# СЕДОВ В. М.<sup>1</sup>, АНДРЕЕВ Д. Ю. <sup>1</sup>, ПАРАМОНОВ Б. А. <sup>2</sup>, АНТОНОВ С. Ф. <sup>3</sup>

## Новые отечественные раневые покрытия «Хитоскин-колл» в лечении трофических язв нижних конечностей

- <sup>1</sup> Кафедра факультетской хирургии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова;
- <sup>2</sup> Кафедра пластической и эстетической хирургии Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования;
- <sup>3</sup> ФГУП Государственный Научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов ФМБА России. e-mail: vmsedov@spmu.rssi.ru

Реферат

Новые отечественные гидроколлоидные раневые покрытия «Хитоскин-колл» состоят из пористой лавсановой пленки с нанесенным на нее слоем гидроколлоида на основе хитозана, в который введены ростовые факторы (эпидермальный и эндотелиальный), а также наночастицы серебра и церий. Целью исследования было определение сравнительной эффективности применения различных видов покрытий «Хитоскин-колл» для лечения трофических язв нижних конечностей, а также изучение эксплуатационных свойств и антимикробной активности данных препаратов. Антимикробную активность раневых покрытий и их компонентов изучили на тест-культурах, в качестве которых использовали суточные культуры золотистого стафилококка, кишечной палочки, синегнойной палочки, дрожжевых грибков и гемолитического стрептококка. Изучение ранозаживляющих свойств препаратов «Хитоскин-колл» проводилось в группе из 64 пациентов с трофическими язвами нижних конечностей на 2-й (грануляционная) и 3-й (эпителизация) стадиях раневого процесса. В микробиологическом тестировании установлено, что даже без наполнителей хитозановый гидроколлоид ингибировал рост некоторых микроорганизмов. Гидроколлоиды, содержащие наночастицы серебра, проявляли бактерицидное действие в отношении всех используемых тест-культур. Введение ионов церия приводит к усилению антимикробной активности как самого хитозана, так и композиции наночастиц серебра в хитозановой матрице. Скорость краевой эпителизации при применении покрытий «Хитоскин-колл» возрастала в 1,5–7 раз по сравнению с контролями. Сравнительный анализ эффективности исследуемых покрытий в зависимости от стадии раневого процесса показал превосходство покрытий «Хитоскин-колл» с эндотелиальным фактором роста на грануляционной стадии, в то время как на стадии эпителизации наиболее эффективными оказались покрытия «Хитоскин-колл» с эпидермальным фактором роста. Раневые покрытия «Хитоскин-колл» с серебром и церием лучше всего зарекомендовали себя на язвах с высокой микробной загрязненностью («+++» и «++++» при полуколичественном методе оценки цитограмм).

**Ключевые слова:** хитоскин-колл, раневые покрытия, трофические язвы, ростовые факторы, наночастицы серебра, церий

#### Sedov V. M.<sup>1</sup>, Andreev D. Y.<sup>1</sup>, Paramonov B. A.<sup>2</sup>, Antonov S. F.<sup>3</sup>

### New domestic wound dressings "Chitoskin-coll" in the treatment of the leg ulcers

- <sup>1</sup> Faculty surgery department of Saint-Petersburg Pavlov's state medical university
- <sup>2</sup> Saint-Petersburg Medical Academy of Postgraduate Education, Plastic and Aesthetic Surgery Department
- <sup>3</sup> Institute of Highly Pure Biopreparations e-mail: vmsedov@spmu.rssi.ru

#### **Abstract**

New domestic wound dressings "Chitoskin-coll" consist of porous lavsan film covered with chitosan hydrocolloid layer containing growth factors (EGF and VEGF), nanoparticles of silver and cerium. The research aims were to compare the effectiveness of different types of wound dressings "Chitoskin-coll" using for the leg ulcers treatment and to estimate performance and antimicrobial activity of the dressings.

Antimicrobial activity of the wound dressings and their components was studied using microbial test-cultures. They were 24 hours cultures of Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans, and Streptococcus viridans. Study of wound healing properties of the wound dressings "Chitoskin-coll" was carried out in the group of 64 patients with leg ulcers on second (granulation) and third (epithelialization) stages of ulcers healing.

The microbiological study showed that chitisan hydrocolloid itself, even without any additional preparations, inhibited growth of some microbes. Hydrocolloids with nanoparticles of silver displayed bactericidal action against all tested cultures. Introduction of cerium ions led to enhancing antimicrobial activity both chitosan itself and nanoparticles of silver in chitosan matrix. Using wound dressings "Chitoskin-coll" was increasing epithelialization rate in 1.5–7 times

comparing to controls. As regards stages of ulcers healing, in second (granulation) stage the most effective wound dressings turned out to be "Chitoskin-coll" with EGF, whereas in third (epithelialization) stage "Chitoskin-coll" with VEGF were the best. Wound dressings "Chitoskin-coll" with silver and cerium showed their superiority in case of ulcers with high microbial contamination («+++» and «++++» in semi-quantitative method of cytogram analysis)

Keywords: chitoskin-coll, wound dressings, leg ulcers, growth factors, nanoparticles of silver, cerium.

#### Введение

Применение раневых покрытий (РП) позволяет существенно повысить эффективность лечения трофических язв, ран и ожогов. В настоящее время в клинической практике используется более 300 видов РП, которые можно разделить на следующие 10 классов [1, 2]:

- 1. пленочные раневые покрытия;
- 2. гидроколлойдные покрытия;
- 3. гидрофибры;
- 4. альгинаты;
- 5. коллагеновые раневые покрытия;
- 6. гидроцеллюлярные покрытия;
- 7. гидрогелевые покрытия;
- 8. атравматичные раневые покрытия;
- 9. сорбирующие покрытия;
- 10. комбинированные раневые покрытия.

Несмотря на это, разработка «идеального» РП еще далека от своего завершения. Такой препарат должен создавать оптимальную микросреду для заживления ран. Это достигается за счет следующих свойств: наличие абсорбционной активности в отношении раневого экссудата; сочетание «барьерной» функции (предотвращение проникновения микроорганизмов) и одновременной проницаемости для газов (О2, СО2) и паров воды на уровне, не нарушающем водный баланс раневого ложа; оптимальные функциональные свойства (эластичность, прозрачность, удобство применения); отсутствие отрицательных эффектов (пирогенного, антигенного, токсического и местного раздражающего действия); возможность выделять в рану биологически активные вещества (антимикробные, ускоряющие репаративные процессы).

До недавнего времени практически все гидроколлоидные раневые покрытия были представлены зарубежными препаратами. Ситуация в корне изменилась с появлением серии отечественных гидроколлоидных РП «Хитоскин-колл». Они состоят из пористой лавсановой пленки с нанесенным на нее слоем гидроколлоида на основе хитозана, в который введены различные препараты. Диаметр пор в пленке таков, что она непроницаема для бактерий и в то же время обеспечивает паро- и газообмен на раневой поверхности. В зависимости от препаратов, входящих в состав покрытий, они подразделяются на следующие виды:

- хитоскин-колл с эпидермальным фактором роста;
- хитоскин-колл с эндотелиальным фактором роста;
  - хитоскин-колл с серебром и церием.

В первых 2-х вариантах РП в полимерную матрицу были включены рекомбинантные факторы роста EGF и VEGF в нанограммовых количествах. Для придания антимикробных свойств третьему варианту РП «Хитоскин-колл», в хитозановом геле

был осуществлен синтез ноночастиц серебра в присутствии ионов церия. Образующиеся наночастицы стабилизируются молекулами хитозана.

#### Цель исследования

Определение сравнительной эффективности применения РП «Хитоскин-колл» для лечения трофических язв нижних конечностей, а также изучение эксплуатационных свойств и антимикробной активности данных препаратов.

#### Материал и методы исследования

Антимикробную активность РП и их компонентов изучили на тест-культурах, в качестве которых использовали суточные культуры золотистого стафилококка, синегнойной палочки, кишечной палочки и дрожжевых грибков. Она оценивалась по величине зоны лизиса после нанесения капель тестируемых растворов и гелей или помещения образцов гидроколлоидных повязок в виде дисков на поверхность агара с газоном культуры микроорганизмов. Для получения газонов культуру смывали с газона на чашке Петри двумя миллилитрами физиологического раствора, доводили объем культуры до 5 мл. Эту суспензию в объеме 0,3 мл наносили на чашки с агаром Хоттингера (при получении культуры Streptococcus viridans использовался агар Хоттингера с кровью — 5 % по объему). Суспензию равномерно распределяли шпателем по поверхности агара, газон подсушивали, затем капельным методом наносили образцы растворов и гелей в объеме 20 мкл. В качестве контроля использовали стерильную дистиллированную воду, нанесенную в том же объеме на тот же газон культуры. Подготовленные образцы гидроколлоидных покрытий (диски, d=1,0 см) помещали на поверхность газона, обеспечивая плотный контакт образца с агаром легким нажатием. Чашки помещали в термостат при температуре +37 °C. Степень антибактериальной активности тестируемых растворов, гелей и покрытий оценивали по зонам отсутствия роста культуры микроорганизма через 24 часа. Все эксперименты проводили трижды.

Изучение ранозаживляющих свойств препаратов «Хитоскин-колл» проводилось в сравнении с пленочной основой этих покрытий без гидроколлоидного слоя, с нанесенным на пленочную основу хитозановым гидроколлоидом без наполнителей и с современным зарубежным гидроколлоидным РП фирмы Lohmann Rauscher, Австрия — Германия «Suprasorb Н». Исследование выполнялось в группе из 64 пациентов с трофическими язвами нижних конечностей на 2-й (грануляционная) и 3-й (эпителизация) стадиях раневого процесса. Этиология трофических язв: посттромботическая болезнь — 33, варикозная болезнь — 13, гангренозная пиодермия — 2, диабе-

#### ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

тические трофические язвы — 6, язвы смешанного генеза (посттромботическая болезнь + облитерирующий атеросклероз — 6, посттромботическая болезнь + ревматоидный васкулит — 1, посттромботическая болезнь + гангренозная пиодермия — 3) — 10 пациентов. При каждой перевязке производилось фотографирование трофических язв на цифровую камеру, измерялись их размеры, с раневой поверхности брались мазки-отпечатки. При оценке цитограмм использовали полуколичественный метод. Бактериальную загрязненность ран оценивали следующим образом: «-» — флора не обнаружена; «+» — единичные микробы в различных местах препарата; «++» — немногочисленные, разрозненные микробы в большинстве поля зрения; «+++» — небольшие скопления микробов, по нескольку скоплений в каждом поле зрения; «++++» — обильная флора, выявляемая большими скоплениями клеток или же равномерно покрывающая весь препарат. Главным критерием эффективности исследуемого раневого покрытия служило уменьшение максимального размера трофической язвы. Изучаемые покрытия поочередно использовались у каждого из пациентов на каждой из стадий заживления. Это давало возможность объективно оценить результаты исследования: каждый больной сам для себя служил контролем.

#### Результаты исследования и их обсуждения

Результаты экспериментов по изучению антибактериальной активности РП и их компонентов представлены в таблице 1.

Покрытия «Хитоскин-колл» легко отделяются от подложки и хорошо фиксируются к краям раны. Их удаление обычно происходит безболезненно, без травматизации наросшего с краев раны эпителия. В отдельных случаях для атравматического удаления покрытий следует использовать бензин или жидкий силикон, например, спрей Niltac. Прозрачность пленочной основы этих покрытий позволяет легко контролировать течение раневого процесса под ними. Критерием для смены покрытия на ране является скопление под ним раневого секрета с его выходом за контуры язвы или из-под покрытия (если в этой ситуации оставить покрытие на ране, это повлечет за собой остановку краевой эпителизации, увеличение размеров язвы и развитие дерматита на коже, к ней прилегающей).

Результаты изучения ранозаживляющей активности препаратов приведены в таблице 2.

Клинический пример. Больная М., 63 года. Поступила в клинику с жалобами на сильные боли в трофических язвах нижних конечностей (рис. 1а). Язвы появились более 10 лет назад. Прогрессируют, несмотря на лечение в различных клиниках Санкт-

Антимикробная активность раневых покрытий «Хитоскин-колл» и их компонентов

Таблица 1						
Образцы	Тест-культуры, диаметр зоны лизиса, см <sup>2</sup>					
	Staph.aureus	E.coli	Ps.aeruginosa	Candida albicans	Strep.viridans	
Хитозановый гидроколлоид (несвязанный)	0,79±0,16	1,11±0,09	0,94±0,07	_	_	
РП «Хитоскин-колл» с эпидермальным фактором роста	_	0,65±0,1	0,76±0,09	_	_	
РП «Хитоскин-колл» с эндотелиальным фактором роста	_	0,54±0,05	0,70±0,05	_	_	
Хитозановый гидроколлоид (несвязанный) с наночастицами серебра	0,96±0,17	1,28±0,15	1,19±0,14	1,37±0,1	0,14±0,05	
РП «Хитоскин-колл» с наночастицами серебра (без церия)	2,15±0,05	1,91±0,12	2,26±0,14	1,80±0,05	0,19±0,08	
Се (NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> 0,04 N Разведение 1:4	_	_	_	_	_	
Се (NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> 0,04 N Разведение 1:50	_	_	_	_	_	
Хитозановый гидроколлоид (несвязанный) с CeNO <sub>3</sub>	1,89±0,17	2,25±0,16	1,25±0,16	_	_	
РП «Хитоскин-колл» с серебром и церием	3,14±0,02	3,38±0,24	3,22±0,08	3,29±0,30	2,68±0,51	

#### СЕДОВ В. М., АНДРЕЕВ Д. Ю., ПАРАМОНОВ Б. А., АНТОНОВ С. Ф.

Ранозаживляющая активность раневых покрытий в зависимости от стадии раневого процесса и микробной загрязненности ран

iipoqeeea ii minipoonoii sai pasiieniioetii paii						
Таблица 2						
Раневое покрытие	Раны с высокой микробной обсемененностью*	Грануляционная стадия	Стадия эпителизации			
Suprasorb H	0,21±0,17	0,27±0,06	0,23±0,1			
Пористая лавсановая пленка без гидроколлоидного слоя	0,15±0,13	0,31±0,1	0,4±0,07			
Пористая лавсановая пленка с гидроколлоидным слоем без наполнителей	0,24±0,1	0,42±0,04	0,37±0,11			
«Хитоскин-колл» с эпидермальным фактором роста	0,22±0,14	0,89±0,12	1,63±0,07			
«Хитоскин-колл» с эндотелиальным фактором роста	0,19±0,11	1,52±0,03	0,94±0,09			
«Хитоскин-колл» с серебром и церием	0,45±0,04	0,67±0,05	0,56±0,08			

<sup>\*</sup> Раны на II-й (грануляционной) стадии, «++++» и «+++++» при полуколичественном методе оценки цитограмм.

Петербурга и Москвы. Диагноз: «Посттромботическая болезнь обеих нижних конечностей. Трофические язвы обеих голеней и правой стопы. XBH III ст.». Вследствие высокой микробной обсемененности язв было решено начать лечение с применения покрытий «Хитоскин-колл с серебром и церием» на фоне круглосуточной компрессионной терапии (рис. 1б). Частота смены раневых покрытий на этом этапе лечения составила 1 раз в 2 суток. Через 10 дней микробная обсемененность язв значительно снизилась; язвы заметно уменьшились в размерах (рис. 1в). На фотографии видно, что несмотря на уменьшение размеров язв, их дно, из-за недостаточного роста грануляционной ткани, остается ниже уровня кожи, «западает». На этом этапе с целью стимуляции роста грануляций были применены РП «Хитоскин-колл с эндотелиальным фактором роста». Смена покрытий производилась раз в 3-4 суток. Через 11 суток применения этих РП дно язв практически сравнялось с уровнем кожи (рис. 1г). Начиная с этого времени, лечение проводилось с помощью РП «Хитоскинколл с эпидермальным фактором роста». Покрытия на язвах менялись с частотой 1 раз в 5-7 дней. Критерием смены, как и раньше, служило избыточное скопление раневого секрета под РП с его выходом за контуры язвы или из-под покрытия. На фоне применения этих препаратов наблюдалась интенсивная краевая эпителизация трофических язв (рис. 1д). Полная эпителизация трофических язв наблюдалась 31.07.2010г., через 51 день от начала лечения РП «Хитоскин-колл» (рис.1e).

#### Обсуждение результатов

В настоящее время наиболее широко используемыми для лечения хронических ран являются гидроколлоидные повязки. Они поддерживают на ране условия, оптимальные для заживления. Основной частью гидроколлоидного перевязочного материала является сам гидроколлоид, сформированный на

основе гидрофильных природных и синтетических биосовместимых полимеров. Он должен обеспечивать значительное поглощение влаги, сохраняя при этом свою структуру. Оптимальным является состав, состоящий из смеси сшитых и несшитых полимеров. В большинстве коммерческих гидроколлоидных повязок — это смесь пектина, желатина и карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), а также сшитых гранул этих веществ. В гидроколлоидных повязках для связывания гидроколлоида в единое целое его заключают в матрицу из эластомера на основе каучуков или полиуретана. Однако технология замеса гидроколлоида в эластомер требует высоких температур (выше +200°С) и высоких давлений, которые рекомбинантные белки не смогут выдержать.

В РП «Хитоскин-колл» проблема связанности гидроколлоида решена на уровне микроструктуры. В качестве связующего компонента в раствор хитозана ввели гидрофильный тонкодисперсный гидроколлоид сукральфат. В процессе дегидратации он теряет аггрегативную устойчивость, обращается в гидрофобный и, взаимодействуя с хитозаном, формирует связанную нерастворимую матрицу. Таким образом, гидроколлоид РП «Хитоскин-колл» представляет собой оптимальное депо для включения различных биологически активных веществ, особенно таких лабильных, как ферменты и цитокины. За счет наличия в хитозане функциональных групп полипептидные факторы роста сорбируются на полимерной матрице. Покрытия удерживают факторы роста и пролонгируют их выход в рану, что позволяет избежать возможных отрицательных эффектов, связанных с резким ростом их концентраций в биологических тканях. Скорость краевой эпителизации при применении РП с факторами роста возрастала в 2-7 раз по сравнению с контролями. РП, содержащие серебро и церий, также проявляли стимулирующее действие, ускоряя краевую эпителизацию в 1,5–3 раза по сравнению с

#### ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ



**Рис. 1.** Фотографии правой нижней конечности больной М.: а — на момент поступления в клинику 10.06.2010. Видны трофические язвы голени и стопы; б — трофические язвы закрыты РП «Хитоскин-колл» с серебром и церием; в — через 10 суток лечения РП «Хитоскин-колл» с серебром и церием; г — через 11 суток применения раневых покрытий «Хитоскин-колл с эндотелиальным фактором роста»; д — через 10 суток применения раневых покрытий «Хитоскин-колл» с эпидермальным фактором роста; е — полная эпителизация трофических язв 31.07.2010г., через 51 день от начала лечения РП «Хитоскин-гель»

контролем. Такой результат нельзя объяснить только антимикробной активностью РП. Можно предположить, что в присутствии РП, выделяющего ионы церия, происходит снижение уровня гиперпродукции провоспалительных цитокинов, что нормализует течение процессов регенерации тканей [3].

Как и все гидроколлоидные покрытия, препараты «Хитоскин-колл» предназначены для использования во вторую и третью стадии раневого процесса на неинфицированных ранах. Однако наличие в составе покрытий различных по своей активности препаратов позволяет более дифференцированно подходить к лечению различных видов ран. Сравнительный анализ эффективности исследуемых РП в зависимости от стадии раневого процесса показал превосходство РП с эндотелиальным фактором роста над остальными вариантами РП на грануляционной стадии, в то время как на стадии эпителизации наиболее эффективными оказались РП с эпидермальным фактором роста. РП с серебром и церием лучше всего зарекомендовали себя на язвах с высокой микробной загрязненностью («+++» и «++++» при полуколичественном методе оценки цитограмм). Включение препаратов серебра в раневые покрытия – распространенный способ придания им антимикробных свойств. Хитозановые растворы являются удобной системой для получения стабилизированных наночастиц серебра. Последние проявляют повышенное бактерицидное действие за счет высокоэнергетического состояния атомарного серебра в наночастицах и их повышенной реакционной способности. Применение серебра в форме наночастиц позволяет минимизировать содержание серебра в повязке. С целью усиления антимикробного действия в состав РП «Хитоскин-колл» дополнительно ввели нитрат церия. Возможность

использования церия для усиления антимикробных свойств препаратов серебра известна достаточно давно. Так, описан синергетический эффект усиления бактерицидных свойств сульфадиазина серебра в присутствии азотнокислого церия [4]. В микробиологическом тестировании установлено, что даже без наполнителей хитозановый гидроколлоид ингибировал рост некоторых микроорганизмов. Гидроколлоиды, содержащие наночастицы серебра, проявляли бактерицидное действие в отношении всех используемых тест-культур. Растворы нитрата церия не оказывают заметной бактерицидной активности в отношении тест-культур. Однако введение ионов церия приводит к усилению антимикробной активности как самого хитозана, так и композиции наночастиц серебра в хитозановой матрице. В целом можно сделать вывод, что введение в состав гидроколлоидных повязок наночастиц серебра и нитрата церия позволяет обеспечить эффективную антимикробную защиту против широкого спектра микроорганизмов. В отличие от зарубежных аналогов, пленочная основа покрытий «Хитоскин-колл», оставаясь непроницаемой для бактерий, имеет значительно большую паро- и газопроницаемость. Эта особенность, в сочетании с уникальным составом гидроколлоидного слоя, позволяет выполнять смену препаратов на ране значительно реже, чем обычно. Иногда для полного заживления раны бывает достаточно единственной аппликации препарата.

Таким образом, все три отечественных препарата серии «Хитоскин-колл» представляют собой единый комплекс гидроколлоидных раневых покрытий, позволяющий эффективно стимулировать заживление ран с самого начала второй фазы и до полной эпителизации.

#### Литература

- 1. Андреев, Д. Ю. Современные раневые покрытия. Ч. I/Д. Ю. Андреев, Б. А. Парамонов, А. М. Мухтарова // Вестник хирургии им. И. И. Грекова. 2009. —Т. 168.  $N \ge 3$ . C. 98–102.
- 3. Deveci, M. Effects of cerium nitrate bathing and prompt burn wound excision on IL-6 TNF alpha levels in burned rats / M. Deveci [et al] // Burns. 2000. Vol. 26.  $N_2$  1. P. 41–45.
- 4. Rosenkranz, H. S. A synergistic effect between cerium nitrate and silver sulfadiazine / H. S. Rosenkranz // Burns. 1979. Vol. 5. N = 3. P. 278-281.