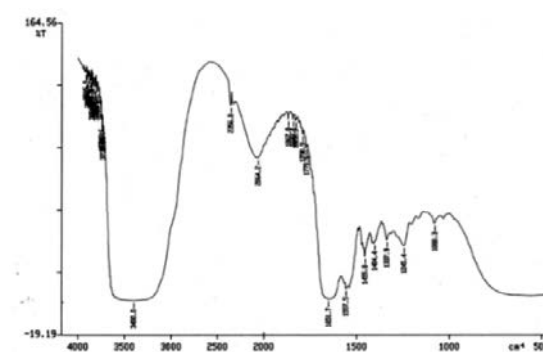


Рис. 2. ИК-спектры поглощения плавательного пузыря осетра (а) и клея из него (б)

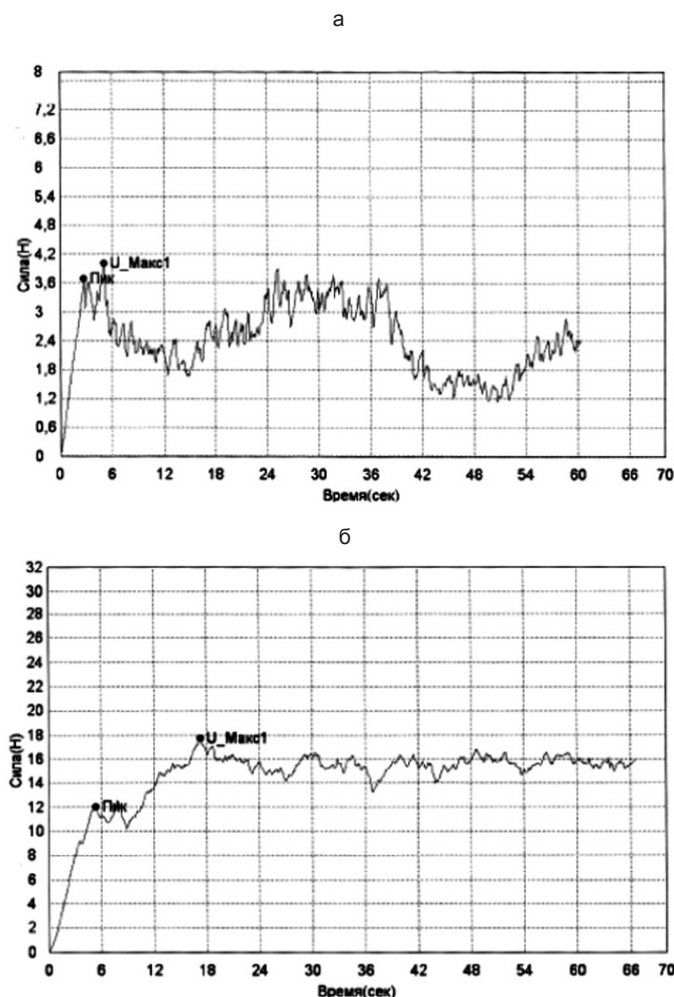


Рис. 3. Зависимость силы расслаивания Н от времени для образцов, соединенных медицинским клеем БФ-6 (а) и клеем из плавательного пузыря (б)

в желатину (рис. 4, б). Введение лекарственных компонентов практически не влияет на структуру желатина и другие свойства пленок, но повышает вязкость клея (рис. 4, в).

Для оценки эффективности лечения осуществляли тщательное динамическое визуальное исследование за общим состоянием животных, местным течением раневого процесса, ходом заживления раны. На 3-и сутки эксперимента у первой (контрольной) группы животных без лечения кожная рана покрыта тонким полупрозрачным налетом красноватого цвета, прилегающая к краям раны кожа отека и гиперимирована. Наряду с этим по периметру раны прослеживается неровная кайма розового цвета шириной 1 мм, демонстрирующая начало процесса краевой эпителизации. Раневая поверхность сократилась на 43 мм² и составила 98,27 мм². В эти сроки у второй группы животных рана, покрытая биологической пленкой без лекарственных компонентов, темно-бордового цвета,

сама биологическая пленка плотноватая, неровная. Прилежащая к раневой поверхности кожа не имеет видимых патологий. По периметру раны визуализируется четкая кайма розового цвета шириной 1 мм. По сравнению с первыми сутками раневая поверхность сократилась незначительно (от 141 мм² до 109,5). У третьей группы животных рана, покрытая биологической пленкой с лекарственными компонентами ровная, темно-бордового цвета, по всему периметру раны четко просматривается кайма розового цвета шириной до 1 мм, также информирующая о начале процесса фазы регенерации. Раневая поверхность сократилась на 49,46 мм² и составила 91,84 мм².

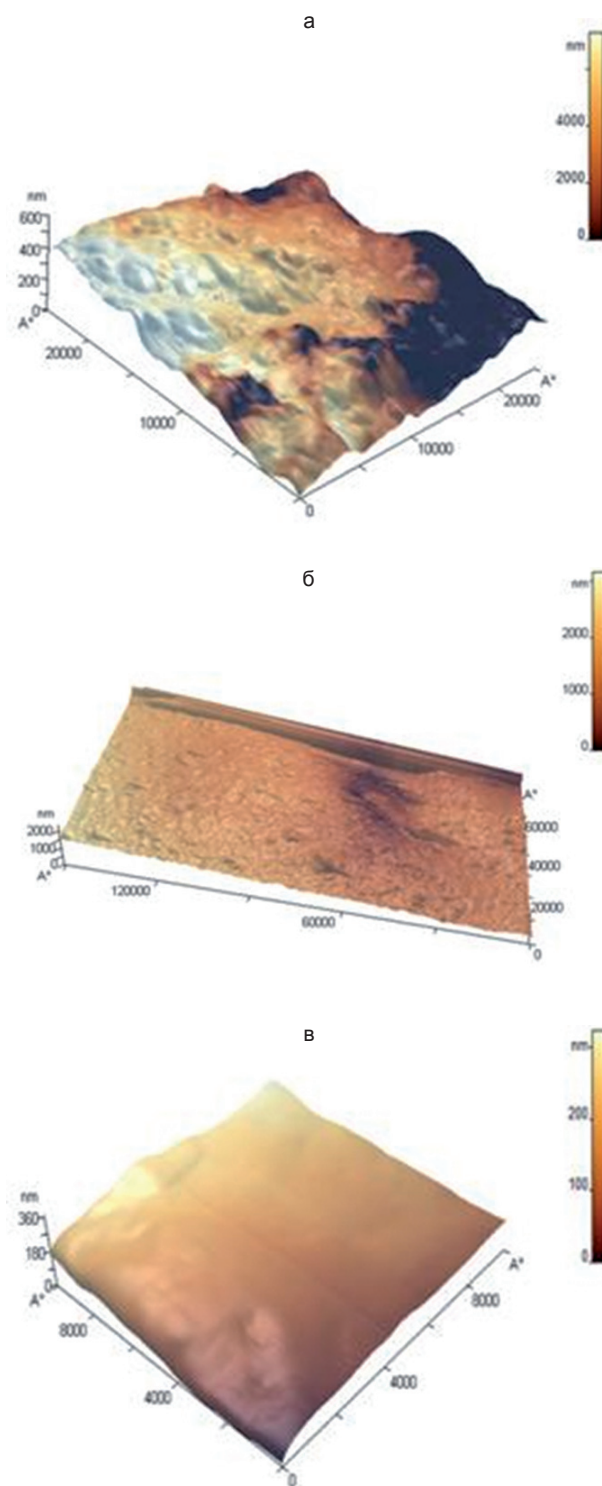


Рис. 4. Изображения рельефа поверхности плавательного пузыря и пленок разного состава на его основе в 3D-режиме, полученные с помощью АСМ: а) плавательный пузырь, б) пленка из клея без добавок, в) пленка с лекарственным компонентом

На 7-е сутки эксперимента у первой (контрольной) группы раневая поверхность покрыта плотным раневым струпом темно-бордового цвета. По периметру раны визуализируется кайма розового цвета шириной 2 мм.

В прилежащей ткани сохраняется небольшая отечность и гиперемия. Площадь раны составила 43,55 мм², что на 54,72 мм² меньше, чем на третьи сутки. У второй группы животных на эти сутки рана закрыта неровным тонким покрытием темно-бордового цвета, по всему периметру визуализируется четкая полоска розового цвета шириной 2 мм. Раневая поверхность по сравнению с третьими сутками уменьшилась с 109,5 до 52,35 мм². У третьей группы животных с биологической пленкой, модифицированной лекарственными компонентами, по всей ране отмечается ровное тонкое покрытие темно-бордового цвета, по периметру раны – розовая оформленная кайма шириной 3 мм. Раневая поверхность по сравнению с третьими сутками сократилась с 91,84 мм² до 38,85.

На 10-е сутки эксперимента у первой группы дно раневого дефекта находится под тонким плотным неровным раневым струпом бордового цвета, легко отделяемым скальпелем. Под струпом видна раневая поверхность, покрытая прозрачным слоем красноватого цвета, малейшее повреждение которой приводило к капиллярному кровотечению. Прилежащая ткань без видимых патологий. Площадь раневой поверхности сократилась по сравнению с 7-ми сутками с 43,55 мм² до 17,89. У второй группы животных с биологической пленкой без лекарственных компонентов рана затянута тонким ровным покрытием темно-бордового цвета, хорошо сращенным с раневой поверхностью. По краю раны отмечается небольшая полоска рубцовой ткани. Площадь раневой поверхности сократилась незначительно по сравнению с контрольной и третьей группами и составила 40,42 мм². У третьей группы животных биологическая пленка, модифицированная лекарственными препаратами, плотно сращена с раневой поверхностью тонким ровным слоем темно-коричневого цвета. По контуру раны полоска светло-розового цвета шириной 3-4 мм, внешне соответствующая эпителию интактного кожного покрова, указывающая на результат процесса краевой эпителизации. Площадь раневой поверхности сократилась до 10,59 мм², что меньше чем у контрольной на 7,3 и второй группы животных на 29,8%.

Анализ суточной скорости заживле-

ния кожного дефекта у исследуемых групп животных показал, что у третьей группы животных, с биологической пленкой, модифицированной лекарственными наполнителями, этот показатель выше, чем в контрольной группе без коррекции и во второй группе животных с биологической пленкой без лекарственных наполнителей. Так, на 3-и сутки эксперимента скорость заживления раневой поверхности у третьей группы составила 11,7% в сутки, тогда как у контрольной – 10,2 и у второй группы – 7,5% в сутки. При этом видно, что у второй группы животных на 3-и сутки скорость заживления раны ниже, чем у контрольной. На 7-е сутки эксперимента данный показатель у третьей группы также выше – 12,1%, тогда как у контрольной – 9,9 и у второй группы животных – 10,5%. На 10-е сутки эксперимента суточная скорость заживления раневой поверхности у контрольной группы составила 8,7%. По сравнению с контрольной и второй группой животных, с биологической пленкой без лекарственных наполнителей, данный показатель выше у третьей группы с биологической пленкой модифицированной лекарственными компонентами – 10,3% (рис. 5).

Таким образом, анализ визуального наблюдения и планиметрических показателей экспериментальной раневой поверхности показал, что покрытие раны биологической пленкой с лекарственными наполнителями показывает хорошую адгезию на раневой поверхности, отсутствие раздражающего действия, а также оказывает стимулирующее влияние на процессы заживления кожных ран и служит основанием для дальнейших экспериментальных работ.

Литература

1. Иванов Ю.В. Репителлизация кожной раны под покрытием на основе коллагена / Ю.В. Иванов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1998. - №1. - С. 110.

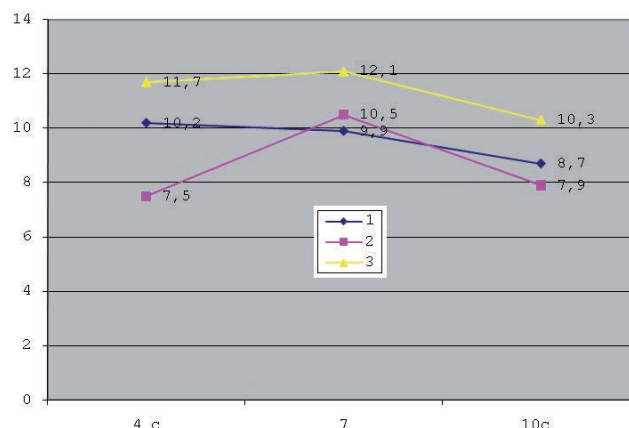


Рис. 5. Динамика суточного заживления раневой поверхности у экспериментальных животных

Ivanov Y.V. Reepithelialization of the skin wound under cover on the basis of collagen / Y. V. Ivanov // Bulletin of Experimental biology and medicine. -1998. - № 1. - P.110.

2. Иванова Л.А. Коллаген в технологии лекарственных форм / Л.А.Иванова, И.А.Сычеников, Т.С.Кондратьева – М.: Медицина, 1984. - 112 с.

Ivanova L.A. Collagen in pharmaceutical experience / L.A.Ivanova, I.A. Sychenikov, T.S. Kondratyeva. – M.: Medicine, 1984. – 112 p.

3. Попов В.А. Физико-химическое и клинико-анатомическое обоснование применения нового поколения тканевых клеев / В.А.Попов, Н.В.Сиротинкин // Теория и практика прикладных анатомических исследований в хирургии: материалы Всероссийской науч. конф. – СПб: ВМедА, 2001. -С.10-13.

Popov V.A. Physico-chemical, clinical and anatomical study of the new generation of tissue adhesives application / V.A.Popov, N.V. Sirotinkin // Theory and practice of applied anatomical research in surgery: All-Russian scientific conf. – Spb: VMedA. – 2001.

4. Пышков Е.А. Тканевой клей / Е.А. Пышков // Жизнь и безопасность. - СПб., 2002. -№3. - С.19-23.

Pyshkov E.A. Tissue glue /E.A. Pyshkov // Zhizn' i bezopasnost'. -Spb., 2002.-№№. -P. 19–23.

5. Хомулло Г.В. Репаративная регенерация и кальцитонин / Г.В. Хомулло, А.Н.Черняев, Т.В. Иваненко// Проблемы регенерации в эксперименте и клинике: сб. науч. трудов, посв. 75-летию проф. Г.В. Хомулло. – Тверь, 1999. - С. 7-11.

Homullo G.V. Reparative regeneration and calcitonin / G.V. Homullo, A.N. Chernyaev, T.V. Ivanenko / / Problems of regeneration in experiment and clinics: Proceedings, devoted to the 75th anniversary of prof. G.V. Homullo. – Tver, 1999. – P. 7–11.

6. Akan T. Acceleration of wound healing by gelatin film dressings with epidermal growth factor / T Akane, N Toshiaki, M Hiroshi //Journal of Veterinary Medical Science 67. - 2005.-P. 909-913.

7. Therapeutic potential of Chitosan and its derivatives in regenerative medicine/ C Shi, Y Zhu, X Ran [et al.] // Journal of Surgical research. -2009. -133. –P.185-192.