

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОНОСИТЕЛЕЙ, НАГРУЖЕННЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ, ДЛЯ ТЕРАПИИ МОДЕЛЬНЫХ ДЕФЕКТОВ КОЖНЫХ ПОКРОВОВ

А.В.Муруева\*, А.М.Шершнева\*\*, Е.И.Шишацкая\*<sup>\*,\*\*</sup>, Т.Г.Волова\*<sup>\*,\*\*</sup>

*\*Институт биофизики СО РАН; \*\*Институт фундаментальной биологии и биотехнологии ФГОУ ВПО Сибирского федерального университета, Красноярск*

Исследована эффективность противовоспалительных препаратов, депонированных в полимерные микрочастицы из резорбируемых природных полиэфиров полигидроксиалканоатов, на модельных дефектах кожных покровов, вызванных химическим ожогом, лабораторных животных. Восстановление кожных покровов при применении инкапсулированных форм противовоспалительных препаратов в виде аппликаций микрочастиц в гелевом микроокружении протекало активнее по ряду показателей (площадь ожоговой раны, скорость ранозаживления, количество акантоэпителиальных тяжей, количество волосяных фолликулов и сальных желез), чем при традиционной терапии. Результаты позволяют сделать вывод о перспективности разработанной формы препаратов, депонированных в резорбируемые полимерные микрочастицы, для лечения дефектов кожных покровов.

**Ключевые слова:** *резорбируемые полимеры, поли-3-гидроксипропионат, системы контролируемой доставки лекарств, полимерные микрочастицы, модельные дефекты кожных покровов*

Разработка эффективных препаратов для лечения повреждений кожных покровов — актуальная проблема реконструктивной медицины, обусловленная постоянным ростом количества дефектов кожи вследствие ожогов, травм и хирургических вмешательств. При традиционной терапии на ранней стадии раневого процесса с явлениями экссудации применяют, как правило, консервативное лечение под повязками, в том числе с содержанием антибактериальных и ранозаживляющих препаратов (Acticoat, “Smith and Nephew Co”) [9], кремов (Geben cream, “Tanabe Mitsubishi Pharma Co”) [11], гидроколлоидов (Dodder, “ConvaTec Co”) [7]. Однако повязки постепенно уходят в прошлое как недостаточно эффективное и травмирующее раневую поверхность средство. В настоящее время получило развитие новое направление — разработка долговременных лекарственных форм,

пригодных для разных способов введения, включая трансдермальные формы; последние благодаря местному применению позволяют повысить эффективность доставки и дозу препарата в ране.

Для конструирования долговременных форм препаратов необходимы специализированные материалы, используемые в качестве носителей. Как правило, таковыми служат высокомолекулярные полимерные материалы, обладающие способностью деградировать в организме без образования токсичных продуктов. Среди биоразрушаемых полимеров наиболее освоены полиэферы монокарбоновых кислот — полилактиды и полигликолиды, которые с 1970 г. разрешены для использования в медицине в США (United States Food and Drug Administration — FDA). На втором месте по значимости полигидроксиалканоаты (ПГА) — полимеры микробиологического происхождения, которые по сравнению с полилактидами термопластичны, оказывают меньшее воздействие на

**Адрес для корреспонденции:** [anna.kuzmina88@gmail.com](mailto:anna.kuzmina88@gmail.com). Шершнева А.М.

pH тканей и обладают более длительным периодом резорбции *in vivo* [1]. В работах Института биофизики СО РАН показана возможность конструирования из ПГА долговременных форм лекарственных препаратов в виде микрочастиц [4, 10, 13], безопасных для разных способов введения и способных функционировать *in vivo* до 12 нед и более [12, 14]; на лабораторных животных показана эффективность микрочастиц, нагруженных цитостатическим препаратом, для подавления модельных опухолевых процессов [5, 6].

Цель данной работы — разработать и исследовать лекарственную форму в виде резорбируемых микрочастиц, нагруженных противовоспалительными препаратами, для лечения модельных дефектов кожных покровов.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследованы микрочастицы, изготовленные из полимера 3-гидроксисмасляной кислоты, синтезированные по разработанной технологии [12] и нагруженные лекарственными препаратами: диклофенаком и дексаметазоном (содержание препаратов — 17.5% и 1.2% от массы полимерной матрицы соответственно). Изучены следующие характеристики полученных микрочастиц: средний диаметр, индекс полидисперсности (Pdl),  $\zeta$ -потенциал (измерения выполнены на анализаторе частиц Zetasizer Nano ZS "Malvern" методом динамического светорассеяния).

Модельное повреждение кожных покровов (химический ожог) проводили на лабораторных мышах (белые мыши линии BALB/c массой 20–23 г) по методике [3] нанесением на выбритую поверхность спины размером 1 см<sup>2</sup> 200 мкл 2.5% раствора дихромата калия в виде аппликации. Гистологический анализ биоптатов ран позволил выделить в раневом процессе несколько фаз: травматический некроз (альтерация), воспаление и регенерационный гистогенез. По гистологическим проявлениям этих фаз в тканях определены зоны первичного некроза и перинекротические области, в которых протекали процессы регенерационного гистогенеза и адаптивной перестройки тканевых элементов в процессе последующей терапии. В фазе травматического некроза к 8-м суткам у животных наблюдался некроз эпидермиса, сосочкового и сетчатого слоев дермы. Площадь ожоговой раны у всех животных составила в среднем 5.01 см<sup>2</sup>.

Животные с модельными ожогами были разделены на 3 группы (по 6 особей в каждой): 1-я (отрицательный контроль) не получала терапию; 2-я (группа сравнения) получала аппликации ди-

клофенака с дексаметазоном (0.08 мг диклофенака и 0.02 мг дексаметазона на одно животное) ежедневно в течение 11 сут; 3-й группе на рану наносили микрочастицы с депонированными препаратами в составе геля на водно-органической основе, содержавшего водорастворимые полимеры в дозе, аналогичной таковой в группе сравнения. Препараты в виде микрочастиц наносили на раневую поверхность 1 раз в 3 сут на основании проведенных ранее исследований, в результате которых эффект ежедневного нанесения микрочастиц на кожу был схож с результатами однократного нанесения в течение 3 сут [8].

Длительность эксперимента составила 20 сут, в том числе от начала терапии — 12 сут. Динамику процесса регенерационного гистогенеза и адаптивной перестройки тканевых элементов в ране в процессе лекарственной терапии исследовали гистологической техникой и методами планиметрии. Изменение площади раневой поверхности определяли по методике [2] с определением скорости заживления раны. Для гистологических исследований биопсию кожи проводили после выведения животных из эксперимента передозировкой эфирного наркоза на 4, 8, 12-е сутки после начала терапии. Исследования включали оценку воспалительной реакции и проявления акантоза (показатель усиленной пролиферации базальных и шиповатых клеток); подсчет количества роговых кист (маркер отставания дифференцировки клеток эпидермиса в условиях ускоренной регенерации); оценку количества сальных желез и волосяных фолликул (источник недифференцированных эпителиальных клеток, позволяющих участвовать в регенерации эпидермиса при обширных, неглубоких химических ожогах кожи).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартного пакета программы "Microsoft Excel", "Statistica 8.0". Средние значения и ошибки среднего оценивали в зависимости от величины выборки по *U* критерию Манна—Уитни и *t* критерию Стьюдента (уровни значимости: 0.05 и 0.01). Результаты приведены в виде  $X \pm m$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

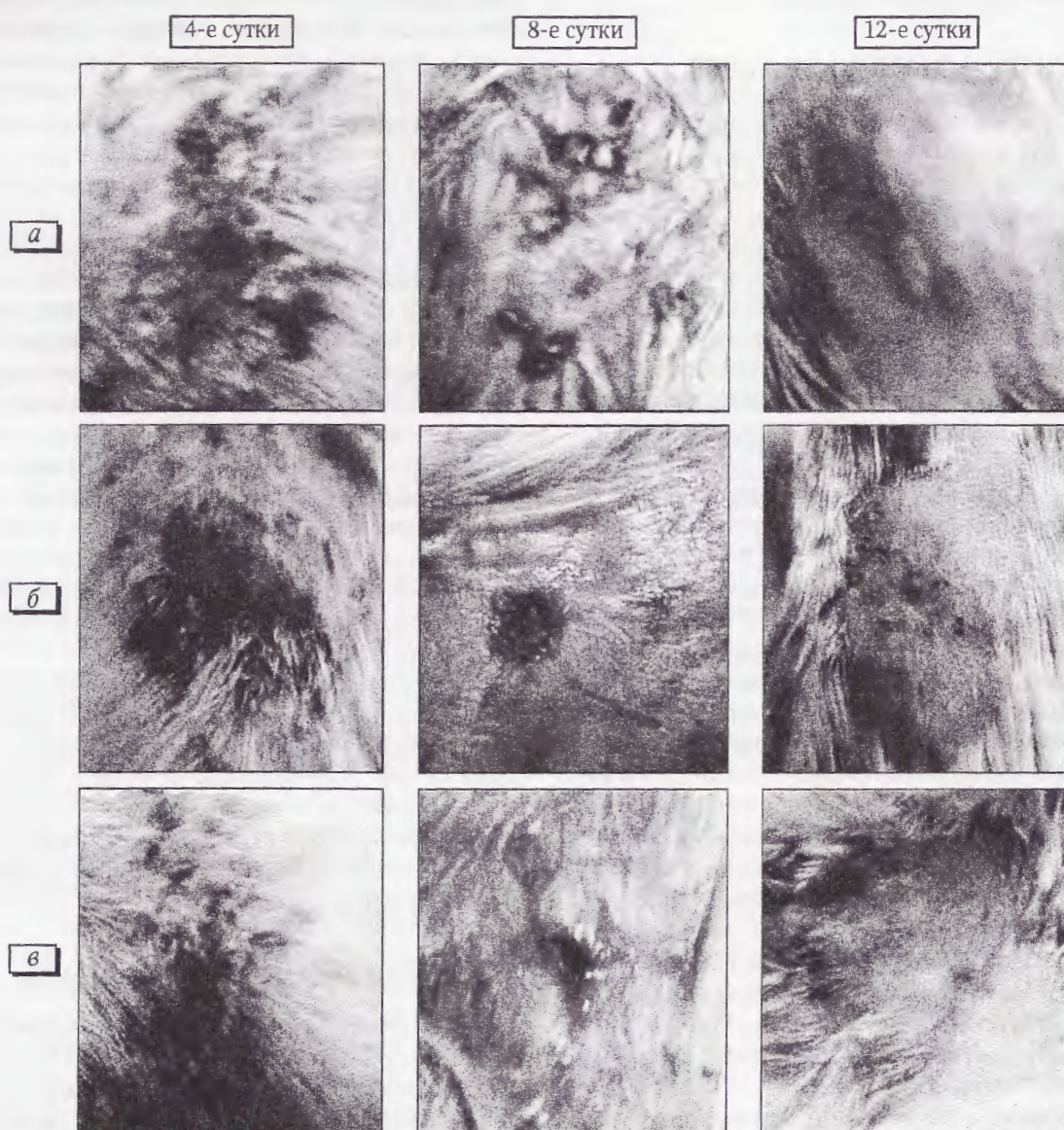
Методом испарения растворителя из трехкомпонентной эмульсии получены микрочастицы, несущие противовоспалительные препараты (диклофенак, дексаметазон). Микрочастицы сферической формы, средний диаметр —  $630.0 \pm 10.3$  нм, индекс полидисперсности —  $0.358 \pm 0.007$ ,  $\zeta$ -потенциал —  $-19.20 \pm 0.21$  мВ.

Лечение начиналось с 8-х суток после формирования ожоговой раны. У животных, не получавших терапию, на протяжении всего эксперимента наблюдались клинические признаки интоксикации: снижение аппетита и двигательной активности. При проведении терапии (группа сравнения и 3-я группа) в течение первых 2-3 сут клинические признаки интоксикации были умеренными и полностью исчезали к 6-8-м суткам наблюдения.

Регенерационный эффект в ранах при применении препаратов, депонированных в микрочастицы, протекал активнее, чем в группе сравнения (рис. 1). Площадь ожоговой раны уменьшилась на 8-е сутки терапии у животных 3-й груп-

пы до  $0.5 \text{ см}^2$  (практически в 10 раз), в группе сравнения до  $0.875 \text{ см}^2$  (в 5.7 раза), в группе без терапии до  $1.75 \text{ см}^2$  (в 2.75 раза) (рис. 2). Скорость заживления ран в 3-й группе составила в первые 4 сут терапии в среднем  $0.113 \text{ см}^2/\text{сут}$ , с 4-х по 8-е сутки —  $0.50 \text{ см}^2/\text{сут}$ , что превышало показатели в группе сравнения (на 0.103 и 0.33  $\text{см}^2/\text{сут}$  соответственно). К 12-м суткам терапии у животных всех исследуемых групп корочка отторгалась и обнаруживался полноценный кожный покров (рис. 1).

На 2-4-е сутки терапии при микроскопическом исследовании кожи в месте дефекта гистологическая картина во всех группах была схожей: отмечался отек всех слоев дермы, воспалительная



**Рис. 1.** Внешний вид состояния раневых дефектов кожи мышей 1-й группы (без терапии; а), 2-й (группа сравнения; б) и 3-й (в).



**Рис. 2.** Динамика изменения площади раны при терапии традиционной и новой лекарственной формой в виде микрочастиц. 1-3 — 1-3-я группы.

клеточная инфильтрация, распространенный очаговый некроз всех слоев кожи, спазм мелких сосудов (рис. 3).

В 1-й группе (без терапии) на 8-е сутки выявлялись места отторжения струпа и нагноения, отсутствие верхних слоев кожи. С увеличением длительности наблюдения в этой группе отмечено незначительное снижение воспалительной инфильтрации (рис. 3, а). Морфологическая картина заживления раневых дефектов у животных 3-й группы и группы сравнения была иной: у многих животных отмечена эпителизация ран, в грануляционной ткани выявлено умеренное количество сосудов, отмечена диффузная и слабовыраженная инфильтрация грануляционной ткани (рис. 3). К концу наблюдения в этих группах кожа на месте дефекта приобретала здоровый вид (рис. 1, 2).

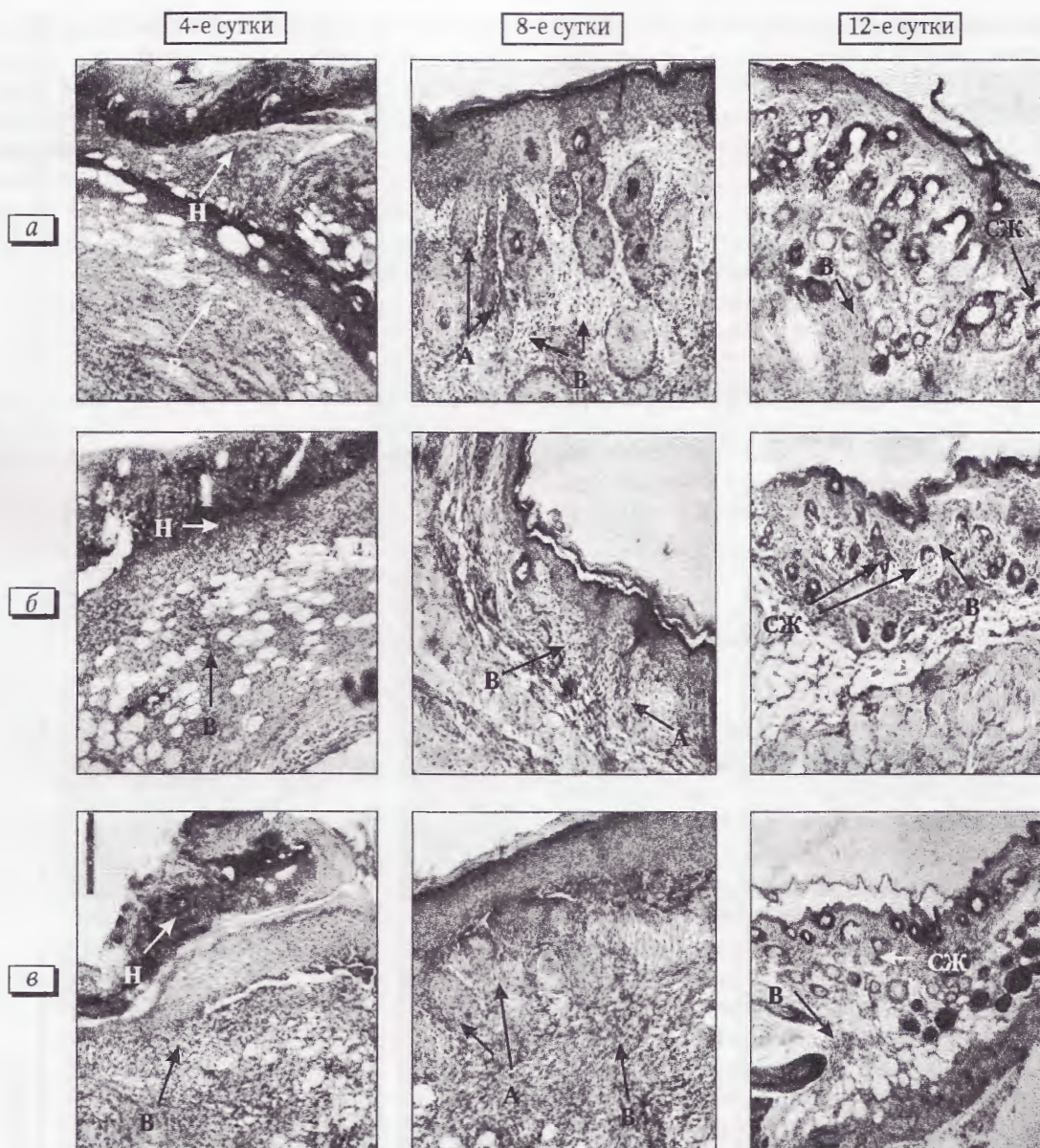
К концу эксперимента наблюдалась тенденция к снижению глубины воспаления в экспериментальной группе. В незначительной степени воспаление наблюдалось в группе сравнения, в то время как в группе, не получавшей терапию, глубина воспаления оставалась значительно высокой — 1740 мкм (табл. 1). Следует отметить, что отсутствие некроза к концу эксперимента отмечалось только в группе с применением форм препаратов, депонированных в микрочастицы; в группе без терапии и в группе сравнения кожа внешне имела здоровый вид, однако зафиксировались минимальные некротизированные участки в виде неуплотненной эпителиальной ткани.

Сальные железы и волосяные фолликулы являются источником недифференцированных эпителиальных клеток (аналогичны по строению

**Таблица 1.** Обширность некроза и средняя глубина распространения воспаления в ранах кожных покровов животных, получавших противовоспалительную терапию

Группа	Срок исследования					
	4-е сутки		8-е сутки		12-е сутки	
	некроз	воспаление	некроз	воспаление	некроз	воспаление
1-я (без терапии)	обширный (++++)	1712.6 мкм	умеренный (++)	2303.1 мкм	минимальный (+)	1740.6 мкм
2-я (группа сравнения)	обширный (++++)	1520.7 мкм	обширный (++++)	3081.8 мкм	умеренный (++)	700.8 мкм
3-я группа	обширный (++++)	2078.7 мкм	минимальный (+)	1427.6 мкм	—	467 мкм

**Примечание.** Здесь и в табл. 2: “—” — отсутствие признаков.



**Рис. 3.** Динамика ранозаживления у мышей 1-й группы (без терапии; *а*), 2-й (группа сравнения; *б*) и 3-й (*в*). А — акантоз, Н — зона некроза; В — зона воспалительной инфильтрации, СЖ — сальные железы. Окрашивание гематоксилином и эозином,  $\times 100$ .

клеткам базального слоя), которые могут участвовать в регенерации эпидермиса при обширных, неглубоких химических ожогах кожи. Более ранняя регенеративная активность кожных покровов отмечалась при терапии препаратами, депонированными в микрочастицы (табл. 2). На 8-е сутки в 3-й группе наблюдалось появление волосяных луковиц и сальных желез, в то время как в группе сравнения — только наличие роговых кист как показателя замедления дифференцировки клеток эпидерма (табл. 3).

Не менее важным показателем репаративного процесса кожи считается явление акантоза —

утолщение и увеличение количества рядов шиповатого и зернистого слоев с удлинением эпидермальных отростков, проникающих глубоко в собственно кожу. К 4-м суткам от начала терапии в 3-й группе по периферии был отмечен пролиферативный акантоз (12 тяжей с глубиной погружения 300 мкм), в группе сравнения признаков акантоза не обнаружено. На 8-е сутки терапии в 3-й группе увеличивались число тяжей до 18 и глубина погружения до 660 мкм (в группе сравнения — 4 тяжа и 312.5 мкм соответственно). К 12-м суткам в 3-й группе и в группе сравнения отмечались полная регенерация дефекта с исчезновением

**Таблица 2.** Количество волосяных фолликулов и сальных желез при терапии кожных дефектов свободными препаратами и включенными в полимерные микрочастицы

Группа	Срок исследования		
	4-е сутки	8-е сутки	12-е сутки
1-я (без терапии)	—	—	8 ВЛ, 4 СЖ, 8 РГ
2-я (группа сравнения)	—	8 РГ	22 ВЛ, 17 СЖ
3-я группа	—	5 ВЛ, 9 СЖ	20 ВЛ, 15 СЖ

*Примечание.* РГ — роговые кисты, ВЛ — волосяные луковицы, СЖ — сальные железы.

**Таблица 3.** Количество акантотических тяжей и средняя глубина их погружения в дерму при комбинированной терапии диклофенаком и дексаметазоном

Группа	Срок исследования		
	4-е сутки	8-е сутки	12-е сутки
1-я (без терапии)	—	7 тяжей, 295.6 мкм	16 тяжей, 324.7 мкм
2-я (группа сравнения)	—	4 тяжа, 312.5 мкм	акантоза нет
3-я группа	12 тяжей, 300.6 мкм	18 тяжей, 659.7 мкм	акантоза нет

акантоза и восстановление морфологического строения эпидермиса.

В целом действие свободных форм препаратов и депонированных в микрочастицы было сопоставимо, однако по ряду показателей (площадь ожоговой раны, скорость ранозаживления, количество акантотических тяжей, количество волосяных фолликулов, сальных желез и роговых кист) репаративные процессы в коже животных, получавших терапию в виде микрочастиц, были более выраженными. Следует отметить при этом, что традиционную терапию в виде мазевых аппликаций препаратов проводили в фазу лечения ежедневно в течение 11 сут, в то время как микрочастицы наносили 1 раз в 3 сут.

Полученные результаты позволяют положительно оценить полимерные микрочастицы из ПГА, нагруженные противовоспалительными препаратами, в качестве пролонгированной формы препаратов для восстановительной терапии кожных покровов.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования (Постановление Правительства РФ № 220; проект “Биотехнологии новых биоматериалов”), и Программы интеграционных исследований Президиума СО РАН (проект № 93).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Волова Т.Г., Шишацкая Е.И. Разрушаемые биополимеры: синтез, свойства, применение. Красноярск, 2011.
2. Пронина Е.А., Швиденко И.Г., Шуб Г.М. // Фундаментальные исследования. 2010. Т. 10, № 20. С. 80-87.
3. Рабен А.С., Алексеева О.Г., Дуева Л.А. Экспериментальный аллергический контактный дерматит. М., 1970.
4. Шишацкая Е.И. // Антибиотики и химиотерапия. 2005. Т. 50, № 8-9. С. 4-9.
5. Шишацкая Е.И., Горева А.В., Войнова О.Н. и др. // Бюл. экспер. биол. 2008. Т. 145, № 3. С. 333-336.
6. Шишацкая Е.И., Горева А.В., Кузьмина А.М. // Бюл. экспер. биол. 2012. Т. 154, № 12. С. 741-745.
7. Cassidy C., Peter S.D., Lacey S. et al. // Burns. 2005. Vol. 31, N 7. P. 890-893.
8. Eke G., Kuzmina A.M., Muzueva A.V. et al. // J. Sib. Fed. Univer. Biology. 2012. Vol. 5, N 4. P. 404-416.
9. Fraser J.F., Bodman J., Sturgess R. et al. // Burns. 2004. Vol. 30, N 1. P. 35-41.
10. Goreva A.V., Shishatskaya E.I., Volova T.G., Sinskey A.J. // Polymer Science. Series A. 2012. Vol. 54, N 2. P. 94-105.
11. Hirose K., Onishi H., Sasatsu M. et al. // Biol. Pharm. Bull. 2007. Vol. 30, N 12. P. 2406-2411.
12. Shishatskaya E.I., Goreva A.V., Kalancheva G.S., Volova T.G. // J. Sib. Fed. Univer. Biol. 2009. Vol. 2, N 4. P. 453-465.
13. Shishatskaya E., Goreva A., Volova O., Volova T. // J. Biotechnol. 2007. Vol. 131, N 2, Suppl. P. S50.
14. Shishatskaya E.I., Voinova O.N., Goreva A.V. et al. // J. Mat. Sci. Math. Med. 2008. Vol. 19, N 6. P. 2493-2502.