

РЕГЕНЕРАТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ КОЛЛАГЕНА С ДОБАВЛЕНИЕМ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ НА ГНОЙНЫХ РАН

Абидова А.Д.

*PhD, старший преподаватель Ташкентского Фармацевтического института,
направление Фармацевтическая биотехнология, mitl2017@mail.ru*

Цеомашко Н.Е.

*DSc, Зав.отд.медико-биологических проблем Республиканского
Специализированного научно-практического медицинского центра психического
здоровья, Узбекистан tsne_77@list.ru*

Аннотация: Провели оценку эффективности применения плёночных раневых покрытий на основе коллагена с псораленом для терапии экспериментальных гнойных ран. В качестве контроля были нелеченные гнойные раны. Установлено, что использование раневых покрытий коллагена с псораленом для терапии полнослойных гнойных ран экспериментальных животных приводит к значительному ускорению заживления ран в 1,38 раз по сравнению с контрольными не лечеными ранами.

Ключевые слова: фотосенсибилизаторы, коллаген, гнойные раны, регенеративная активность, штаммы *E.coli* и *Candida alb*

В современной фотобиологии одной из перспективных направлений является фотодинамическая терапия (ФДТ), и последние 15-20 лет претерпевает бурное развитие в связи с новыми разработками в сфере диагностики, профилактики и лечении заболеваний человека. В основе метода ФДТ лежит введение в организм химических препаратов – фотосенсибилизаторов (ФС), которые обладают повышенной тропностью к клеткам мишеням (раковые клетки, воспалительные ткани, микробы и вирусы) [1; 2; 7; 8; 10; 11]. При воздействии светом определенной длины волны и энергии, ФС начинают вырабатывать атомарный (синглетный) кислород, а также генерацию других активных форм кислорода (АФК), которые вызывают окислительное повреждение различных молекул (белков, ненасыщенных жирных кислот, нуклеиновых кислот) и клеточных структур (мембран, ферментных систем, генетического аппарата и др.), что влечет инактивацию патогенов.

Изучение кожно-раздражающего действия препаратов.

Изучение местного действия препаратов на кожные покровы проводились на белых кроликах [18]. Препараты наносились на выбритые участки кожи животных из расчета 20 мг/см². Реакция кожи регистрировалась по окончании 4-х часовой экспозиции через 1 и 16 часов после однократной аппликации.

Изучение специфической активности препаратов.

Изучена фотосенсибилизирующая способность препаратов путём облучения УФ лучами участков кожи, обработанной и не обработанной тем или иным препаратом ФС.

Для этого аппликации препаратов 2% спиртового раствора ФС наносили на выбритые участки кожи кроликов и через 30 минут облучали УФ лучами (кварцевая лампа мощностью 250 ватт) в течение 30 минут. Кроме того, изучена способность отечественных ФС в составе коллагеновых плёнок стимулировать регенеративные процессы в экспериментальных моделях гнойных ран, смоделированных на белых беспородных крысах [18]. Нагноение резанных ран вызывали штаммами *E.coli* и *Candida alb.* Штаммы предоставлены Научно-исследовательским институтом Эпидемиологии, Микробиологии и Инфекционных заболеваний МЗ РУз.

Основные полученные результаты.

Для изучения фотосенсибилизирующей активности новых соединений, изучения механизмов их действия на микро- и макро-уровне нами был определён алгоритм действий, подобраны методики. Были взяты препараты природного, растительного происхождения: индивидуальное соединение псорален (95 % чистоты), препарат псоберан - смесь двух фурукумаринов (псоралена и бергаптена), выделенные из листьев *Ficus carica* L. семейства Moraceae, а также фуранокумарин – англецин (изопсорален), выделенный из листьев *Psoralea corymbosa* Bunge в институте химии растительных веществ (ИХРВ АН РУз) под руководством к.х.н. Шамьянова Э.Д.

Препараты псоберан, англецин и псорален представляют собой белые кристаллические порошки со специфическим ароматным запахом, часть предоставленных фракций, данных фуранокумаринов не растворимые в воде, но растворимые в этаноле, метаноле, ацетоне и в жирных маслах, часть фракций псоралена и англецина – растворимы в воде.

Результаты изучения, кожно-раздражающего действия фотосенсибилизаторов.

Как известно в медицинской практике препараты фотосенсибилизаторы на основе фуранокумаринов применяются не только внутрь, но и наружу.

В этой связи нами были проведены исследования кожнораздражающего действия псоралена, англецина, псоберана и МС. Для этого на депилированные участки кожи спины кроликов. Препараты наносили на участки кожи животных из расчёта 10 мг/см² для МС и 20 мг/см² для псоралена, англецина и псоберана. Реакция кожи регистрировалась по окончании 4-х часовой экспозиции через 1 и 16 часов после однократной аппликации. Установлено, что изучаемые препараты не вызывают раздражения кожных покровов, признаков раздражения кожи и других патологических признаков не было обнаружено.

Результаты изучения специфической активности фотосенсибилизаторов.

Наиболее объективным способом экспериментального определения фотосенсибилизирующей активности фурукумаринов является метод Pathak и др. [17], основанный на проявлении эритемальной реакции на коже животных, после облучения УФ лучами при предварительном нанесение фурукумарина на облучаемые участки кожи.

Активность препарата определяли на трёх кроликах. Для этого на спинке выбривали участок кожи. На следующий день депиллированные участки кожи промывали тёплой водой с мылом и разделяли на 4 части размером 3х3см каждая. Аппликации 2% спиртовых растворов псоберана, англесина и псоралена в дозе 30 мкг/3 см² наносили на участки кожи кроликов. Четвёртый участок служил контролем. Через 30 минут спинку кроликов облучали УФ лучами с различной экспозицией времени. Источник света находился на расстоянии 15 см. от поверхности кожи. Источником УФ света служил облучатель «кварц-3» с ДРТ-1000 лампой мощностью 250 ватт (ООО «Magnum medical servis», РУз). Для выявления максимальной эритемальной реакции под влиянием одной и той же дозы препаратов в зависимости от срока облучения опыты проводили в два этапа: на 1-ом этапе животных облучали 15 минут, после нанесения препаратов; на 2-ом этапе - облучали 30 минут. После облучения в течение суток проводили визуальное наблюдение за облученными участками кожи животных.

Установлено, что на всех этапах примерно через 12 часов зафиксировано развитие эритемальных реакций различной степени на участках обработанных псораленом и псобераном. Для удобства обработки полученных данных степень эритемальной реакции условно обозначили плюсами (+). Так, при розоватом покраснении меньше половины облученного участка отмечали одним плюсом (+), при розовом покраснении половины облученной площади отмечали двумя плюсами (++); при розовом покраснении всего облученного участка – тремя плюсами (+++); при сильном покраснении всего облученного участка четырьмя крестами (++++). Данные приведены в таблице 1, рисунок 1.

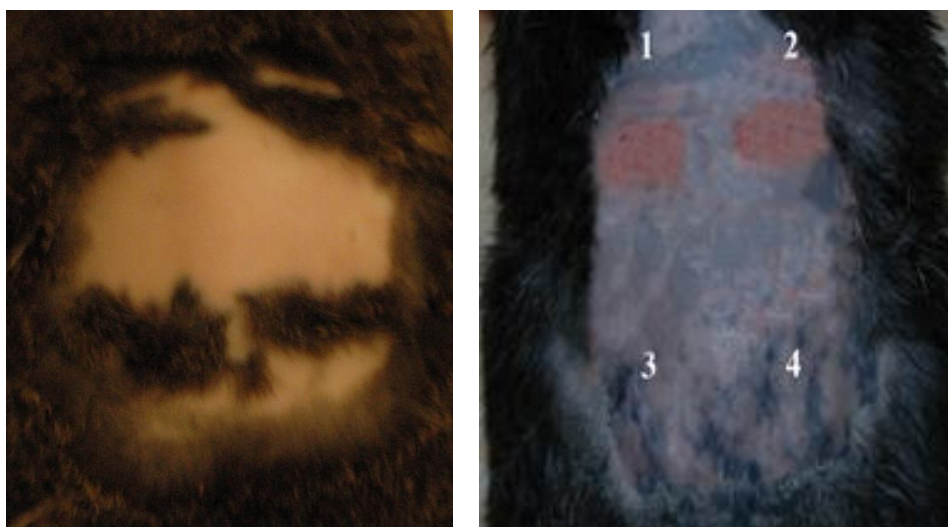


Рис. 1. Фотографии кроликов: на первом фото выбритая спинка кролика, после аппликации фурукумаринов, но без облучения; на втором фото спинка кролика, после

аппликации исследуемых препаратов (1- псорален, 2 – псоберан, 3- МС, 4 – контроль), через 12 часов после 30 минутного облучения УФ лучами.

Таблица 1. Эритемальная реакция на кожи кроликов при нанесении псоралена, псоберана и МС при УФ облучении с различной экспозицией времени и с расстояния 15 см от источника облучения.

Препараты Продолжительность облучения, мин	Псорален	Псоберан	Англецин	Интактные участки
15	+++	++	-	-
30	++++	+++	-	-

Как видно из таблицы 1 и рисунка 1, степень эритемальной реакции после аппликации на кожу псоралена не значительно превосходит таковую псоберана. Эритемальные реакции на оба препарата развиваются через 12 часов после 15-30 минутного облучения участков кожи УФ. Эритемальная реакция не развивается при аппликации англецина.

Таким образом псоберан и псорален, выделенные из среднеазиатских сортов *Ficus carica* L. обладают выраженной фотосенсибилизирующей активностью, в то время как англецин - слабый.

Результаты действия на кожу ран фотосенсибилизаторов.

Фуранокумарины и, в частности, псорален хорошо известны как фотореактивные соединения [12]. Данный класс соединений часто используются в дерматологии в ФДТ ряда заболеваний, таких как витилиго, псориаз, атопическая экзема [10], воспалительных процессов кожи, слизистых желудочно-кишечного тракта [13]. Современные фармакологические исследования показали, что растения, богатые фуранокумарины обладают антибактериальными [11], антидиабетическими [14], антидепрессивными [15], антиоксидантными [16], противогрибковыми [11], антибактериальными свойствами [9]. Комбинация использования псоралена с УФ излучением известно, как терапия PUVA [8]. УФА-1 терапия с помощью ультрафиолета и фотосенсибилизирующих препаратов имеет ряд преимуществ перед другими методами фототерапии. В отличие от средне волнового диапазона Уф-лучи с длиной волны 340—400 нм способны более глубоко проникать в кожу и тем самым воздействовать на компоненты дермы (дермальные лимфоциты и дендритные клетки, фибробласты, тучные клетки, гранулоциты, экстрацеллюлярный матрикс) [4].

В этой связи, актуально исследовать активность псоралена, выделенного из *Ficus carica* L., введенного *ex situ* в состав коллагеновой плёнке совместно с ФДТ экспериментальных гнойных ран.

Раневые покрытия (РП) на основе коровьего коллагена (СС) и введённого в его состав псоралена (Ps) из *Ficus carica* L., получали методом ферментно-кислотной экстракции и методами *ex situ*, описанными ранее в работах Цеомашко Н.Е. и Абидовой А.Д. [6] и обозначили, как СС-Ps. В каждую плёнку СС-Ps вводили по 30 мкг псоралена, так как ранее нами было установлено, что в данной концентрации псорален проявляет наибольшие протективные свойства на мембранах клеток в экспериментах *in vitro* при УФ облучение клеток печени [2].

Модели гнойных ран смоделированы на беспородных белых крысах самцах массой 150-170 гр. Операции проводили под эфирным наркозом. На дипиллированных участках спинок животных по трафарету формировали полнослойные кожные раны, размером 2,0 x 2,0 см. Размеченный квадратным трафаретом 2,0 x 2,0 см кожно-фасциальный лоскут иссекали острыми скальпелем. Мышечное дно раны раздавливали зажимом Кохера. Тампоны смачивали микробной смесью и наносили на ранки из расчёта на ранку 0,2 мл смеси, содержащей микроорганизмы следующих штаммов: №9572 *Candida albicans* Berkant, №М-3-87 *Staphylococcus epidermitis*, №ATCC 25922 *Escherichia coli* в концентрации 1×10^5 микробных тел/мл. Каждое животное содержалось в отдельной клетке. Контроль за течением раневого процесса производили на основании: данных клинического наблюдения, таких как наличие или отсутствие в области раны отека мягких тканей, гиперемии кожных покровов, болезненности при манипуляциях; наличие или отсутствии на поверхности раны некротического детрита и раневого экссудата; отмечали время купирования явлений перифокального воспаления, появления грануляционной ткани, ее зрелости, начала эпителизации, сроков заживления; а также объективным критерием оценки течения раневого процесса служили данные гисто-морфологии зарубцованного участка.

Для оценки скорости заживления гнойных ран использовали планиметрические методы исследования по стандартной методике М.П.Толстых [5]. На рану накладывали стерильную пластину целлофана или полиакрила, на которую наносили контуры раны, а затем ее изображение переносили на миллиметровую бумагу и определяли размеры контуров на 5, 12 и 20 сутки.

В каждой группе животных было по 6 голов. Раны животных первой группы лечили СС-Ps, раны второй группы животных лечили обработкой СС-Ps и УФ лучами. Для этого, после промывки гнойных ран физ раствором, на раны наносили плёнки СС-Ps и оставляли усыпленных эфиром животных под УФ лучами с длиной волн 340 нм (источник излучения - кварцевая лампа мощностью 250 ватт находилась на высоте 1 м от животных) на 30 минут. Раны контрольной группы не подвергались обработке и лечению.

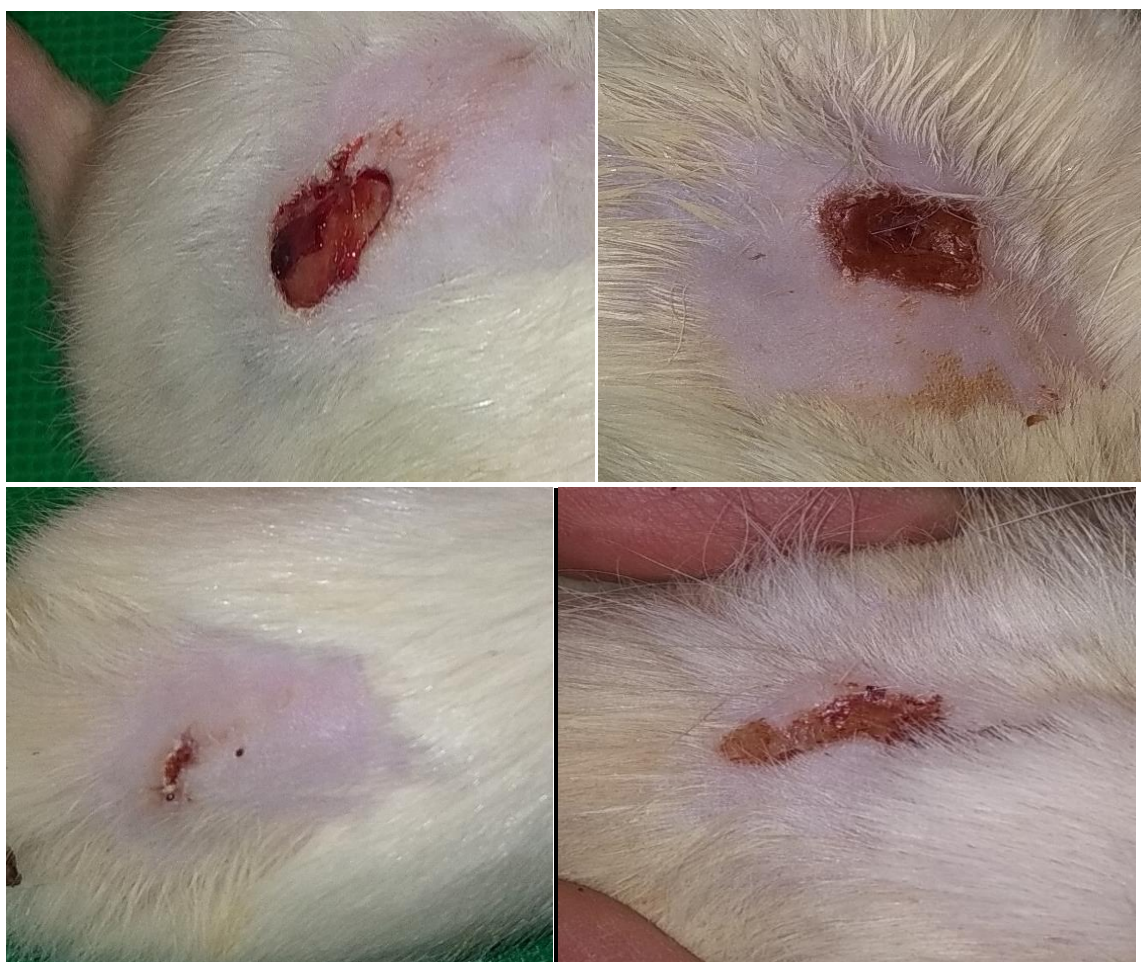
Наиболее объективным способом экспериментального определения фотосенсибилизирующей активности фурукумаринов является метод Pathak и соав. [17], в частности, оценка активности при ФДТ, соответствующими лучами. Так, нами изучена фотосенсибилизирующая способность псоралена в составе коллагеновой

плёнки СС-Рs на ранозаживляющую способность совместно с УФ-облучением и без. Экспериментальные раны наносили на выбритые спинки крыс (рис. 2).



Рис. 2. Фотографии крыс: модель гнойной раны на выбритой спинке крыс, аппликации размером 2х2 см.

Источник света находился на расстоянии 100 см от поверхности кожи. Источником УФ света служил облучатель «кварц-3» с ДРТ-1000 лампой мощностью 250 ватт (ООО «Magnum medical servis», РУз). После облучения в течение суток проводили визуальное наблюдение за облученными участками кожи животных, а далее определяли размеры контуров на 5, 12 и 20 сутки (рис. 3, табл. 2).



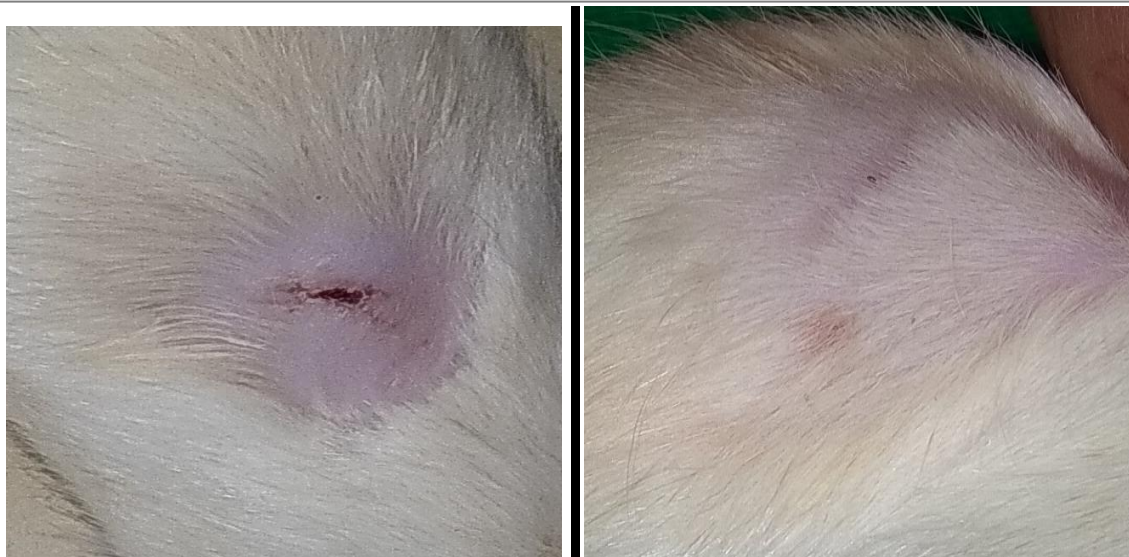


Рис. 3. CC-Ps + УФ (слева) и Контроль (справа) на 5, 12 и 20 сутки, соответственно.

Таблица 2. Влияние РП и ФДТ на изменение площади ран и сроков заживления ($M \pm m$, $n = 10$)

Условия опыта	Средняя площадь раны, см ²			Сроки регенерации ран сутки
	5-е сутки	12-е сутки	20-е сутки	
CC-Ps	2,4±0,07	0,6±0,01	0,01±0,01	18,8±0,2*
CC-Ps+УФ	2,3±0,08	0,4±0,01	0	17,5±0,1*
Контроль	2,9±0,11	1,8±0,07	1,1±0,07	25,8±0,4

Примечание: * $P < 0,001$ по сравнению с контролем

Как видно, из рисунка 3 и таблицы 1, применение CC-Ps совместно с ФДТ не значительно, но ускоряют заживление гнойных ран по сравнению с использованием просто CC-Ps без УФ-облучения, но статистически значимо ($P < 0,001$) оба способа терапии ран ускоряют процесс регенерации по сравнению с контролем, где терапия не применялась. Так, CC-Ps+УФ ускоряет заживление гнойных ран в 1,49 раз, а CC-Ps в 1,38 раз быстрее относительно контрольных ран.

Таким образом, в результате исследований показано, что РП на основе коллагена и фуранокумаринов и, в частности, псоралена, выделенного из среднеазиатских сортов *Ficus carica* L. стимулируют ранозаживляющую активность, ускоряя заживление обсемененных полнослойных ран кожи, что безусловно обеспечено как самим коллагеном – основным белком экстрацеллюлярного матрикса, как идеальной подложки для пролиферации клеток кожи фибробластов, так и псораленом, о чем

свидетельствует небольшой рост регенеративного эффекта при сочетанном использовании СС-Рс и ФДТ. Использование в терапии гнойных ран РП на основе коллагена и псоралена СС-Рс и, особенно, в сочетании с краткосрочным щадящим УФ-облучением значительно стимулирует регенерацию тканей за счет сокращения фазы воспаления в первую очередь, обусловленного не только коллагеном, но и псораленом, так как известно о противовоспалительной [9] и антиоксидантной активности псоралена в используемых концентрациях [2, 3, 16], ведь известно, что в септических ранах значительно повышается свободно-радикальный процесс. Кроме того, псорален обладает антимикробной активностью [11, 13], что и подтверждают наши исследования. Также подтверждается и то. Что активность псоралена, как фотосенсибилизатора активируется в щадящем режиме УФ облучения в диапазоне 312-340 нм.

Терапия гнойных полнослойных экспериментальных ран с использованием раневых покрытий СС-Рс на основе коллагена и псоралена, выделенного из *Ficus carica* L. способствует ускорению заживления ран в 1,38 раз быстрее по сравнению с контрольными не лечеными ранами, а использование данных плёночных покрытий в сочетании с УФ-облучением в щадящем режиме приводит к ускорению регенерации ран в 1,49 раз. Установлено также, что изучаемые фуранокумарины не вызывают раздражения кожных покровов, признаков раздражения кожи и других патологических признаков не было обнаружено при длительных аппликациях растворов на кожу животных.

Специфическую (фотосенсибилизирующую) активность фуранокумаринов определяли метод Pathak и др. [17], основанном на проявлении эритемальной реакции на коже животных, после облучения УФ лучами при предварительном нанесении ФС на облучаемые участки кожи.

В результате проведённых исследований установлено, что на всех этапах примерно через 12 часов зафиксировано развитие эритемальных реакций различной степени на участках обработанных псораленом и псобераном. Эритемальные реакции на оба препарата развивались через 12 часов после 15-30 минутного облучения участков кожи УФ. Эритемальная реакция не развивалась при аппликации англецина.

Таким образом псоберан и псорален, выделенные из среднеазиатских сортов *Ficus carica* L. обладают выраженной фотосенсибилизирующей активностью, в то время как изопсорален англецин - слабой.

В связи с антимикробной активностью псоралена и антиокислительными свойствами в условиях УФ-облучения было интересным исследовать действия данного ФС в составе коллагеновых плёнок на способность ускорять регенерацию гнойных ран в экспериментальных моделях. Результаты данных исследований показали, что раневые покрытия на основе коллагена и фуранокумаринов и, в частности, псоралена, выделенного из среднеазиатских сортов *Ficus carica* L. стимулировали ранозаживляющую активность, ускоряя заживление обсемененных полнослойных ран

кожи, что безусловно обеспечено как самим коллагеном – основным белком экстрацеллюлярного матрикса, как идеальной подложки для пролиферации клеток кожи фибробластов, так и псораленом, о чем свидетельствует небольшой рост регенеративного эффекта при сочетанном использовании данных плёнок и ФДТ (УФ-лучей).

Таким образом, терапия гнойных полнослойных экспериментальных ран с использованием раневых покрытий на основе коллагена и псоралена способствует ускорению заживления ран в 1,38 раз быстрее по сравнению с контрольными не лечеными ранами, а использование данных плёночных покрытий в сочетании с УФ-облучением в щадящем режиме приводит к ускорению регенерации ран в 1,49 раз.

Выводы

1. Псоберан и псорален проявляют свои фотосенсибилизирующие способности в диапазоне УФ лучей 312-340 нм. Аппликации препаратов на кожу не вызывают местного раздражения, но при воздействии на данные участки УФ лучами наблюдаются эритемальные реакции, что свидетельствуют о фотосенсибилизирующей активности.

2. Терапия гнойных полнослойных экспериментальных ран с использованием раневых покрытий на основе коллагена и псоралена способствует ускорению заживления ран в 1,38 раз быстрее по сравнению с контрольными не лечеными ранами, а использование данных плёночных покрытий в сочетании с УФ-облучением в щадящем режиме приводит к ускорению регенерации ран в 1,49 раз.

Список использованной литературы:

1. Ackroyd R, Keltly C, Brown N. The history of photodetection and photodynamic therapy // *Photochem Photobiol.* – 2001. – 74. – С. 656–69.
2. Akaraphanth R, Douglass MC, Lim HW. Hypopigmented mycosis fungoides: Treatment and a 6(1/2)-year follow-up of 9 patients // *J Am Acad Dermatol.* – 2000. – 42. – С. 33–39.
3. Antonella Tinari et al. Mitoptosis: Different Pathways for Mitochondrial Execution // *Autophagy.* — 2007. — Т. 3, № 3. — pp. 282-284.
4. Aw JGA, et al. In Vivo Mapping of Eukaryotic RNA Interactomes Reveals Principles of Higher-Order Organization and Regulation // *Mol Cell.* – 2016. – 62. – pp. 603–617.
5. Brown SB, Brown E. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment // *Lancet Oncol.* – 2004. – 5. – pp. 497–508.
6. C Pfannschmidt, A Schaper, G Heim, T M Jovin, J Langowski. // *Nucleic Acids Res.* – 1996. – 24. – 9. – pp. 1702–1709.
7. Chopra B., Dhingra A. K., Dhar K. L. *Psoralea corylifolia* L. (Buguchi)—folklore to modern evidence: review // *Fitoterapia.* – 2013. – 90. – pp. 44–56.

8. Dawe RS. Maintenance therapy with psoralen-ultraviolet A for mycosis fungoides: in the absence of evidence sitting on the fence is appropriate. // Br J Dermatol. – 2017/ - 177. – 2. – pp. 337-338.
9. Dogra S, Mahajan R. Phototherapy for mycosis fungoides. // Indian J Dermatol Venereol Leprol. – 2015. -81. – pp. 124–135.
10. Egeberg A1, Skov L, Gislason GH, Thyssen JP, Mallbris L. Incidence and Prevalence of Psoriasis in Denmark // Acta Derm Venereol. – 2017. – 97/ -7. – pp. 808-812.
11. Eichman BF, Mooers BH, Alberti M, Hearst JE, Ho PS. The crystal structures of psoralen cross-linked DNAs: drug-dependent formation of holliday junctions // J Mol Biol. – 2001. – 308. – pp. 15–26.
12. Haworth R.A., Hunter D.R. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site // Archives of biochemistry and biophysics. – 1979. –195, -2. – pp. 460-467.
13. Hsieh M.-J., Chen M.-K., Yu Y.-Y., Sheu G.-T., Chiou H.-L. Psoralen reverses docetaxel-induced multidrug resistance in A549/D16 human lung cancer cells lines // Phytomedicine. – 2014. -21, -7. – pp. 970–977.
14. Jiang Z., Xiong J. Induction of apoptosis in human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells in vitro by psoralen from Psoralea corylifolia // Cell Biochemistry and Biophysics. – 2014. – 70, -2. – pp. 1075–1081.
15. Jin H., Wang L., Xu C., et al. Effects of Psoraleae fructus and its major component psoralen on Th2 response in allergic asthma // American Journal of Chinese Medicine. – 2014. – 42, -3. – pp. 665–678.
16. Josefsen L.B., Boyle R.W. Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? // Br J Pharmacol. – 2008. – 154. – pp. 1—3.
17. Pathak MA, Parrish JA, Fitzpatrick TB. Psoralens in photochemotherapy of skin diseases. // Farmaco Sci. – 1981. – 36, -7. – pp. 479-491.
18. Саноцкий И.В. Методы определения токсичности и опасности химических веществ. - Москва. -1970. - с.161-177.