

УДК 615.012.1

**РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИЙ ГИДРОГЕЛЬ НА ОСНОВЕ
ПОЛИГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИН ГИДРОХЛОРИДА И ФОРМАЛЬДЕГИДА**

**WOUND-HEALING HYDROGEL BASED ON THE POLYHEXAMETHYLENE
GUANIDINE HYDROCHLORIDE AND FORMALDEHYDE**

**О.С. Очиров¹, Я.Г. Разуваева^{2,3}, Н.С. Бадмаев², С.А. Стельмах^{1,3},
Д.М. Могнонов^{1,3}**
**O.S. Ochirov¹, Ya.G. Razuvaeva², N.S. Badmaev², S.A. Stelmakh¹,
D.M. Mogonov¹**

¹⁾ Байкальский институт природопользования Сибирского отделения Российской академии наук
Россия, 670047 г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

²⁾ Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук
Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

³⁾ Бурятский государственный университет, Россия, 670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24 а

¹⁾ Baikal Institute for Nature management, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
670047 Ulan-Ude, Sakhyanovoy St., 6

²⁾ Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
670047 Ulan-Ude, Sakhyanovoy St., 6

³⁾ Buryat State University, Russia, 670000, Ulan-Ude, Smolin St., 24 a

E-mail: olegoch@rambler.ru

Аннотация. В настоящей работе исследовано действие ранозаживляющего действие гидрогеля на основе полигексаметиленгуанидин гидрохлорида и формальдегида. Эксперименты выполнены на 24 половозрелых крысах Wistar. Установлено, что гидрогель на модели линейной кожной раны способствует ускоренному созреванию грануляционной ткани и более раннему формированию рубца. Результаты исследования дают основание рассматривать испытуемый гидрогель для дальнейшего изучения в качестве потенциально перспективного ранозаживляющего средства.

Resume. Search and development of effective remedies and methods for the treatment of skin wounds as well as the creation of optimal conditions for fully realized regenerative process are of great importance in the modern medicine. The research was aimed at the evaluation of wound healing effect of hydrogel derived on the base of polyhexamethylene guanidine hydrochloride and formaldehyde. Experiments were carried out on 24 white Wistar rats. A linear skin wound was simulated in animals on the background of thiopental narcosis. The wound was treated by the tested remedy – hydrogel in the dose of 100 mg for 8 days. The wound healing effect of hydrogel was evaluated according to the findings of surface tension measurement and pathomorphological studies. The experiments have shown that hydrogel promotes earlier epithelization of the wound and maturation of granulation tissue. In animals of the experimental group the scar tissue was stronger than in animals of the control group. The tested substance demonstrated more pronounced wound healing effect as compared with the preparation of comparison – levomekol. The results of the studies allow us to consider the tested hydrogel as a potentially prospective wound healing remedy.

Ключевые слова: полигексаметиленгуанидин гидрохлорид, гидрогель, линейная рана, ранозаживляющее действие, ранотензиометрия.

Keywords: polyhexamethieneguanidine hydrochloride, hydrogel, wound healing, renitentiary, pathomorphology.

Введение

На сегодняшний день одной из актуальных задач в медицине является поиск и разработка эффективных средств и методов лечения кожных ран, создание оптимальных условий для полноценного регенераторного процесса. В эту группу дерматотропных препаратов входят средства для местного применения в различных лекарственных формах: защищающие кожу от микробных и

паразитарных поражений (антисептики, антибиотики, противовирусные препараты и т.д); стимулирующие процессы очищения ран, регенерацию и эпителизацию кожи; размягчающие и рассасывающие рубцовую ткань; средства лечения ожогов, обморожений, пролежней, трофических язв (ферментные препараты, регуляторы метаболических процессов, противовоспалительные средства); уменьшающие кожный зуд при аллергии, экземах, нейродермите (антигистаминные, местноанестезирующие, обволакивающие, вяжущие средства, местнораздражающие) и др. Перспективными являются препараты полученные синтетическим путем с минимальным проявлением побочных эффектов. Одно из таких направлений в создании лекарственных средств, обладающих ранозаживляющим действием, является применение гидрогелей. Они менее токсичны, легко проникают в ткани, обладают пролонгированным эффектом.

Яркими представителями такого рода соединений являются полимеры, физические и химические свойства которых позволяют создать материалы на их основе, отвечающие поставленным требованиям. На настоящий момент широко используются в качестве носителей лекарственных соединений гидрогели на основе поливинилового спирта, полиакриловой кислоты. Недостатком этих полимеров является отсутствие биоцидных свойств, что ограничивает их применение для протекции проникновения патогенных микроорганизмов. В отличие от выше перечисленных полимеров, гуанидинсодержащие широко используются в качестве активного агента многих дезинфекционных средств [Воинцева, Гембицкий, 2009], а в совокупности со способностью к геле- и комплексобразованию представляют собой перспективные материалы для создания высокоэффективного ранозаживляющего средства наружного применения.

Цель

Цель исследования: оценка ранозаживляющего действия гидрогеля гидрогель на основе полигексаметиленгуанидин гидрохлорида и формальдегида .

Объекты и методы исследования

Синтез. Гуанидин гидрохлорид (ГГХ) использовался без предварительной очистки (фирмы "Across Organics", 99%, $T_{пл}=185-189^{\circ}C$). Гексаметилендиамин (ГМДА) был очищен методом перегонки при температуре $205^{\circ}C$, сбор фракции осуществлялся в интервале $202-205^{\circ}C$.

Полигексаметиленгуанидин гидрохлорид (ПГМГх) синтезирован путем поликонденсации ГГХ и ГМДА (рис. 1) в расплаве при $T=165^{\circ}C$ в течение 3 ч. Навеску ГМДА ($m=12.7$ г.) и ГГХ ($m=7.5$ г.) загружали в конденсационную пробирку и нагревали на масляной бане. Температура контролировалась с точностью до $\pm 1^{\circ}C$, выход полимера составил 96%.

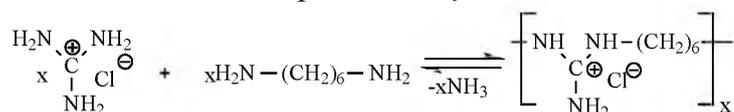


Рис. 1. Схема синтеза ПГМГх
Fig. 1. The scheme of synthesis of PHMGh

Гидрогели были получены путем добавления к раствору полимера с концентрацией 30 г/дл 10%-го альдегида (формальдегид ГОСТ-1625-89) от эквимолярного до пятикратного избытка относительно количества концевых аминогрупп ПГМГх (рис. 2) [Очиров О.С. и др., 2015]. Реакция проходила при комнатной температуре в течение одного часа. Очистка гидрогеля от золь-фракции проводилась путем многократного промывания дистиллированной водой на воронке Бюхнера. Равновесную степень набухания (Q_p) определяли гравиметрическим методом [Григорьева и др., 2011].

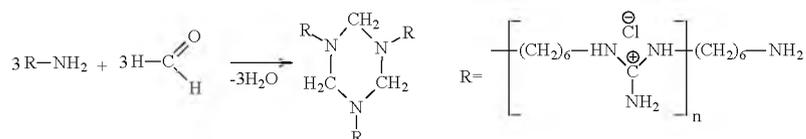


Рис. 2. Схема синтеза гидрогеля на основе ПГМГх и формальдегида
Fig. 2. Scheme of the synthesis of hydrogel based on the PHMGh and formaldehyde

Экспериментальные исследования выполнены на 24 белых крысах линии Wistar 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 учетом пола, возраста, массы и принципа рандомизации. Экспериментальную работу осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с ис-



пользованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР №755 от 12.08.77 г.), «Правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Протокол исследования согласован с этическим комитетом Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (протокол №6 от 05.06.2015). Эвтаназию животных осуществляли методом мгновенной декапитации под легким эфирным наркозом.

Раневое повреждение кожи у белых крыс вызывали нанесением в области спины линейного разреза (до собственной фасции) размером 5 см. Затем на равном расстоянии от краев раневого дефекта был наложен один шов, в результате чего эпителий боковых краев раны не соприкасался и заживление происходило вторичным натяжением. Все хирургические процедуры (операционные вмешательства) на животных проводили под общим наркозом (тиопентал-натрия, 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 и формальдегида (соотношение 1.0:2.5) (далее гидрогель), крысам второй опытной группы – Левомеколь (НИЖФАРМ) по аналогичной схеме. Контрольной группой служили животные с «естественным заживлением» ран. На 8 сутки животных выводили из эксперимента, в каждой группе было по 8 животных. О ранозаживляющем действии гидрогеля судили по данным тензиометрических и патоморфологических исследований. Тензиометрию раневого рубца проводили на приборе ВЕ-5307 [Абаев, 2006]. Для патоморфологических исследований вырезали участки раневой поверхности кожи с прилегающими неповрежденными тканями, включая подкожную клетчатку, и фиксировали в 10 % водном растворе формалина. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином [Саркисов, Перов, 1996]. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

Гидрогель был исследован методами ИК-спектроскопии и ТГ/ДСК анализа. Так при сравнении спектров ПГМГх и гидрогеля в области поглощения аминогрупп при 3250 см⁻¹ у гидрогеля наблюдается уменьшение интенсивности полос, что объясняется расходом концевых аминогрупп полимера, взаимодействующих с формальдегидом. За счет образования метиленового мостика, связывающего концевые аминогруппы, атомы азота, проявляющие отрицательный индуктивный эффект, усиливают полярность -CH₂- группы, блокируя ножничные деформационные колебания (1460 см⁻¹), при этом провоцируя усиление веерных и крутильных в диапазоне от 1350 см⁻¹ до 1270 см⁻¹.

ТГ/ДСК анализ гидрогеля показал, что потеря массы начинается при температуре 120°C и сопровождается характерным экзотермическим эффектом при 225–229°C. Вероятно, в этом температурном интервале происходит отщепление метиленовой группы, заключенной между двумя атомами азота. Остальные эффекты связаны с разложением ПГМГх [Базарон, Стельмах 2008].

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

Таблица 1
Table. 1

Прочность рубцовой ткани линейной раны у белых крыс при применении гидрогеля на основе полигексаметиленгуанидин гидрохлорида и формальдегида The strength of the linear scar tissue injury of white rats in the application of the hydrogel based on polyhexamethylene guanidine hydrochloride and formaldehyde

Группы животных	Прочность рубцовой ткани, кг
Контрольная, n=8	0.25±0.02
Опытная 1 (гидрогель), n=8	0.41±0.03*
Опытная 2 (левомеколь), n=8	0.37±0.02*

Примечание: * – различия статистически значимы при P≤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 сохранялась раневая щель, а также выраженная воспалительная инфильтрация, преимущественно полиморфно-ядерными лейкоцитами, макрофагами и отек 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 ране-



вого дефекта, была незрелой, в ней четко не прослеживались горизонтальные слои фибробластов, коллагеновые волокна не были сформированы, что свидетельствует о вялотекущем процессе регенерации. В краях раны сохранялась полиморфно-клеточная инфильтрация и геморрагическое пропитывание. На границе грануляционной и аморфной некротической ткани у краев раневого дефекта наблюдался рост недифференцированной эпителиальной ткани (рис. 4).

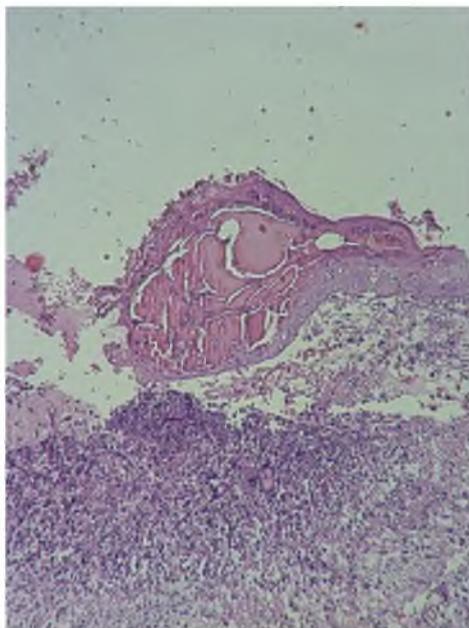


Рис. 3. Линейная рана кожи белых крыс контрольной группы. Окраска гематоксилином и эозином ($\times 100$)
Fig. 3. Linear skin wound of rats Wistar in the control group. H & E stain ($\times 100$)

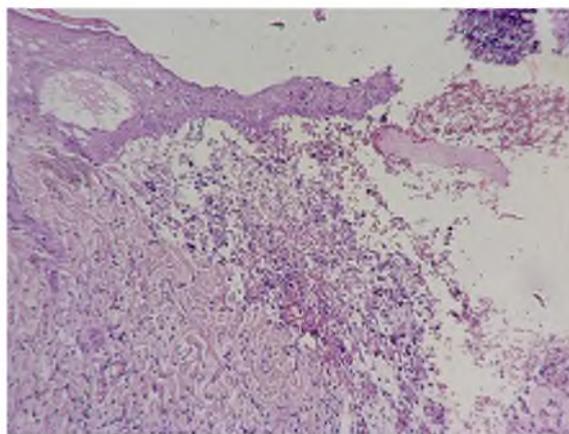


Рис. 4. Линейная рана кожи белых крыс контрольной группы. Окраска гематоксилином и эозином ($\times 100$)
Fig. 4. Linear skin wound of rats Wistar in the control group. H & E stain ($\times 100$)

На фоне использования гидрогеля у всех животных опытной группы 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 первой опытной группы 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, что связано с особенностями полигуанидинов [Воинцева, Гембицкий, 2009].

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). Грануляционная ткань была менее зрелой, чем в первой опытной группе, так в большем коли-

честве преобладали клеточные элементы, чем волокнистая структура. В окружающей рану дерме, клетчатке и подлежащей мышечной ткани сохранялся отек и воспалительная инфильтрация.

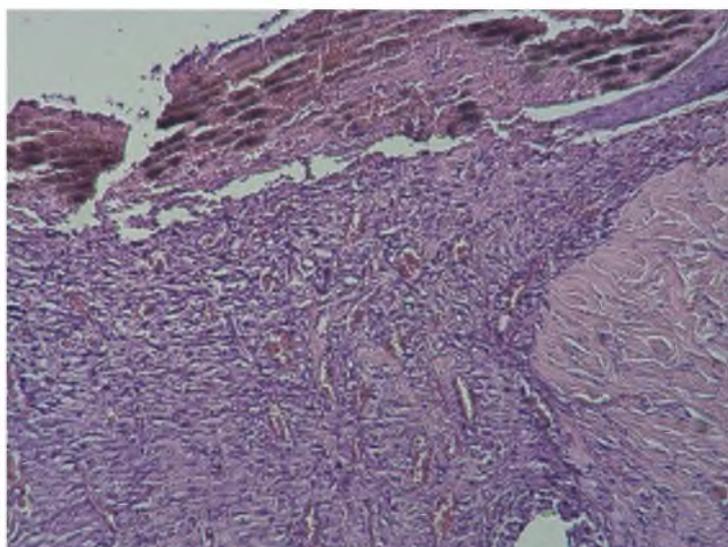


Рис. 5. Линейная рана кожи белой крысы, на которую наносили гидрогель на основе полигексаметиленгуанидин гидрохлорида и формальдегида. Окраска гематоксилином и эозином ($\times 200$).

Fig. 5. Linear skin wound of rats Wistar to which was applied the hydrogel based on polyhexamethylene guanidine hydrochloride and formaldehyde. H & E stain ($\times 200$)

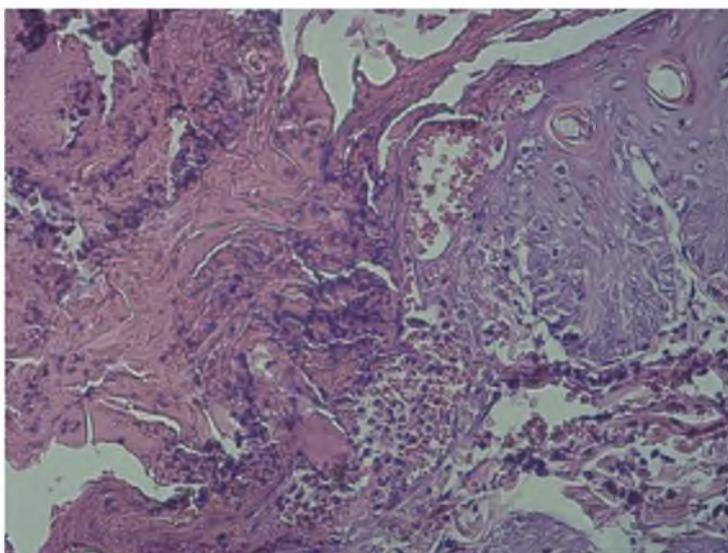


Рис. 6. Линейная рана кожи белой крысы, на которую наносили левомеколь.

Окраска гематоксилином и эозином ($\times 200$)

Fig. 6. Linear skin wound of rats Wistar to which was applied the levomekol. H & E stain ($\times 200$)

Заключение

На модели линейной кожной раны выявлено выраженное ранозаживляющее действие гидрогеля на основе ПГМГх и формальдегида, о чем свидетельствуют результаты ранотензометрии и данные патоморфологических исследований, которые показали более высокую степень созревания грануляционной ткани и прочность рубца. Гидрогель на основе ПГМГх исследованный в данной работе не содержал в себе активные антибиотические и антисептические соединения, поэтому предполагаемый препарат на основе ПГМГх можно рассматривать как самостоятельное средство. При этом, наличие комплексообразующих свойств у исходного полимера позволит усовершенствовать состав препарата путем создания комплексов с лекарственными средствами, что положительно скажется на его эффективности.



Список литературы References

- Абаев Ю.К. 2006. Справочник хирурга. Раны и раневая инфекция. Ростов на Дону, Феникс, 427.
Abaev Yu.K. 2006. Spravochnik khirurga. Rani i ranevaya infektsiya [Surgeon Directory. Wounds and wound infection], Rostov na Donu, Feniks, 427. (in Russian)
- Базарон Л.У., Стельмах С.А. 2008. Молекулярно-массовые характеристики полигексаметиленгуанидин гидрохлорида. Журнал прикладной химии. 8 (11): 1906-1910.
Bazaron L.U., Stel'mah S.A. 2008. Molekuljarno-massovye harakteristiki poligeksametilenguanidin gidrohlorida. [Molecular-weight characteristics of polyhexamethylene guanidine hydrochloride] Zhurnal prikladnoj himii. 1906-1910. (in Russian)
- Войнцева И.И., Гембицкий П.А. 2009. Полигуанидины – дезинфекционные средства и полифункциональные добавки в композиционные материалы. М., ЛКМпресс, 303.
Voinceva I.I., Gembickij P.A. 2009. Poliguanidiny – dezinfekcionnye sredstva i polifunkcional'nye dobavki v kompozicionnye materialy. [Polyguanidines – disinfectants and polyfunctional additives in composite materials], M., LKM press, 303. (in Russian)
- Григорьева М.Н., Стельмах С.А., Базарон Л.У., Могнонов Д.М. 2011. pH-чувствительные гидрогели на основе полигексаметиленгуанидин гидрохлорида. Журнал прикладной химии. 84 (4): 689-691.
Grigor'eva M.N., Stel'mah S.A., Bazaron L.U., Mognonov D.M. 2011. pH-chuvstvitel'nye gidrogeli na osnove poligeksametilenguanidin gidrohlorida. [pH - sensitive hydrogel based on polyhexamethylene guanidine hydrochloride] Zhurnal prikladnoj himii. 84(4): 689-691. (in Russian)
- Очиров О.С., Могнонов Д.М., Стельмах С.А. 2015. Полимерные гидрогели на основе полигексаметиленгуанидин гидрохлорида и формальдегида. Журнал прикладной химии. 88 (2): 332-335.
Ochirov O.S., Mognonov D.M., Stel'mah S.A. 2015. Polimernye gidrogeli na osnove poligeksametilenguanidin gidrohlorida i formal'degida. [Polymer hydrogel based on polyhexamethylenguanidine hydrochloride and formaldehyde] Zhurnal prikladnoj himii. 88(2): 332-335. (in Russian)
- Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. 1996. Микроскопическая техника. М., Медицина, 544.
Sarkisov D.S., Perov Ju.L. 1996. Mikroskopicheskaja tehnika. [Microscopic machines]. M., Medicina, 544. (in Russian)