

УДК 577.114

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ**М.В. Макаренко, В.П. Курченко*, С.А. Усанов***Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь***Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь**E-mail: makarenko@iboch.bas-net.by***Введение**

В последние десятилетия раневым покрытиям вязкам уделяется значительное внимание. Раневые покрытия обеспечивают защитное и лечебное воздействие на рану с использованием различных материалов и веществ путем их удержания на необходимом участке тела больного. Из литературных и интернет-источников доступны сведения более чем о 500 раневых покрытий различного состава и назначения. При этом интенсивнее других развивается технология получения покрытий существенно отличающихся от традиционных текстильных перевязочных средств в виде ватно-марлевых повязок, трикотажа. Доминирующей тенденцией современных раневых повязок является использование композиционных полимерных матриц на основе биосовместимых природных и синтетических полимеров [1]. К материалам биомедицинских матриц для раневых повязок предъявляется широкий спектр требований, причем первичные критерии отбора - отсутствие цитотоксичности, биосовместимость, биоразлагаемость [2]. Для эффективного лечения ран и раневой инфекции требуются перевязочные средства с высокой сорбционной активностью, способные эффективно удалять избыток раневого экссудата и его токсических компонентов, обладать проницаемостью для паров воды, но исключать высушивание раневой поверхности, предотвращать вторичное инфицирование раны, иметь эластичность для моделирования поверхностей со сложным рельефом и достаточную механическую прочность. Раневое покрытие должно обеспечить оптимальную микросреду для заживления ран при отсутствии пирогенного и токсического действия, не оказывать местного раздражающего и аллергического действия. К преимуществам раневых покрытий на основе композиционных матриц следует отнести возможность включения лекарственных веществ (антибактериальных, антисептических, противовоспалительных, влияющих на репаративные процессы) и получение прозрачных покрытий для визуального наблюдения за раной.

В литературе описаны примеры создания раневых повязок с различными свойствами: защитные (защита от механических воздействий и проникновения инфекции извне), сорбционные (способные поглощать выделяющийся из раны экссудат), лечебные (содержащие лекарственные вещества с анестезирующим, гемостатическим действием, препятствующие развитию раневой инфекции, стимулирующие заживление раны) [3]. Классифицируя раневые покрытия по происхождению можно условно разделить на природные (различные варианты консервированной кожи или препараты из бесклеточной дермы) и синтетические на основе композиционных полимерных матриц. Из широкого ассортимента раневых покрытий всем медико-биологическим требованиям соответствуют рассасывающиеся покрытия на основе полимерных матриц, которые могут применяться как на ранних, так и на более поздних стадиях лечения ран и ожогов. Использование уникальных механических и физико-химических свойств композиционных гидрогелей в качестве лекарственной формы обеспечивает пролонгирование действия лекарственных веществ, адресную доставку к системам и органам, а в некоторых случаях и заметный синергетический эффект действия препарата и фармакопейных субстанций.

Среди полимеров из природных источников чаще других используют гиалуроновую кислоту, хитозан, желатин, коллаген, целлюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, альгинаты, фибрин. Широко используют синтетические полимеры благодаря их превосходным

механическим свойствам, биосовместимости и биodeградируемости - полиакриловая кислота, полигликолевая кислота, полимолочная кислота, поливиниловый спирт (ПВС), поликапролактон, поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль (ПЭГ) [4]. Варьируя соотношение компонентов и условия синтеза, можно получить полимерные матрицы различного состава, структуры и морфологии.

Одним из наиболее перспективных полимеров для разработки раневых покрытий являются хитозан и его производные. Это связано с тем, что хитозан нетоксичен, биосовместим и биodeградируем, обладает антимикробным действием и иммуностимулирующим действием [5]. Хитозан гемостатик, который ускоряет свертываемость крови и блокирует нервные окончания, снижая боль. Он оказывает положительное действие на раневой процесс. Установлено, что хитозан ускоряет репарацию тканей, способствует контракции раневой поверхности и регулирует секрецию воспалительных медиаторов, таких как интерлейкин-8, простогладин E, др. Хитозан стимулирует пролиферацию клеток и гистоархитектурную организацию тканей. Низкомолекулярный хитозан ингибирует активацию и экспрессию матричных металлопротеаз в первичных человеческих дермальных фибробластах. Хитозан постепенно деполимеризуется с освобождением N-ацетил-β-D-глюкозамина, который инициирует пролиферацию фибробластов и способствует упорядочению коллагеновых волокон, а также стимулирует рост уровня естественной гиалуриновой кислоты в раневой зоне. Ускоряя заживление, хитозан предотвращает формирование грубого рубца. Хитозан технологичен и может быть использован для изготовления тканево-инженерного материала. Другим достоинством полимера является то, что его цепи несут многочисленные реакционно-способные сайты в форме гидроксильных групп и аминогрупп, которые могут быть конъюгированы с биологически активными веществами, способными к селективной и контролируемой регуляции роста клеток [6].

Хитозан активно изучается как основа для получения раневых и ожоговых покрытий в составе различных форм: гидрогелей, мембран, пленок, нанофибер, гранул, наночастиц и скафолдов [7]. Последние из них вызывают особый интерес как новые универсальные формы, которые находят применение в тканевой инженерии и регенеративной медицине. Для получения раневых покрытий на основе хитозана были разработаны различные технологии. Эти технологии включают отлив из раствора и частичное выщелачивание, фазовое разделение с последующей лиофилизацией, электроформование наноструктур хитозана.

Цель данной работы - получение методом криоструктурирования композиционных гидрогелей, содержащих ПВС, альгинат натрия, ПЭГ, хитозан и исследование структуры и физико-химических свойств получаемых матриц.

Методы исследования

В работе использовали хитозан (ООО «Биопрогресс», Москва, РФ), альгинат натрия (Cargill, Франция), поливиниловый спирт 28-99 (Fluka), полиэтиленгликоль (LobaChemie), желатин для медицинских целей (ГОСТ 23058), глицерин (ГОСТ 6824-96).

Криогели получали методом криоструктурирования с помощью последовательных циклов замораживания-оттаивания. Гидрогели получали растворением полимеров в воде при нагревании, внесением ингредиентов в определенных массовых соотношениях, перемешиванием конечного раствора при комнатной температуре. Полученные образцы дегазировали под вакуумом при комнатной температуре, замораживали при минус 20 °С в течение в течение суток, оттаивали при комнатной температуре. Повторяли цикл замораживания-оттаивания 3-5 раз. Полученные криогели подвергали лиофильной сушке. Степень набухания SR (%) и содержание геля-фракции σ (%) определяли гравиметрическим методом.

Образцы криогелей взвешивали на аналитических весах, погружали в дистиллированную воду или физиологический раствор и взвешивали через определенные промежутки времени. Степень набухания определяли по формуле:

$$SR (\%) = (W_s - W_d) / W_d \times 100;$$

где, W_s – масса набухшего криогеля, W_d – масса исходного криогеля.

Определение геле-фракции проводили многократной экстракцией образцов криогеля водой при комнатной температуре. Пленки высушивали при 50 °С и взвешивали. Влагодотдачу композитов определяли при температуре воздуха 20 °С и относительной влажности 60%.

Изучение структуры проводили на сканирующем электронном микроскопе JSM-5610 LV с системой химического анализа EDX JED-2201 (JEOL, Япония).

Результаты и обсуждение

К взаимопроницающим полимерным сетям (ВПС) (interpenetrating polymer networks) можно отнести любой композиционный гидрогель, структура которого образована двумя или более полимерами и содержание воды составляет 50 - 90% [8]. Такие гидрогели способны адсорбировать значительное количество воды или биологических жидкостей в своей структуре без растворения. Гидрогели ВПС привлекают особое внимание исследователей в последние годы как потенциальные материалы для биомедицинских приложений [9]. Появление новых сфер применения гидрогелей выдвигает новые критерии отбора и новые требования к их свойствам. Традиционные гидрогели нестабильны и требуют стабилизации, зачастую с использованием токсичных сшивающих реагентов, что усложняет технологию и повышает стоимость получения, сужает возможные области их применения. Новая технология позволяет сочетать различные полимеры, как синтетические, так и природные, стабилизировать матричные структуры за счет катионной или анионной сшивки, криоструктурирования, облучения и таким образом исключить применение токсичных связующих агентов и улучшить эксплуатационные свойства для удовлетворения конкретных потребностей. Гидрогели ВПС обладают повышенной механической прочностью и ударной вязкостью в сравнении с отдельными компонентами. Повышение механической прочности матриц достигается использованием концепции двухсетевых гелей (double network) [10], комбинируя поливиниловый спирт и желатин, полиэтиленгликоль /полиакриловая кислота (ПАК), агароза/диакрилат ПЭГ. Тестирование *in vitro* криогелей желатин-фибриноген подтверждает пригодность указанного матрикса в качестве раневой повязки [11]. Гидрогели хитозан/желатин/ПВС при различных массовых соотношениях ХТ/желатин (1: 3, 1: 2, 1: 1, 2:1 и 3:1) получали и сшивали методом гамма-облучения при 40 kGy для применения в качестве раневых повязок [12]. Гидрогели показали хорошую pH-чувствительность, кровоостанавливающие свойства, набухающую способность и скорость обезвоживания. Гидрогели хитозан/ПВС/полиэтиленоксид имели хорошую способность к набуханию, скорость испарения воды и механические свойства [13]. Влияние различных доз радиации и весовых соотношений на свойства, включая содержание геля, способность к набуханию, скорость испарения воды и механических свойств были исследованы. Полученные гидрогели имели хорошую способность к набуханию, скорость испарения воды и механические свойства. Тестирование *in vitro* антибактериальной активности гидрогелей показало выраженное ингибирующее действие против двух бактерий (золотистого стафилококка и кишечной палочки). Биоактивные пленки из бактериальной целлюлозы и гидроколлоидов (гуаровая камедь и гиалуроновой кислоты) с покрытием коллагеном показали высокий потенциал для применения в качестве биоактивных раневых повязок, скаффолдов для клеточного роста и устойчивых систем доставки лекарств [14]. Полученную суспензию нановолокон целлюлозы в сочетании с гидроколлоидами использовали для получения бионанокompозитных пленок путем мокрого литья. Материалы были стабильными в

физиологическом растворе и имели большую степень набухаемости по сравнению с бактериальной целлюлозой.

ВПС криогели получали методом криоструктурирования [15] водных композиционных растворов, содержащих 5-25% по весу поливинилового спирта в сочетании с природными полимерами: альгинатом натрия, хитозаном, желатиной. Соли альгиновой кислоты ($pK_a = 4,23$) содержат остатки β -D-маннуриновой и α -L-гулуриновой кислот [16]. Макромолекулы альгината в нейтральных и щелочных водных растворах существуют в виде полианионов. Хитозан представляет собой линейный полисахарид содержащий остатки N-ацетил-2-амино-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозу и 2-амино-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозу, соединенных β -1 \rightarrow 4 гликозидными связями. В водных растворах хитозан присутствует в катионной форме ($pK_a = 6,27$). Ускорение процессов заживления ран и ожогов под влиянием альгинатов, хитозана, гиалуриновой кислоты обусловлено их стимулирующим действием на развитие грануляционной ткани, что способствует эпителизации. Полисахаридные материалы способствуют репаративным процессам на всех стадиях лечения раны. С целью повышения механической прочности и устойчивости покрытий из природных полимеров используют композиции с биосовместимыми полимерными гидрогелями. Для достижения требуемых свойств ВПС гидрогеля необходимо учитывать не только химический состав композиционного гидрогеля, но и выбор способа получения, позволяющего сформировать достаточно тонкую структуру матрикса. Управление топографией и морфологией гетерофазного криогеля является наиболее сложной проблемой, требующей решения нескольких задач. Первоочередной задачей получения ВПС с требуемыми свойствами является получение гомогенного композиционного раствора с последующей межмолекулярной физической сшивкой за счет водородного связывания, ионных и других взаимодействий.

Полученные методом СЭМ микрофотографии криогелей показали однородную морфологию поперечных сечений образцов, что подтверждает хорошую смешиваемость и гомогенность между ингредиентами композитных гидрогелей. Замерзшие поликристаллиты растворителя в качестве порогена образуют гетеропористую (с взаимосвязанными порами) структуру полимерного матрикса, в котором макромолекулы соединены в устойчивую 3D сетку. Пористость структуры свойственна всем изученным образцам, но они отличаются по морфологии, размерам и регулярности их расположения (рисунок 1). На микрофотографии видны различия пористости структуры гетерофазных криогелей различного состава при одинаковом разрешении $\times 1000$: А – (10% ПВС, 3% Алг); Б – (10% ПВС, 3% Алг, 0,2% ХТ); В – (3% ПВС, 2% Алг, 0,5% ХТ); Г – (4,0% ПВС, 1,5% ПВП, 2,0 Алг). Полученные данные подтверждают влияние природы и соотношения ингредиентов на надмолекулярную структуру и размеры макро- и микропор композиционных криогелей (в пределах 5-100 μ m), особенности пористых сетчатых структур при использовании пластификаторов и неорганических наночастиц (гидроксипатит синтезирован согласно [17], частицы размером 5-80 нм).

Известно, что образование поперечных связей происходит в первом цикле замораживания, а в последующих циклах создаются новые кристаллиты, однако расстояние между сеткой изменяется незначительно. Внесение хитозана нарушает образование кристаллитов ПВС в процессе криоструктурирования, снижая плотность физической поперечной сшивки. Аналогичные изменения структуры матрикса наблюдаются при внесении пластификатора (глицерина), что вызывает значительное изменение морфологии по сравнению с исходным криогелем на основе ПВС-Алг и влияет на физико-механические свойства получаемых ВПС криогелей. Образцы разного состава визуально отличаются по внешнему виду (рисунок 2А).

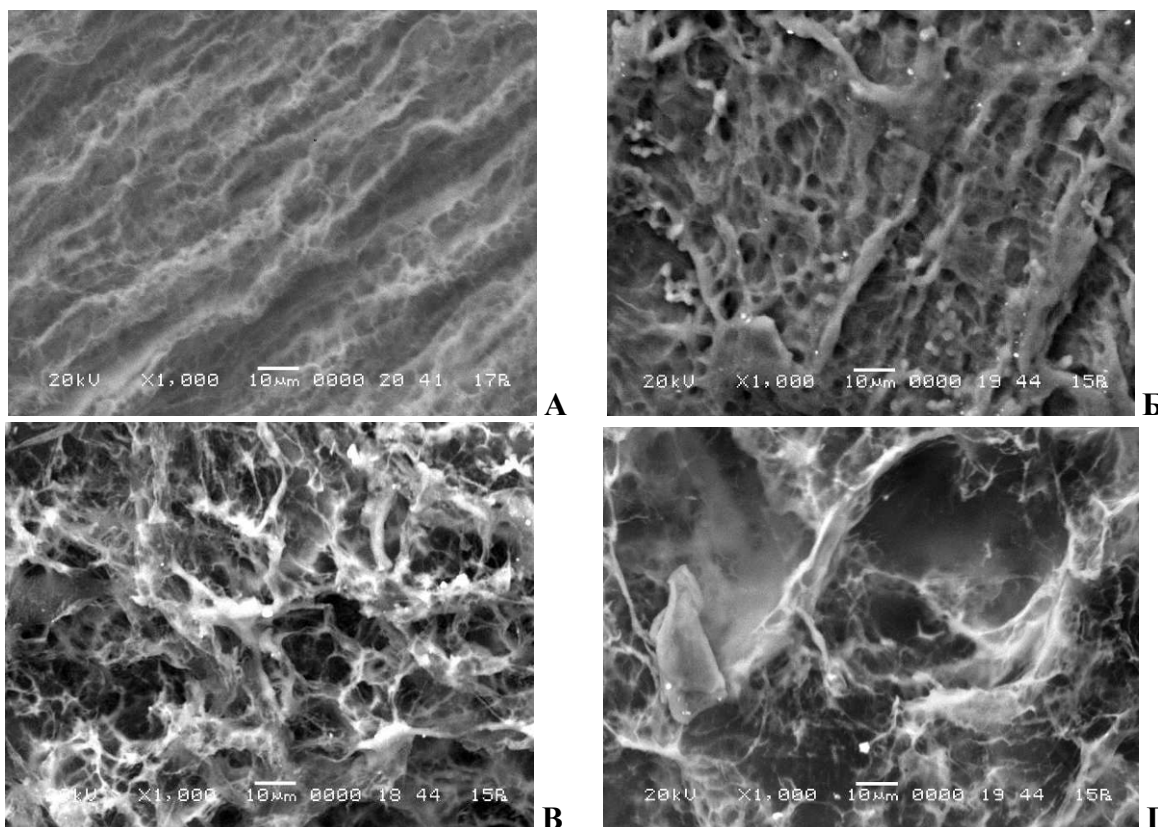
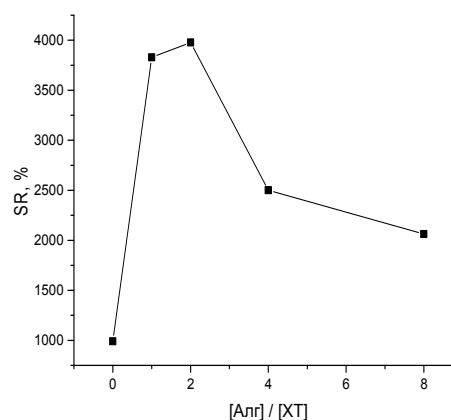


Рисунок 1 – Микрофотографии образцов с разрешением $\times 1000$: **А** - 10%ПВС, 3%Алг; **Б** - 10% ПВС, 3% Алг, 0,2% ХТ; **В** - 3% ПВС, 2% Алг, 0,5% ХТ; **Г** – 4,0% ПВС, 1,5% ПВП, 2,0% Алг.



А



Б

Рисунок 2 – Внешний вид образцов (А) и степень набухания криогелей (Б)

Определение степени набухания криогелей используют для оценки потенциальной способности поглощения жидкостей и экссудатов. Экспериментально показано, что степень набухания криогелей ПВС-Алг-ХТ зависит как от соотношения Алг / ХТ (рисунок 2Б), так и от концентрации ХТ в криогеле - при внесении 0,2% ХТ в исходный гидрогель (10% ПВС-3% Алг) она увеличивается в 1,5 раза. Такой же эффект оказывает внесение пластификатора: добавление 10 % глицерина увеличивает SR в 1,9 раза. Внесение ХТ и глицерина нарушает плотность физической сшивки полимерной сети ПВС-Алг, образующиеся микрополости увеличивают скорость диффузии молекул воды, проницаемость матрикса и, соответственно, скорость и степень набухания по сравнению с исходным ПВС-Алг криогелем.

Изучение кинетики обезвоживания композиционных криогелей ПВС-Алг-ХТ показало влияние количества ХТ в композите на скорость дегидратации криогелей

(рисунок 3). Исходный криогель (контроль, без хитозана) В – (10% ПВС, 3 % Алг), С – (Алг/ХТ=16:1), D–(Алг/ХТ =12:1), E –(Алг/ХТ =8:1).

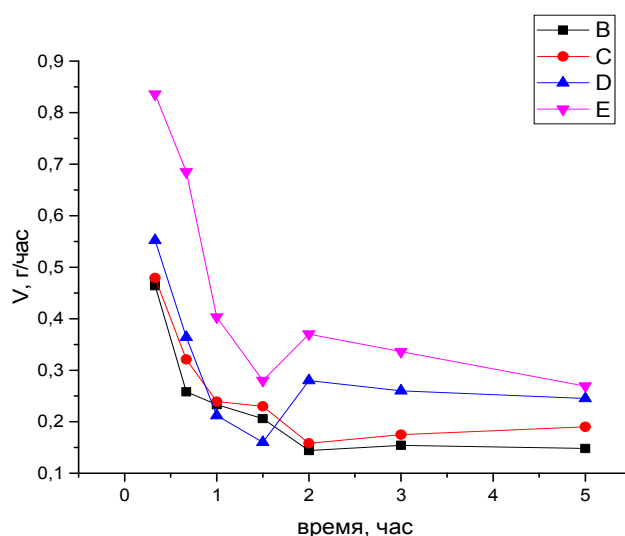


Рисунок 3 – Скорость обезвоживания композиционных криогелей.

Образцы характеризуются различной скоростью набухания: быстрый начальный этап (от 0,5 до 2,5 ч) за счет эффекта гидратации и более медленное набухание в течение нескольких суток. Скорость обезвоживания криогеля (10% ПВС, 2% Алг) возрастает при увеличении количества содержания хитозана до 1%. При этом некоторые менее прочные матриксы (исходный 10% ПВС, 3% Алг; криогель 10% ПВС, 3% Алг, 0,2% ХТ) показали уменьшение веса, т.е. материалы были не стабильны в растворе. Способность композиционных материалов к рассасыванию увеличивается благодаря снижению плотности сшивок матрикса, водо- и плазморастворимости используемых полисахаридов альгината и хитозана. Длительность рассасывания альгинатсодержащих матриксов можно регулировать изменяя соотношение ионов Ca^{+} и Na^{+} , смешанные кальциево-натриевые альгинаты рассасываются за две недели в то время как альгинат кальция в течение 3 месяцев. Что касается содержания гель-фракции криогелей, то прибавление ХТ приводит к ее заметному уменьшению.

Выводы

Показано, что модификация гидрогелей ПВС - Алг введением полисахарида хитозана позволяет улучшить структуру и физико-химические свойства получаемых криогелей: степень набухания увеличивается в 1,5-1,9 раза, скорость обезвоживания увеличивается в 2-3 раза. Таким образом, криоструктурирование композиционных ВПС гидрогелей является эффективным и достаточно технологичным способом получения полимерных матриксов с гетеропористой 3D структурой, высокой сорбционной активностью и поропроницаемостью, в качестве потенциальных материалов для раневых повязок.

Исследование выполнено при финансовой поддержке ГПНИ «Химические технологии и материалы», подпрограмма «Фармакология и фармацевтика» в рамках проекта «Разработать технологию получения 3D скафолдов на основе композитов биodeградируемых полимеров для раневых покрытий».

Список литературы

1. Boateng J.S., Matthews K.H., Stevens H.N., Eccleston G.M. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. J Pharm Sci. 2008, 97:2892–29.
2. Agrawal P., Soni S., Mittal G., Bhatnagar A. Role of polymeric biomaterials as wound healing agents. Int J Low Extrem Wounds. 2014, 13(3):180-190.
3. Vasconcelos A., Cavaco-Paulo A. Wound dressings for a proteolytic-rich Environment. Appl Microbiol Biotechnol. 2011, 90:445–460.

4. Mayet N., Choonara Y.E., Kumar P., Tomar L.K., Tyagi C., Du Toit L.C., Pillay V. A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems. *J Pharm Sci.* 2014, 103(8):2211-2230.
5. Jayakumar R., Prabakaran M., S.V. Nair S.V., Tamura H. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnology Advances.* 2010, 28(1):142-150.
6. Скрябина К.Г. Хитозан / под.ред. К.Г. Скрябина, С.Н. Михайлова, В.П. Варламова. – М.: Центр "Биоинженерия" РАН, 2013. – 593 с.
7. Chen J.P., Chang G.Y., Chen J.K. Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing. *Colloids Surf, A.* 2008, 313–314:183–188.
8. Singh P., Kumar S.K., Keerthi T.S., Mani T.T., Getyala A. Interpenetrating polymer network (IPN) microparticles and advancement in novel drug delivery system: a review. *Pharm Sci Monitor.* 2012; 3(1): 1826-37.
9. Lohani A, Singh G, Bhattacharya S.S., Verma A. Interpenetrating polymer networks as innovative drug delivery systems *J Drug Deliv.* 2014, 2014: 1-11.
10. Haque M.A., Kurokawa T., Gong J.P. Super tough double network hydrogels and their application as biomaterials. *Polymer.* 2012, 53: 1805-1822.
11. Dainiak M.B., Allan I.U., Savina I.N., Cornelio L., James E.S., James S.L., Mikhailovsky S.V., Jungvid H., Galaev I.Y. Gelatin-fibrinogen cryogel dermal matrices for wound repair: preparation, optimisation and in vitro study. *Biomaterials.* 2010, 31:67–76.
12. Fan L., Yang H., Yang J., Peng M., Hu J. Preparation and characterization of chitosan/gelatin/PVA hydrogel for wound dressings. *CarbohydrPolym.* 2016, 146:427-34.
13. Fan L., Yang J., Wu H., Hu Z., Yi J., Tong J., Zhu X. Preparation and characterization of quaternary ammonium chitosan hydrogel with significant antibacterial activity. *Int J BiolMacromol.* 2015, 79:830-836.
14. Woehl M.A., Ono L., Vidotti I.C.R., Wypych F., Schreiner W.H., Sierakowski M.R. Bioactive nanocomposites of bacterial cellulose and natural hydrocolloids. *J. Mater. Chem. B.* 2014, 2: 7034–7044.
15. Makarenko M.V., Usanov S.A. Cryostrukturization of hydrogels for preparation the polymeric composites. *Proceedings of the 8th International Scientific Conference “Energy and material-saving clean technology”.* Belarus, Grodno. 2010. Vol. 2. P. 84-89.
16. A. Lee K.Y., Mooney D.J. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science.* 2012, 37(1): 106-126.
17. Makarenko M.V., Usanov S.A. pH-stabilizing substance. Patent BY 12342. 2009.

MODERN APPROACHES TO THE DEVELOPMENT OF WOUND COVERINGS

M.V. Makarenko, V.P. Kurchenko*, S.A. Usanov

Institute of Bioorganic Chemistry NAS of Belarus, Minsk, Belarus

**Belarusian State University, Minsk, Belarus*

E-mail: makarenko@iboch.bas-net.by

The article discusses current trends produce wound dressings based on biocompatible natural and synthetic polymers. The use of composite matrices as a basis of wound dressings can significantly change the design and performance characteristics in accordance with modern requirements. Discusses some aspects of obtaining matrices, in particular by obtaining chitosan nanofiber electrospinning method, obtaining composite matrices by cryostrukturization of composite interpenetrating polymeric network (IPN) hydrogels comprising polyvinyl alcohol, sodium alginate, polyvinylpyrrolidone, polyethylene glycol, chitosan and other ingredients. Improvement of new technologies has led to the production of a number of polymer compositions with new characteristics, such as biocompatibility, swelling, biodegradability, stability and specificity compared to conventional methods.