

Е.В. Зиновьев^{1,2}, В.Н. Цыган¹, И.В. Арцимович²,
М.С. Асадулаев², М.Б. Панеях², В.В. Зубов²,
С.А. Лукьянов², Д.В. Костяков², А.А. Жилин¹, И.М. Лопатин²,
А.А. Уманская², К.Ф. Османов¹, С.Н. Кравцов¹, А.В. Апчел¹,
Ю.А. Золотарев³, А.К. Дадаян³, К.А. Дадаян³

Экспериментальная оценка эффективности местного лечения ожогов кожи гидрогелем легкодиспергируемого карбопола 2020 с пептидом человеческого лейкозного фактора дифференцировки-6

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург

³Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва

Резюме. Приводятся результаты экспериментальной оценки эффективности местного применения пептида человеческого лейкозного фактора дифференцировки-6 в гидрогеле легкодиспергируемого карбопола 2020 при термических ожогах кожи III степени. Установлено, что местное применение пептида человеческого лейкозного фактора дифференцировки-6 в гидрогеле легкодиспергируемого карбопола 2020 в концентрации от 0,01% до 0,00001% вызывает ускорение процессов эпителизации ран к 28-м суткам на 71,11% ($p < 0,01$) и снижает частоту развития гнойных осложнений на 62,5% ($p < 0,05$). При гистологическом исследовании биоптатов ран выявлены существенные особенности морфометрии с учетом избранного способа лечения и концентрации пептида человеческого лейкозного фактора дифференцировки-6 в гидрогеле карбопола. Предложенная методика местного лечения ожоговых поражений кожи представляется весьма перспективной для оптимизации течения процессов репаративной регенерации. Низкая частота гнойных осложнений в группе животных, лечение которых осуществлялось с минимальным содержанием пептида, может быть обусловлено комбинированным действием гидрогеля карбопола как детерминанты заживления ран во влажной среде и оптимальной концентрацией пептида человеческого лейкозного фактора дифференцировки-6, обеспечивающей противовоспалительный эффект в минимальной концентрации. Анализ гистологической картины в исследуемых группах животных позволяет заключить об ускорении формирования внеклеточного матрикса и эпителизации раневой поверхности на фоне аппликации пептида человеческого лейкозного фактора дифференцировки-6 в минимальной концентрации. На 14-е сутки наблюдения число микрососудов в грануляционной ткани среди животных, получавших человеческий лейкозный фактор дифференцировки-6 в гидрогеле легкодиспергируемого карбопола 2020 с минимальной концентрацией (0,00001%), оказалось на 40,6–43,75% больше, чем в группах сравнения. Применение биологически активных пептидов является одной из перспективных методик оптимизации раневого процесса. Пептид человеческого лейкозного фактора дифференцировки-6 обладает способностью избирательно стимулировать пролиферацию за счет усиления окислительно-восстановительных процессов в клетках.

Ключевые слова: ожог кожи, человеческий лейкозный фактор дифференцировки-6, репаративная регенерация, восстановление кожного покрова, легкодиспергируемый карбопол 2020, гидрогель, влажная среда, новые технологии.

Введение. По данным Росстата, в 2017 г. в Российской Федерации зарегистрировано 278,2 тысяч пациентов с диагнозом термический и химический ожог, при этом среди них 68,7 тысяч – дети [9]. Ожоги являются одной из основных причин инвалидности взрослого и детского населения развитых стран. Экономические затраты на лечение таких пострадавших представляют значительную проблему. Сводные данные свидетельствуют о снижении частоты термических и химических поражений среди населения России за последнее десятилетие, однако проблема лечения таких пострадавших остается актуальной и дискуссионной [10].

Современная тактика лечения ожоговых поражений является мультидисциплинарной и проводится с

учетом особенностей патогенеза ожоговой болезни и её осложнений [3]. Благодаря прогрессу медицинской науки внедрены патогенетически обоснованные методики антибактериальной терапии, иммунокоррекции и местного лечения ран [2]. Перспективным представляется разработка новых методик лечения поверхностных и глубоких ожоговых поражений биотехнологическими, в том числе клеточными продуктами, биополимерными раневыми покрытиями с живыми клетками – скаффолдами [1, 5].

Один из перспективных путей повышения эффективности лечения ожоговых поражений предусматривает использование ростовых стимуляторов и факторов регенерации, в частности эпидермального, фибробластического, тромбоцитарных факторов ро-

ста: собственно тромбоцитарный фактор роста A+B, инсулиноподобные факторы роста I, II. Среди них привлекает внимание пептид человеческий лейкозный фактор дифференцировки (ЧЛФД), выделенный из культуральной среды клеток человеческого промиелоцитарного лейкоза HL-60 в 1994 г. Установлено, что субстанция ЧЛФД вызывает дифференцировку клеток по гранулоцитарному пути [6]. В структуре обнаружен шестичленный фрагмент ЧЛФД-6, который обеспечивает способность полноразмерного фактора индуцировать дифференцировку и ингибировать пролиферацию клеток, в том числе HL-60 [10]. Кроме этого, пептид обладает способностью взаимодействовать с липидами клеточных мембран, что сказывается на активности цитокинов, задействованных в пролиферации и дифференцировке клеток [6]. Е.Д. Даниленко и др. [4] показали, что ЧЛФД-6 усиливает окислительно-восстановительные процессы в клетках и повышает метаболическую активность макрофагов. В сыворотке крови определяются ЧЛФД-6 и антитела к этому пептиду, что позволяет предположить о гуморальной регуляции его синтеза. Так как пептид ЧЛФД-6 не имеет специфических рецепторов на клеточной мембране, то его воздействие может распространяться на различные популяции клеток организма [10].

Основой для создания перспективных ранозаживляющих средств и рецептур на основе пептида ЧЛФД-6 может послужить гидрогель редкосшитых акриловых полимеров (карбополов), в частности легкодиспергируемый карбопол 2020. На их основе образуются стабильные гидрогели, они термически и химически устойчивы. Получены экспериментальные данные об эффективности применения гидрогелей для лечения обширных ран и ожогов [7].

Цель исследования. Оценить эффективность и влияние белка ЧЛФД-6 в гидрогеле легкодиспергируемого карбопола 2020 на репаративную регенерацию при ожогах кожи.

Материалы и методы. В эксперименте участвовало 48 самцов крыс линии Wistar-Kyoto массой 230–250 г. Все манипуляции выполнялись под общим ингаляционным наркозом в асептических условиях. Ожог воспроизводили по собственной оригинальной методике (рационализаторское предложение Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова № 14287/1 от 19.01.2016). После подготовки операционного поля животное фиксировали к лабораторному столу. Площадь ожога составляла 16 см² (около 10% от площади тела). На депилированную кожу спины животного помещали датчик электротермопары мультиметра «Electroline» (Китай), которым определяли температуру кожи и металлической нагревательной пластины. Время экспозиции – 10 с при температуре на поверхности кожи 95–97°C.

Для возможности нанесения на раневую поверхность пептид ЧЛФД-6 в различных разведениях был растворен в гидрогеле редкосшитых акриловых полимеров, который представляет собой электро-

физически обработанную частично модулированным сигналом электрического поля воду (99,55%) и полимер 0,45% акриловой кислоты легкодиспергируемого карбопола (рис. 1).

Всем животным спустя 60 мин после ожога выполнялась некрэктомия до собственной фасции, края раны фиксировались к подлежащим тканям узловыми швами. Гидрогель, содержащий пептид ЧЛФД-6, ежедневно наносили на поверхность раны в течение 7 суток.

Животные были разделены на 6 групп – по 8 животных в каждой с учетом концентрации пептида ЧЛФД-6 в геле. В 1-й группе концентрация пептида составила 0,01%, во 2-й группе – 0,001%, в 3-й группе – 0,0001%, в 4-й группе – 0,00001%, в 5-й группе гидрогель наносился без пептида ЧЛФД-6, в 6-й группе выполнялась только ранняя хирургическая некрэктомия без последующего лечения.

Оценку эффективности лечения выполняли ежедневно, осуществляли осмотр ран, отмечали характер отделяемого, а также оценку осложнений и летальные исходы. Планиметрически по методике Л.Н. Поповой [12] определяли площадь ожога и вычисляли индекс заживления по следующей формуле:

$$\text{Индекс заживления} = \frac{(S - S_n) \times 100}{S \times T},$$

где S – площадь ожога при предыдущем измерении, мм²; S_n – площадь ожога при данном измерении, мм², T – интервал между измерениями, сут.

Отбор биоптатов для гистологического исследования осуществляли на 14-е и 28-е сутки, их фиксировали в 10% растворе формалина с последующей проводкой через спирты восходящей концентрации (30–96%) и заливкой в парафин. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, исследовали методами световой микроскопии.

В ходе исследований соблюдались положения «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [12].

Полученные данные обрабатывались методами вариационной статистики. Критерием достоверности считали величину p < 0,05 при сравнении с группой контроля, в которой применялся гидрогель без пептида ЧЛФД-6, и величину p < 0,2 при сравнении с группой контроля, в которой выполнялась некрэктомия без дополнительного лечения.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что выполнение ранней хирургической некрэктомии в зоне глубокого ожога кожи с последующим нанесением гидрогеля с пептидом ЧЛФД-6 сопровождалось достоверным сокращением площади раны, при этом величина показателей определялась концентрацией пептида в гидрогеле. В частности, на 28-е сутки при концентрации пептида 0,01% площадь раны уменьшилась на 94,32% (до 0,91 см²), при концентрации 0,001% – на 74,44% (до 4,09 см²), при концентрации 0,0001% – на 91,32% (до 1,39 см²), при концентрации 0,00001% – на 94,38% (до 0,90 см²); в группе, в кото-

рой наносился гидрогель без ЧЛФД-6, – на 93,04% (до 1,13 см²); в группе, в которой выполнялась только некрэктомия, – на 90,38% (до 1,54 см²), таблица 1.

Частота нагноения ран в анализируемых группах составила: 1 животное в 1-й группе, 2 животных в 3-й и 5-й группах, 3 животных во 2-й группе, 5 животных в 6-й группе, в 4-й группе нагноения ран не наблюдалось (рис. 2).

При гистологическом исследовании биоптатов ран установлено, что на 14-е сутки морфологическая картина в зоне ожога имела ряд особенностей с учётом выбора способа лечения. Послеоперационная рана в различных группах животных была различной площади, покрыта массами фибрина, густо инфильтрированного нейтрофильными лейкоцитами (рис. 3).

Дно раневого дефекта представлено грануляционной тканью, распространяющейся вплоть до мышечной фасции. Макрофаги и нейтрофилы располагаются диффузно, наиболее густо инфильтрованы поверхностные слои. В прилежащих к фасции отделах отмечаются небольшие очаги инфильтрации лимфоцитами. В 4-й группе смешаноклеточная инфильтрация незначительно распространялась на окружающие ткани, в то время как в 1-й, 2-й и 3-й группах констатированы достаточно крупные очаги субэпидермальной лейкоцитарной инфильтрации. В 5-й группе нейтрофильные лейкоциты располагаются не только в дерме, но и в самом эпидермисе, формируя немногочисленные микроабсцессы. Кроме того, в грануляционной ткани определяются многочисленные пролиферирующие полнокровные сосуды капиллярного типа. Количество микрососудов в грануляционной ткани в группах существенно различалось (рис. 4).

На 28-е сутки дно дефекта было представлено грубоволокнистой соединительной тканью с большим количеством крупных фибробластов (рис. 5).

В соединительной ткани сохраняется очаговая инфильтрация лимфоцитами и макрофагами: в 1-й и 4-й группах с незначительным числом нейтрофильных лейкоцитов, в то время как в 2-й и 3-й группах их количество было умеренное. В 5-й группе число нейтрофильных лейкоцитов также умеренное, но в ряде наблюдений выявлены мелкие внутридермальные абсцессы, лимфогистиоцитарная инфильтрация более выражена, очаги несколько крупнее, сливаются

друг с другом. Кроме того, в 5-й группе лейкоцитарные инфильтраты распространяются на эпидермис по краям дефекта. Сосуды соединительной ткани представлены капиллярами и мелкими венулами. Эндотелиоциты этих сосудов крупные, пролиферирующие, с округлыми гиперхромными ядрами и скудной эозинофильной цитоплазмой.

В этот же срок в биоптатах, отобранных у животных 6-й группы, перенесших раннюю хирургическую некрэктомию без местного лечения, в отличие от других групп, на дне дефекта располагался слой грануляционной ткани с крупноочаговой инфильтрацией преимущественно нейтрофильными лейкоцитами (рис. 6). Очаги локализовались непосредственно под фибринозным экссудатом, на поверхности дефекта. В отдельных участках отмечается формирование грубоволокнистой соединительной ткани с многочисленными, достаточно крупными фибробластами. Сосуды в ткани на дне дефекта полнокровные, представлены множественными капиллярами и немногочисленными мелкими венулами с пролиферирующим эндотелием. Эпидермис по краям дефекта с выраженным акантозом, гиперкератозом и мелкоочаговой лейкоцитарной инфильтрацией.

Закключение. Применение гидрогеля, содержащего пептид ЧЛФД-6, может являться перспективной методикой оптимизации течения процессов репаративной регенерации при ожогах кожи. На фоне его применения в различных концентрациях к 28-м суткам площадь ран сокращается на 94,38%, а частота развития гнойных осложнений раневого процесса при этом снижается на 62,5%.

Наилучшие результаты отмечаются при местном использовании гидрогеля с минимальным содержанием пептида ЧЛФД-6, разведенного 0,00001%. В данном случае у крыс площадь раневой поверхности на 28-е сутки сократилась с 16 см² до 0,90 см² (т. е. на 94,38%), при этом гнойных осложнений не отмечено. При местном применении гидрогеля с 0,01% концентрацией пептида ЧЛФД-6 наблюдалась схожая динамика уменьшения площади ран, однако частота гнойных осложнений оказалась выше (12,5%) и отмечен один летальный исход. В группе, в которой наносился гидрогель без пептида ЧЛФД-6,

Таблица 1

Результаты планиметрической оценки эффективности ранозаживляющих средств

Группа	Площадь раны в сроки (сутки), см ²			
	7	14	21	28
1-я	8,78±1,34*, **	3,78±1,49*, **	1,80±0,82*, **	0,91±1,02 *, **
2-я	12,20±1,32*, **	10,29±1,46*, **	7,88±0,83*, **	4,09±1,02*, **
3-я	11,08±1,30*, **	9,13±1,46*, **	2,93±0,83*, **	1,39±1,03 *, **
4-я	11,68±1,31*, **	6,24±1,47*, **	0,94±0,81*, **	0,90±1,00*, **
5-я	9,02±1,31	4,63±1,47	1,42±0,84	1,13±1,01
6-я	12,68±1,79	8,49±2,45	3,00±0,14	1,54±0,18

Примечание: * – различия по сравнению с гидрогелем без ЧЛФД-6, p<0,05; ** – по сравнению с группой, в которой выполнялась ранняя хирургическая некрэктомия, p<0,2.

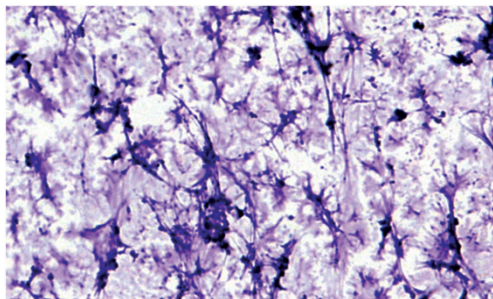


Рис. 1. Структура гидрогеля легкодиспергируемого карбопола 2020. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. $\times 1000$

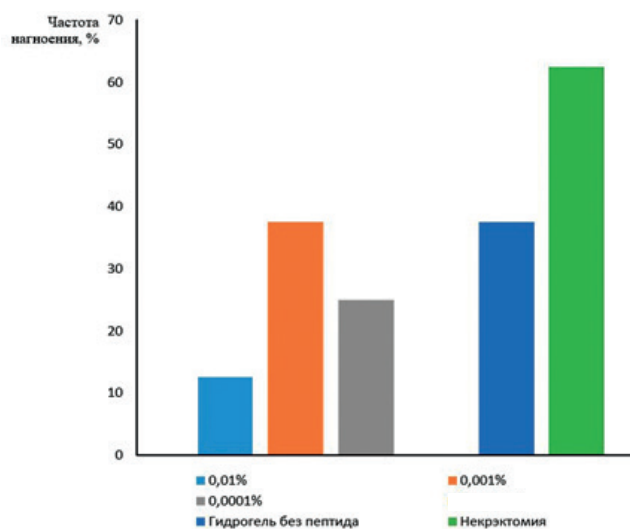


Рис. 2. Частота развития гнойного воспаления в ранах, с учетом способа лечения

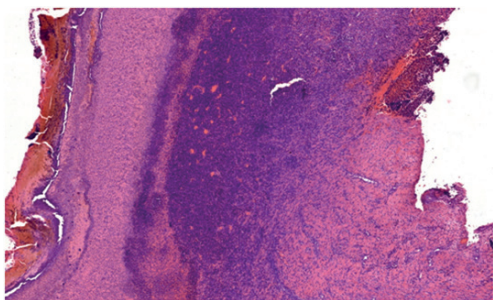


Рис. 3. Массивная инфильтрация нейтрофильными лейкоцитами грануляционной ткани, фибрин на ее поверхности, 1-я группа, 14-е сутки. Окраска гематоксилин-эозином, ув. $\times 50$

площадь раневого дефекта на 28-е сутки наблюдения оказалась больше на 25,56% ($1,13 \text{ см}^2$), чем в группе с содержанием пептида ЧЛФД-6, равным 0,00001%, а частота гнойных осложнений составила 25%. В группе, в которой выполнялась только ранняя хирургическая некрэктомия, на 28-е сутки площадь раны оказалась больше на 71,11% ($1,54 \text{ см}^2$) по сравнению с группой, где содержание пептида ЧЛФД-6 равнялось 0,00001%, а частота гнойных осложнений составила 62,5%. Отсутствие гнойных осложнений

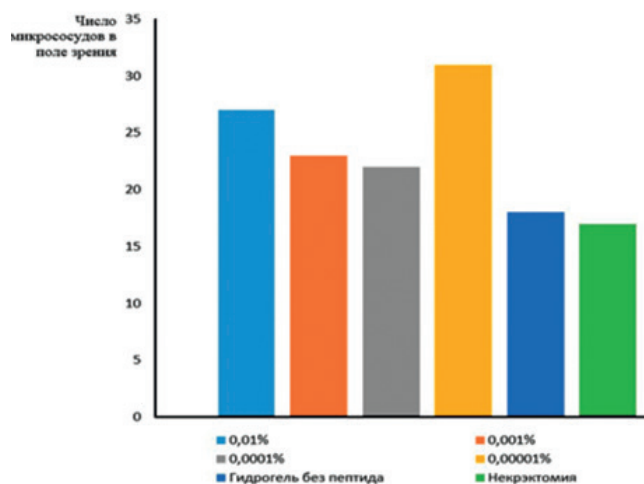


Рис. 4. Среднее число микрососудов в грануляционной ткани

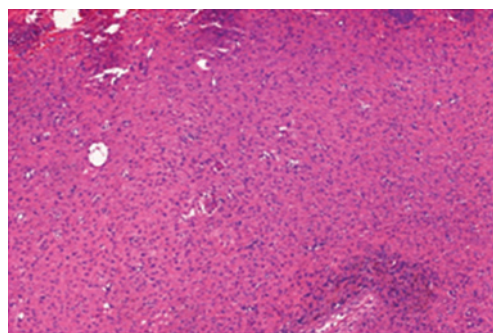


Рис. 5. Грубоволокнистая соединительная ткань с очаговой инфильтрацией лимфоцитами и макрофагами, 4-я группа, 28-е сутки. Окраска гематоксилин-эозином, ув. $\times 100$

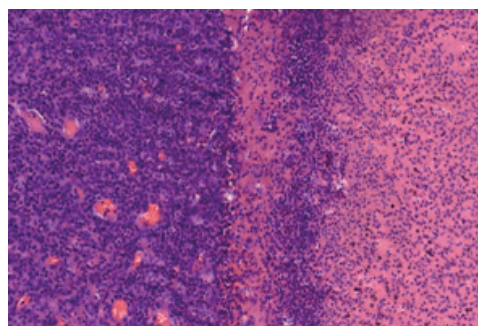


Рис. 6. Грануляционная ткань на дне дефекта, 6-я группа, 28-е сутки. Окраска гематоксилин-эозином, ув. $\times 150$

в группе с минимальным содержанием пептида можно связать с комбинированным действием гидрогеля карбопола как детерминанты заживления ран во влажной среде и оптимальной концентрацией пептида ЧЛФД-6, что обеспечивает его противовоспалительное действие.

Литература

1. Алексеев, А.А. Комплексное лечение глубоких ожогов на основе применения хирургической некрэктомии и совре-

- менных биотехнологических методов / А.А. Алексеев [и др.] // *Анналы хирургии*. – 2012. – № 6. – С. 41–45.
2. Алексеев, А.А. Современные методы лечения ожогов и ожоговой болезни / А.А. Алексеев // *Мир без ожогов*. – 1999. – № 1. – С. 1–7.
3. Алексеев, А.А. Современные технологии местного консервативного лечения пострадавших от ожогов / А.А. Алексеев, А.Э. Бобровников // *Анналы хирургии*. – 2002. – № 2. – С. 32–38.
4. Даниленко, Е.Д. Модуляция пептидом HLDF-6 функциональной активности макрофагов на фоне введения агонистов опиатных рецепторов / Е.Д. Даниленко [и др.] // *Мед. иммунология*. – 2005. – № 1. – С. 77–84.
5. Зиновьев, Е.В. Экспериментальная оценка эффективности применения адипогенных мезенхимальных стволовых клеток для лечения ожогов кожи III степени / Е.В. Зиновьев [и др.] // *Вестн. Росс. воен.-мед. акад.* – 2017. – № 1. – С. 137–141.
6. Костанян, И.А. Биологически активный фрагмент фактора дифференцировки клеток линии HL-60. Идентификация и свойства / И.А. Костанян [и др.] // *Биоорг. хим.* – 2000. – Т. 26, № 7. – С. 505–511.
7. Лагвилава, Т.О. Ранозаживляющие средства на основе карбополов / Т.О. Лагвилава [и др.] // *Известия СПбГИ (тех. ун-та)*. – 2013. – № 18. – С. 47–52.
8. Оксенойт, Г.К. *Здравоохранение в России. 2017* / Г.К. Оксенойт [и др.] // *Здравоохранение в России. 2017: стат. сб.* / Росстат. – М., 2017. – С. 49.
9. Попова, Л.Н. Как изменятся границы вновь образующегося эпидермиса при заживлении ран: дис. ... д-ра мед. наук / Л.Н. Попова. – Воронеж: Воронеж. мед. акад., 1942. – 227 с.
10. Соснина, А.В. Классы и субклассы антител к фактору дифференцировки HLDF и пептидам гапонина, взаимосвязь их уровня с патогистологическими параметрами аденокарцином толстой кишки / А.В. Соснина [и др.] // *Иммунология*. – 2012. – № 2. – С. 92–93.
11. Сысоева, Г.М. Влияние пептида HLDF-6 на пролиферативную активность спленоцитов в культуре клеток на фоне введения агонистов опиатных рецепторов / Г.М. Сысоева [и др.] // *Сиб. мед. журн.* – 2009. – № 4. – С. 55–59.
12. Хабриев, Р.Ю. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ* / Р.Ю. Хабриев. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.

E.V. Zinoviev, V.N. Tsygan, I.V. Artsimovich, M.S. Asadulayev, M.B. Paneyakh, V.V. Zubov, S.A. Lukyanov, D.V. Kostyakov, A.A. Zhilin, I.M. Lopatin, A.A. Umanskaya, K.F. Osmanov, S.N. Kravtsov, Apchel A.V., Yu.A. Zolotarev, A.K. Dadayan, K.A. Dadayan

Experimental evaluation of the effectiveness of local treatment of skin burns with carbopol easier to disperse 2020 hydrogel with human leukemia differentiation factor-6 peptide

Abstract. The results of experimental evaluation of the effectiveness of topical application of the peptide human leukemia differentiation factor-6 in carbopol hydrogel easier to disperse 2020 in thermal burns of skin of III degree are presented. It was found that local application of human leukemia differentiation factor-6 peptide in hydrogel carbopol in concentration from 0,01% to 0,00001% causes acceleration of wound epithelialization processes by 28 days by 71,11% ($p < 0,01$) and reduces the incidence of purulent complications by 62,5% ($p < 0,05$). Histological examination of biopsy specimens of wounds revealed essential features of morphometry, considering the chosen method of treatment and concentration of peptide of human leukemic factor-6 differentiation in carbopol hydrogel. The proposed method of local treatment of burn skin lesions is very promising for optimizing the flow of reparative regeneration processes. The low frequency of purulent complications in the group of animals treated with a minimum peptide content may be due to the combined action of carbopol hydrogel as determinants of wound healing in a wet environment, and the optimal concentration of the peptide human leukemia differentiation factor-6, providing anti-inflammatory effect in a minimum concentration. Analysis of the histological pattern in the studied groups of animals allows us to conclude about the acceleration of the formation of the extracellular matrix, and epithelialization of the wound surface on the background of an application of the peptide human leukemia differentiation factor-6 minimum concentration. On the 14th day of observation the number of microvessels in granulation tissue among animals treated with human leukemia differentiation factor-6 in carbopol hydrogel easier to disperse 2020 with minimum concentration (0,00001%) was 40,6–43,75% more than in the comparison groups. The use of biologically active peptides is one of the promising methods of wound process optimization. human leukemia differentiation factor-6 peptide can selectively stimulate proliferation by enhancing redox processes in cells.

Key words: skin burn, human leukemia differentiation factor-6, reparative regeneration, skin repair, carbopol easier to disperse 2020, hydrogel, wet environment, new technologies.

Контактный телефон: 8-911-845-70-99; e-mail: ilyaartsimovich@gmail.com