

# ДОКАЗАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕПАРАЦИИ ГЕЛЯ КОЛЛОСТ 7% В МОДЕЛИ ИШЕМИЗИРОВАННОЙ РАНЫ

**Данилова  
Светлана  
Витальевна**

к.м.н., врач-дерматолог, косметолог, физиотерапевт, медицинский советник  
ООО «Ниармедик фарма», клиника «Галактика», Москва



**К**ожа – это самый крупный орган человеческого тела, поэтому очевидно, что репарация повреждений кожи, кожных ран является критически важным биологическим процессом.

Лечение труднозаживающих ран и язв представляет значительную сложность, особенно при наличии у пациента сахарного диабета, хронической венозной или артериальной недостаточности, механического сдавливания мягких тканей на опорных поверхностях (пролежни) [25]. Следует отметить, что процессы восстановления поврежденных тканей существенно замедляются с возрастом.

Актуальным вопросом в эстетической медицине является ведение пациентов с послеоперационными ранами, повреждениями кожи после удаления новообразований.

Заживление кожных ран – сложный комплекс клеточных и биохимических процессов, направленных на восстановление целостности кожных покровов. Ключевыми медиаторами процесса репарации являются цитокины и факторы роста.

## Краткое описание процесса заживления ран

Процесс заживления условно разделяют на три перекрывающиеся во времени стадии: 1) воспаления, 2) регенерации и пролиферации, 3) эпителизации и реорганизации рубца [15].

При повреждении тканей или по достижении гемостаза в случае кровотечения из раны из поврежденных тканей и тромбоцитов выделяются vasoактивные вещества и хемоаттрактанты, в том числе тромбоцитарный фактор роста, привлекающие в рану лейкоциты. Нейтрофилы очищают рану от инородных частиц и бактерий, после чего они удаляются из раны вместе с формирующимся струпом или подвергаются фагоцитозу макрофагами. Макрофаги играют ключевую роль в переходе от воспаления к восстановлению тканей, опосредованную продуцируемыми ими цитокинами.

Хемоаттрактанты, такие как фрагменты белков внеклеточного матрикса, трансформирующий фактор роста бета, моноцитарный хемоаттрактантный белок, привлекают в рану моноциты, которые при контакте с внеклеточным матриксом трансформируются в активированные макрофаги и высвобождают тромбоцитарный фактор роста, фактор роста эндотелия сосудов и колониестимулирующий фактор. Колониестимулирующий фактор обеспечивает выживание моноцитов и макрофагов. Тромбоцитарный фактор роста является митогеном и хемоаттрактантом для фибробластов, эндотелиальный фактор роста – ключевым регулятором ангиогенеза. Эти два ростовых фактора инициируют формирование грануляций ткани. Другими важными факторами роста и цитокинами на данном этапе заживления ран являются трансформирующие факторы

роста альфа и бета, фактор некроза опухолей альфа и интерлейкин 1, а также инсулиноподобный фактор роста 1.

Процесс эпителизации раны начинается уже через несколько часов после повреждения. Эпителиоциты претерпевают перестройку цитоскелета, в цитоплазме образуются актиновые тяжи, необходимые для подвижности клеток и их миграции, деградация коллагена и других белков межклеточного матрикса под действием металлопротеиназ, в том числе металлопротеиназы I, и других протеолитических ферментов. За ростом эпидермиса следует образование базальной мембраны, которое завершает процесс реэпителизации [15].

Грануляционная ткань представляет собой богатую кровеносными сосудами новообразованную строму, которая начинает заполнять рану приблизительно через четыре дня после повреждения ткани. Молекулы фибрина, фибронектина и гиалуроновой кислоты представляют собой матрицу для миграции в рану фибробластов. После миграции в рану фибробласты синтезируют коллаген, составляющий основу рубцовой ткани. После образования плотного коллагенового матрикса клетки подвергаются апоптозу [15].

Неоваскулогенез стимулируется эндотелиальным фактором роста, трансформирующим ростовым фактором бета и рядом других цитокинов, продуцируемых макрофагами, эндотелиоцитами, а также активированными эпителиоцитами раны в условиях гипоксии. После формирования грануляционной ткани большая часть новообразованных сосудов погибает, причем этот процесс активно регулируется тромбоспондинами, ангиостатином, эндостатином [15].

Контракция раны происходит на поздних этапах ранозаживления.

Важными ее элементами является трансформация фибробластов в миофибробласты, включающая образование в цитоплазме актина, особенно в местах межклеточных контактов, и прикрепления к матриксу. Контракция раны требует перестройки коллагенового матрикса: его разрушения под действием различных металлопротеаз, синтеза новых коллагеновых волокон и образования швов между пучками коллагена [15].

## Подходы к исследованиям эффективности различных ранозаживляющих средств в моделях на животных

Исследование ранозаживления в моделях на животных затруднено особенностями строения их кожи, в частности, рыхлостью ее соединения с подлежащими тканями, наличием выраженного мышечного слоя, многократно ускоряющего контракцию раны, а также высокой скоростью всех метаболических и репаративных процессов. Поэтому разработан ряд моделей ранозаживления на грызунах, где создание кожного дефекта дополняют воздействием дополнительных факторов, замедляющих заживление [1]. Одним из вариантов труднозаживающих ран у грызунов, в том числе крыс, является модель ишемизированной полнослойной раны кожи. В этой модели на спине животного формируют продольный лоскут кожи, питание которого происходит через узкие «ножки». Собственно дефект кожи создают в средней ишемизированной части лоскута. Данная модель широко используется при проведении доклинических исследований эффективности различных ранозаживляющих средств и медицинских изделий [8].

## Лечение труднозаживающих ран и язв с использованием коллагена

Одно из перспективных направлений в лечении труднозаживающих ран и язв – использование медицинских изделий на основе коллагена [26, 27].

Коллаген I типа является одним из наиболее распространенных структурных элементов в большинстве тканей, внеклеточным матриксным белком, в контакте с которым происходит рост и развитие клеток. Перестройка внеклеточного матрикса – один из ключевых элементов ранозаживления, в значительной степени определяющий течение этого процесса. В связи с этим уже длительное время широкий спектр

медицинских изделий на основе коллагена в виде повязок, покрытий, имплантатов, гелей успешно используется в медицинской практике [2, 6, 19]. Коллагеновые материалы также активно применяются при различных процедурах восстановления ткани. К их существенным достоинствам следует отнести крайне низкую токсичность и иммуногенность, а также их высокую эластичность, сходную с неповрежденной тканью.

По степени сохранности структуры коллагена выделяют нативный и фракционированный коллаген. В процессе изготовления биоматериалов из нативного коллагена полностью сохраняется его естественная волокнистая структура, а клеточные элементы, участки кровеносных сосудов и волосные фолликулы, напротив, удаляются, за счет чего достигается низкая антигенность изделий. В отличие от фракционированного коллагена нативный коллаген устойчив к воздействию раневой среды и дольше остается в раневом ложе [20]. Рассасываясь в процессе заживления, он замещается собственной тканью организма.

Препараты нативного коллагена стимулируют регенерацию тканей. Нативный коллаген служит матрицей для направленной миграции макрофагов и фибробластов в раневое ложе, активирует хемотаксис, пролиферацию и секреторную активность клеточных элементов. В экспериментах *in vitro* нативный коллаген способствовал ускорению образования межклеточного матрикса дермальными фибробластами. На матрице из нативного коллагена фибробласты демонстрируют экспоненциальный рост, тогда как на препарате фракционированного коллагена скорость пролиферации клеток значительно ниже. Одним из возможных механизмов стимулирующего действия коллагена является его способность связывать и тем самым защищать от разрушения ферменты и физиологически активные вещества, вовлеченные в процесс ранозаживления: эластазу нейтрофилов, матриксную металлопротеазу-2, интерлейкины-6, -8 и -1, супероксид-анион, пероксинитрат [19]. При исследовании эндотелиальных клеток микрососудов дермы он вызывал активацию ангиогенеза [2, 20].

Примером медицинского изделия на основе нативного коллагена I типа является препарат Коллост®. С использованием модели неосложненных полнослойных ран кожи у крыс было показано усиление процессов регенерации при заживлении под различными формами данного изделия. Наиболее выраженная стимуляция эпителизации раневых дефектов наблюдалась при применении гелевой формы биоматериала [22].

С целью получения более расширенных данных ранозаживляющего действия медицинского изделия Коллост® гель (ООО «БиоФАРМХОЛДИНГ», Россия) на клеточном, молекулярном уровнях в модели труднозаживающих ран кожи у крыс было проведено исследование в испытательном центре «Виварно-экспериментальный комплекс ООО «НИИ Митоинженерии МГУ» (ИЦ ВЭК).

## Материалы и методы

Для решения задач исследования была использована модель ишемизированных полнослойных ран кожи у крыс. Динамику ранозаживления оценивали в сравнении с изделием сравнения (Comfeel Plus, (Colorpast, Дания).

С целью исследования механизмов действия биоматериала Коллост® проводили оценку количества макрофагов, миофибробластов и новообразованных сосудов в ране, используя

### ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

- actn1** – альфа актин
- CD163** – рецептор комплекса гемоглобин-гаптоглобин, маркер макрофагов/моноцитов
- CD31** – гликопротеин межклеточных контактов эндотелиальных клеток
- col1a2 α2** – цепь коллагена типа I
- col3a1 α1** – цепь коллагена типа III
- il-1b** – интерлейкин 1 бета
- mmp1** – матриксная металлопротеиназа 1
- pdgf** – тромбоцитарный фактор роста
- tgfb1** – трансформирующий фактор роста бета
- tnf** – фактор некроза опухолей
- vegf** – эндотелиальный фактор роста

иммуногистохимические методы для визуализации клеток. Оценку количества регуляторных факторов и цитокинов, структурных белков матрикса, а также металлопротеиназ, вовлеченных в перестройку матрикса, проводили по уровню их экспрессии клетками ткани раны.

#### Задачи исследования:

1) оценить ранозаживляющие свойства медицинского изделия Коллост® гель 7% с использованием модели ишемизированных полнослойных ран кожи у крыс;

2) оценить влияние медицинского изделия Коллост® гель 7% на васкуляризацию, число M2a макрофагов и миофибробластов в ишемизированных ранах кожи с использованием иммуногистохимических методов;

3) оценить экспрессию генов *tnf*, *pdgf*, *il1b*, *tgfb1*, *col1a2*, *col3a1*, *vegf*, *actn1*, *mmp1* в тканях ишемизированных полнослойных ран крыс, получавших Коллост® гель.

### СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА

Задачи исследования решали в одном эксперименте на самцах аутбредных крыс. Животным формировали ишемизированный (за счет ограничивающей питание имплантированной силиконовой пластины) лоскут кожи спины шириной 3 см и создавали на нем две полнослойные раны диаметром 6 мм.

Животным опытной группы (КОЛЛ) после формирования ран однократно внутривенно (в края раны) и местно (в просвет раны) наносили исследуемое медицинское изделие – Коллост® гель 7%.

Животным группы сравнения (СИ) в просвет раны помещали медицинское изделие сравнения (табл.) [5].

Крыс выводили из эксперимента через 3, 7 и 14 дней после создания дефекта (по 12 особей на временную точку) и собирали образцы тканей ран для гистологического и молекулярно-биологического исследований.

В рамках гистологического исследования образцы исследовали стандартными гистологическими методами

Таблица. Схема основного эксперимента

Группа	Кол-во особей	Лечение ран	Сбор образцов	Регистрируемые показатели
СИ	36	Стандартное медицинское изделие – гидроколлоидная повязка Comfeel Plus, однократно при формировании дефекта	3, 7 и 14 дней после создания дефекта, по 12 особей на временную точку	1) фотопланметрическая прижизненная регистрация площади ран <sup>1</sup> ; 2) гистологическое исследование ран: эпителизация, образование грануляционной/рубцовой ткани, выраженность воспаления <sup>2</sup> ; 3) количество макрофагов (CD163), миофибробластов (гладкомышечный актин) и сосудов (CD31) <sup>3</sup> ; 4) экспрессия факторов роста, цитокинов и маркеров ранозаживления ( <i>tnf</i> , <i>pdgf</i> , <i>il1b</i> , <i>tgfb1</i> , <i>col1a2</i> , <i>col3a1</i> , <i>vegf</i> , <i>actn1</i> , <i>mmp1</i> ) <sup>3</sup>
КОЛЛ	36	Коллост® гель 7% однократно внутри- и наружно при создании дефекта		

1 – проводится только у животных, предназначенных для эвтаназии через 14 суток после создания дефекта;  
2 – проводится на всех образцах (от 36 особей на группу);  
3 – проводится на половине образцов (от 18 особей на группу, по 6 образцов на временную точку).

для определения морфометрических показателей, характеризующих ранозаживление (эпителизации, формирования грануляционной и рубцовой тканей, инфильтрации нейтрофилами и т.п.), а также с использованием иммуногистохимических методов, проводили оценку количества миофибробластов, макрофагов и сосудов в тканях раны.

Ткани второй раны использовали для определения уровня экспрессии *tnf*, *pdgf*, *il1b*, *tgfb1*, *col1a2*, *col3a1*, *vegfa*, *actn1*, *mmp1* молекулярно-биологическими методами. Из организационно-методических соображений исследование было разбито на два равных блока, в которых были равномерно представлены животные всех групп и временных точек. «Блоки» эксперимента выполняли последовательно, анализ образцов – совместно от двух реплик эксперимента. Образцы для иммуногистохимического и молекулярно-биологического исследований (половина особей из каждой группы) выбирали с использованием электронного алгоритма рандомизации.

До начала основного эксперимента был проведен пилотный эксперимент с использованием небольшого числа особей, в рамках которого была апробирована новая модификация модели ишемизированных ран кожи и собран биологический материал для отработки иммуногистохимических и молекулярно-биологических методов. В пилотном эксперименте раны крыс оставляли нелечеными, их заживление проходило спонтанно под повязкой.

## МАТЕРИАЛЫ

Объектом испытания является медицинское изделие Коллост® гель 7% (серия № 013) – материал коллагеновый рассасывающийся (ООО «БиоФАРМАХОЛДИНГ», Россия). Медицинское изделие содержит не менее 7% коллагена нативного нереконструированного в 10% стерильном растворе глюкозы. Представляет собой вязкую, бесцветную или слегка желтоватую взвесь. Это стерильный апиrogenный гель для инъекций в предварительно заполненных шприцах, готовых к применению. Медицинское изделие хранили в сухом, защищенном от света месте при температуре 5–25°C. Вскрытые упаковки хранению не подлежали. Гель Коллост® применяли однократно

местно, а также внутрикожно, что соответствует способу применения препарата в медицинской практике.

**Стандартный объект.** В качестве стандартного объекта сравнения использован Comfeel Plus лот № 6014667 (Coloplast, Дания). Прозрачная гидроколлоидная повязка Comfeel Plus состоит из влагоабсорбирующих частиц натрий карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), помещенных в синтетическую эластичную клейкую массу. Полупроницаемая наружная пленка изготовлена из полиуретана. Хранение – при 20–25°C в сухом и темном месте. Из повязок Comfeel Plus формировали кружки диаметром 6 мм и помещали их в раны.

## БИОЭТИЧЕСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА

Протокол исследования был одобрен комиссией по биоэтике ООО «НИИ Митоинженерии МГУ», о чем был составлен протокол № 115 от 31.05.2018. В работе использовано 130 самцов крыс аутбредного стока SD массой 300–350 г, из них для пилотного эксперимента – 10 особей (включая одну резервную); для основного эксперимента – 84 особи (включая 12 резервных).

В качестве объекта исследования использовали крыс, поскольку именно для данного вида животных разработана модель ишемизированных ран, и, кроме того, использование крыс рекомендовано для исследования ранозаживляющих свойств препаратов в работе [20].

## НАНЕСЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ

Объект испытания и стандартный объект наносили однократно, непосредственно после создания дефекта. Объект испытания, Коллост® гель 7%, вводили внутрикожно в края раны (4–5 уколов) при помощи инъекционных шприцев с иглами G29–30, а также местно, заполняя гелем просвет раны из расчета 0,2 мл геля на рану. В соответствии с указаниями инструкции Коллост® гель 7% перед процедурой разогревали в водяной бане до температуры 37±1°C, но не выше 40°C.

Стандартный объект, Comfeel Plus, формировали в кружки диаметром 6 мм и вкладывали в просвет ран. После формирования дефекта на кожу вокруг раны наносили мастиковый стандартный клей (Kryolan, Германия) для

обеспечения фиксации адгезивной повязки и накладывали собственно повязку Hydrofilm (Hartmann, США). Поверх повязки Hydrofilm наносили фиксирующую повязку «Бинтли» (ООО «ГК Пальма», Россия), препятствовавшую повреждению пленки и расчесыванию ран.

## Методы исследования:

- 1) фотопланметрическая регистрация площади ран;
- 2) стандартное гистологическое исследование;
- 3) иммуногистохимическое исследование;
- 4) молекулярно-биологическое исследование;
- 5) экстракция РНК и обратная транскрипция;
- 6) оценка экспрессии методом ПЦР в реальном времени.

## АНАЛИЗ ДАННЫХ

Для первичного анализа данные табулировали и рассчитывали показатели описательной статистики: среднее (*m*), стандартное отклонение (*sd*), стандартная ошибка среднего (*sem*).

Статистический анализ данных проводили с использованием двухфакторного (факторы «Группа» и «Срок») дисперсионного анализа для повторных (масса тела, площадь ран) или несвязанных измерений (данные гистологического, иммуногистохимического и молекулярно-биологического исследований) с последующими попарными сравнениями по Даннету или Тьюки.

В случае если данные не удовлетворяли критериям нормальности и гомоскедастичности, использовали преобразование в логарифмы, что позволило достичь выполнения критериев. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

Для анализа данных использовали программное обеспечение Excel (Microsoft, США) и Prism (Graph Pad, США).

## Результаты

### ФОТОПЛАНИМЕТРИЧЕСКАЯ РЕГИСТРАЦИЯ ПЛОЩАДИ РАН

Для оценки динамики заживления ран у крыс, предназначенных для эвтаназии, через 14 сут. после создания дефекта

регистрировали площадь ран методом фотопланиметрии. Раны фотографировали каждый второй день после создания дефекта. Анализ изображений проводили с использованием программного обеспечения ImageJ (NIH, США).

У крыс, получавших медицинское изделие сравнения, площадь ран за время эксперимента изменялась мало, а с 4 по 12 сут. после операции даже несколько превышала исходную. Площадь ран у крыс группы КОЛЛ за две недели наблюдения постепенно снижалась, и к 14-му дню наблюдения сокращение площади ран составило  $64,9 \pm 2,4\%$  от исходной. Снижение площади ран наблюдали со второго дня после операции. На протяжении практически всего периода наблюдения площадь ран у крыс, получавших Коллост® гель 7%, была меньше, чем у контрольных особей.

### ДАнные ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

В рамках гистологического исследования оценивали эпителизацию. Ее рассчитывали как долю поверхности раны, закрытую эпителием, от общей длины раны на срезе и выражали в процентах. Как показано на рис. 1, эпителизация ран крыс группы КОЛЛ прогрессивно возрастала за 14 сут. наблюдения и к окончанию эксперимента была практически полной. У животных, которым

наносили медицинское изделие сравнения (СИ), эпителизация была на седьмые сутки приблизительно вдвое, а на 14-е – втрое меньше, чем у животных, получавших гель Коллост®.

Площадь грануляционной и сменяющей ее на поздних сроках заживления рубцовой ткани, как показано на рис. 2, у крыс, получавших Коллост® гель 7%, была существенно выше, чем у животных группы СИ. Наиболее выраженные различия наблюдали на третьи сутки после создания дефекта кожи, к седьмым суткам после операции площадь грануляционной/рубцовой ткани

возрастала, после чего практически не изменялась.

Грануляционная ткань в ранах крыс группы СИ практически отсутствовала, после чего площадь грануляционной/рубцовой ткани существенно возрастала к седьмым суткам после операции и менее выражено на 14-е сутки по сравнению с седьмыми.

Выраженность инфильтрации тканей раны нейтрофилами у крыс, получавших Коллост® гель 7%, была наибольшей на третий и седьмой дни после создания дефекта кожи, а к 14-му дню после операции снижалась

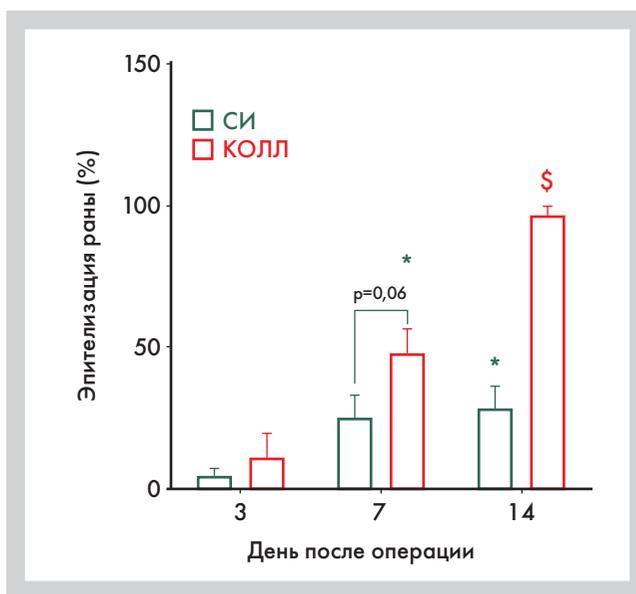


Рис. 1. Эпителизация ран крыс экспериментальных групп через 3, 7 и 14 сут. после операции, по данным гистологического исследования

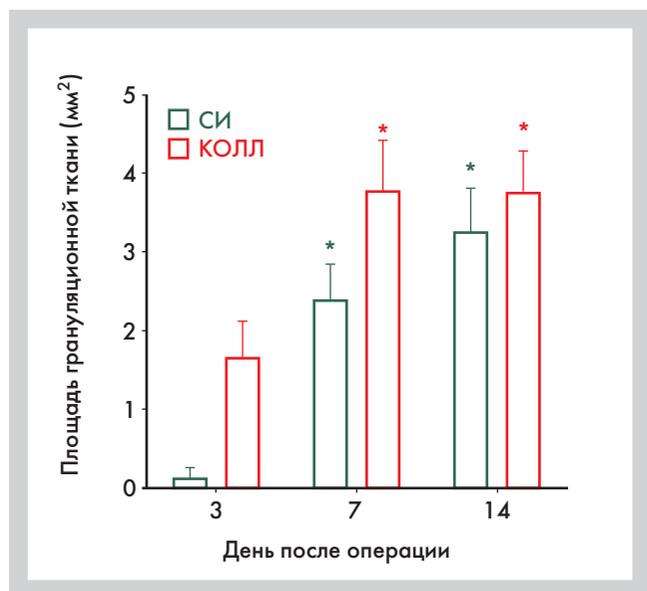


Рис. 2. Площадь грануляционной ткани в ранах крыс экспериментальных групп через 3, 7 и 14 сут. после операции, по данным гистологического исследования

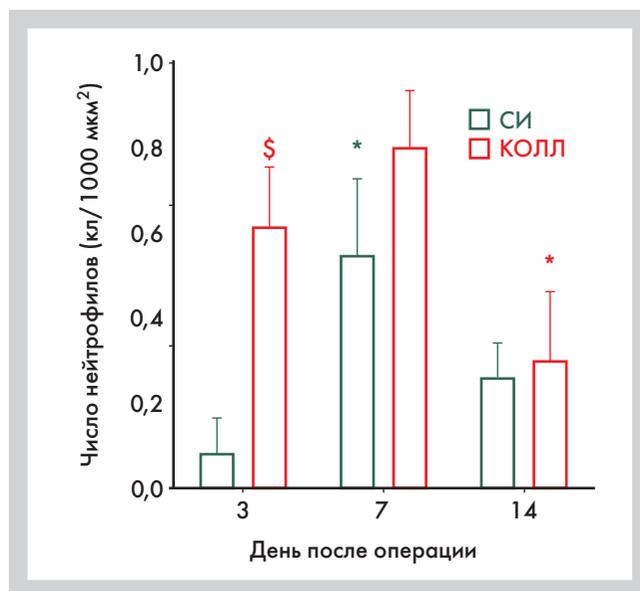


Рис. 3. Выраженность нейтрофильной инфильтрации тканей раны у крыс экспериментальных групп через 3, 7 и 14 сут. после операции, по данным гистологического исследования

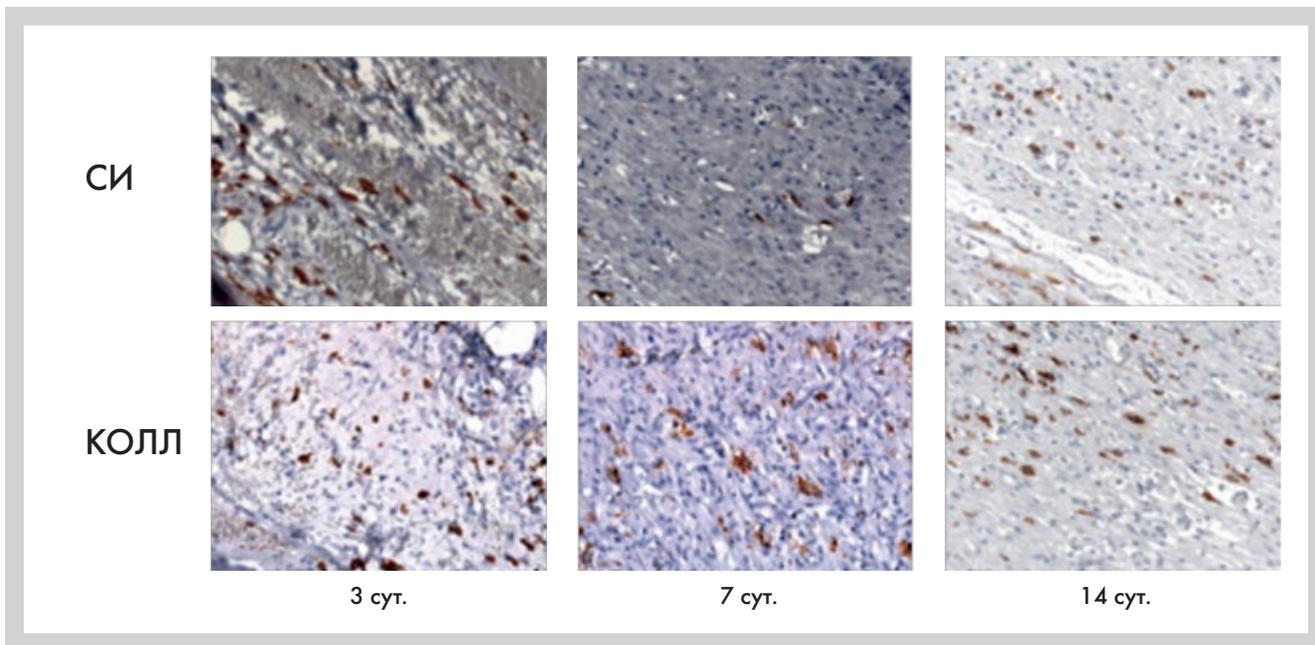


Рис. 4. Микрофотографии срезов тканей ран крыс экспериментальных групп через 3, 7 и 14 сут. после операции, окрашенные антителами к CD163

приблизительно вдвое. Инфильтрация тканей раны крыс, получавших медицинское изделие сравнения, на третьи сутки после операции была существенно ниже, чем у животных опытной группы, что обусловлено отсутствием тканей раны на этом сроке репарационного процесса. На седьмые и 14-е сутки заживления данный показатель у крыс контрольной и опытных групп был сходным.

«Повышенная» инфильтрация тканей раны нейтрофилами у крыс группы КОЛЛ отражает не более выраженное воспаление у этих животных, а, напротив, нормальное течение репарационного процесса, поскольку у животных группы СИ на данном сроке грануляционная ткань / эпителий в просвете раны практически отсутствовали, а вместе с ними – и нейтрофильная инфильтрация (рис. 3).

#### ДАННЫЕ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

В рамках иммуногистохимического исследования в тканях ран крыс были визуализированы и подсчитаны M2-макрофаги (CD163-положительные клетки), миофибробласты (клетки сходной с фибробластами морфологии и содержащие альфа-актин), эндотелиоциты (CD31-положительные клетки) для подсчета площади сосудов,

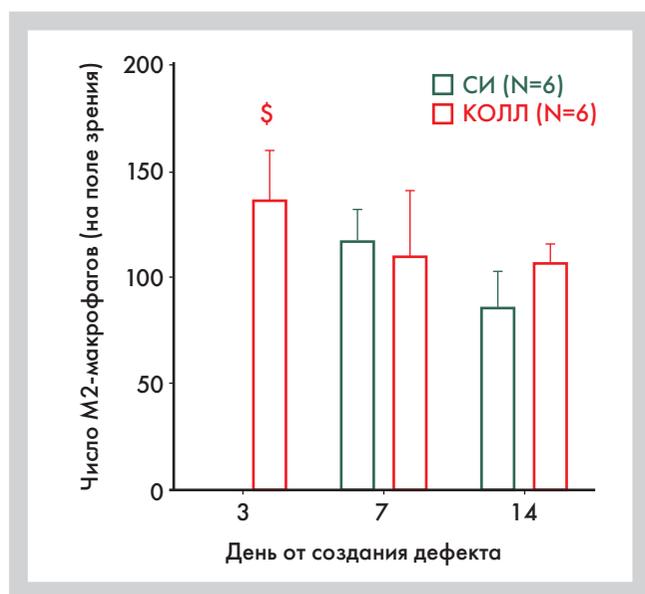


Рис. 5. Число CD163+ M2-макрофагов в тканях ран крыс экспериментальных групп через 3, 7 и 14 сут. после операции, по данным иммуногистохимического исследования

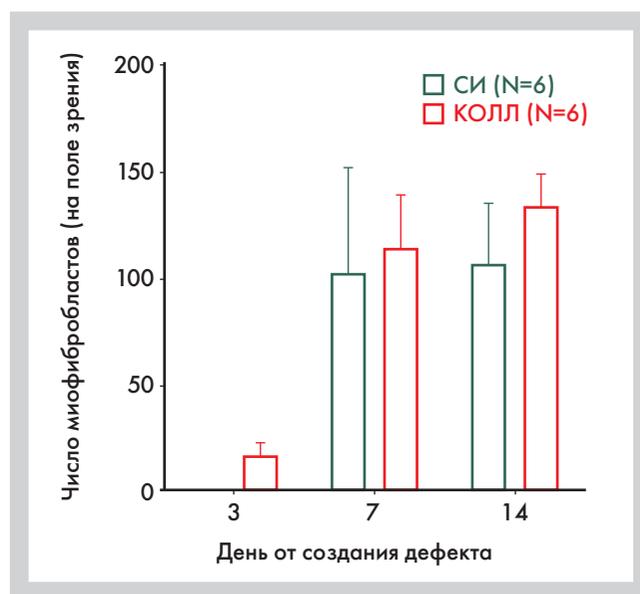


Рис. 6. Число миофибробластов (окрашивание к альфа-актину) в тканях ран крыс экспериментальных групп через 3, 7 и 14 сут. после операции, по данным иммуногистохимического исследования

и, кроме того, на окрашенных антителами к альфа-актину срезах была подсчитана площадь «зрелых» кровеносных сосудов, в стенке которых обнаружился актин.

На рис. 4 показаны типичные микрофотографии гистологических срезов тканей ран крыс экспериментальных групп с окрашенными CD163-положительными клетками, а на рис. 5 – результаты подсчета количества CD163-положительных M2-макрофагов. На третий день после создания дефекта число M2-макрофагов у крыс, получавших исследуемое изделие Коллост® гель 7%, значительно превышало число этих клеток у животных контрольной группы, у которых применяли медицинское изделие сравнения: в этой группе M2-макрофаги отсутствовали.

**Миофибробласты.** Гладкомышечный актин – маркер, позволяющий визуализировать содержащие этот сократительный белок клетки, в частности миофибробласты. Миофибробласты, практически отсутствовавшие в тканях ран крыс через 3 дня после создания дефекта, к 7-м сут. обнаруживались в значительных количествах, к 14-м сут. их число не изменялось. Различия между группами отсутствовали вне зависимости от длительности заживления ран (рис. 6).

**CD31-маркер эндотелия сосудов.** На срезах с визуализированным CD31 подсчитывали среднюю и суммарную (на поле зрения) площадь поперечных срезов сосудов. У крыс группы сравнения грануляционная ткань и соответственно сосуды на третьи сутки после создания дефекта отсутствовали. Сосуды в тканях раны крыс контрольной группы СИ появлялись на седьмые сутки после операции, к 14-м суткам их средняя площадь несколько увеличивалась, а суммарная – не изменялась по сравнению с седьмыми сутками после операции.

У животных, получавших Коллост® гель 7%, грануляционная ткань была васкуляризирована уже на третьи сутки после создания дефекта кожи. По мере увеличения времени после операции средняя и суммарная площади сосудов у крыс группы КОЛЛ постепенно снижались, что отражает деградацию «избыточно» образовавшихся на ранних этапах репарации сосудов, что соответствует нормальному ходу репаративного процесса (рис. 7).

*Таким образом, формирование сосудов в ранах крыс группы КОЛЛ происходило с существенным опережением по сравнению с ранами крыс, получавших медицинское изделие сравнения*

**Площадь «зрелых» сосудов.** По мере созревания сосудов однослойная эндотелиальная выстилка приобретает внешние мышечные и соединительнотканые слои, а окрашивание на актин позволяет оценить площадь более зрелых сосудов (рис. 8). Средняя площадь зрелых сосудов была ожидаемократно больше, а суммарная площадь зрелых сосудов – меньше площади сосудов, оцененной по окрашиванию на CD31. Взаимоотношения между группами подчинялись тем же закономерностям (рис. 9).

**ДАнные МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ТКАНЕЙ РАН**

Для оценки молекулярных механизмов ранозаживления при использовании исследуемого медицинского изделия Коллост® гель 7% методом ПЦР в реальном времени была проанализирована экспрессия цитокинов и факторов роста в тканях ран на разных сроках после операции.

- 1) Экспрессия гена провоспалительного TNFα у крыс экспериментальных групп не различалась.
- 2) Экспрессия гена провоспалительного цитокина, интерлейкина 1 бета была в целом снижена у крыс, получавших Коллост® гель 7%. Наиболее выраженные отличия наблюдались на третий

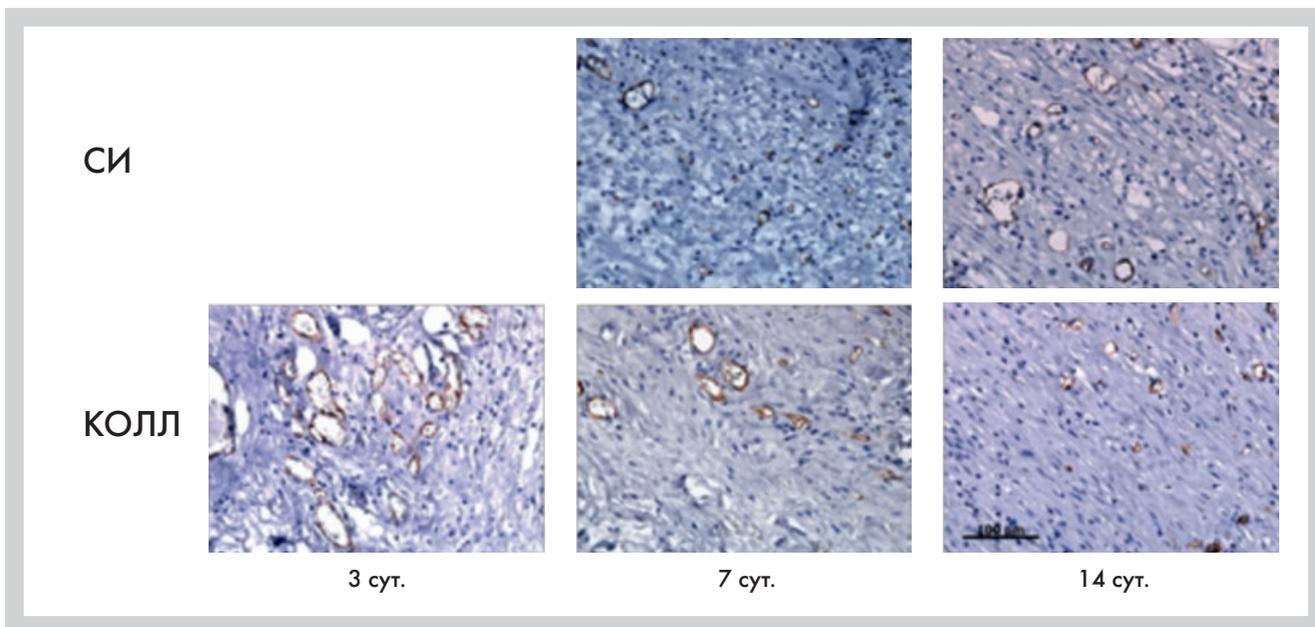


Рис. 7. Микрофотографии срезов тканей ран крыс экспериментальных групп через 3, 7 и 14 сут. после операции, окрашенные антителами к маркеру эндотелия сосудов CD31

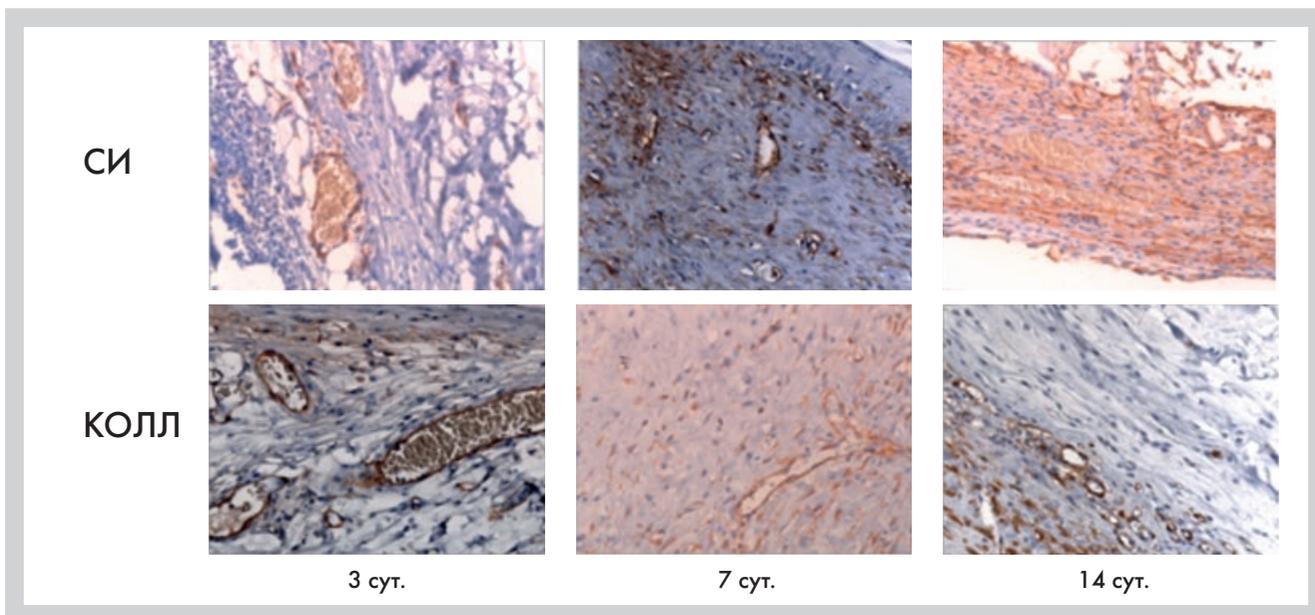


Рис. 8. Микрофотографии срезов тканей ран крыс экспериментальных групп через 3, 7 и 14 сут. после операции, окрашенные антителами к гладкомышечному актину

и 14-й дни после операции, однако при попарном сравнении групп на этих временных точках различия не достигали уровня статистической значимости.

3) Экспрессия гена коллагена первого типа (рис. 10) была в целом сходной у крыс экспериментальных групп. Экспрессия закономерно возрастала на 7-е и 14-е сутки эксперимента по

сравнению с третьими сутками репаративного процесса. Обращает на себя внимание несколько меньшая (хотя и не значимо) экспрессия гена этого белка межклеточного матрикса на 14-е сутки у крыс группы КОЛЛ, что может обуславливать меньшую выраженность рубцевания в процессе репарации при использовании изделия Коллост® гель.

4) Экспрессия гена ключевого фермента, опосредующего перестройку клеточного матрикса, металлопротеиназы 1, была наибольшей на третий день от создания дефекта кожи, после чего снижалась. По сравнению с крысами контрольной группы СИ экспрессия гена металлопротеиназы 1 у животных, на раны которых наносили Коллост®

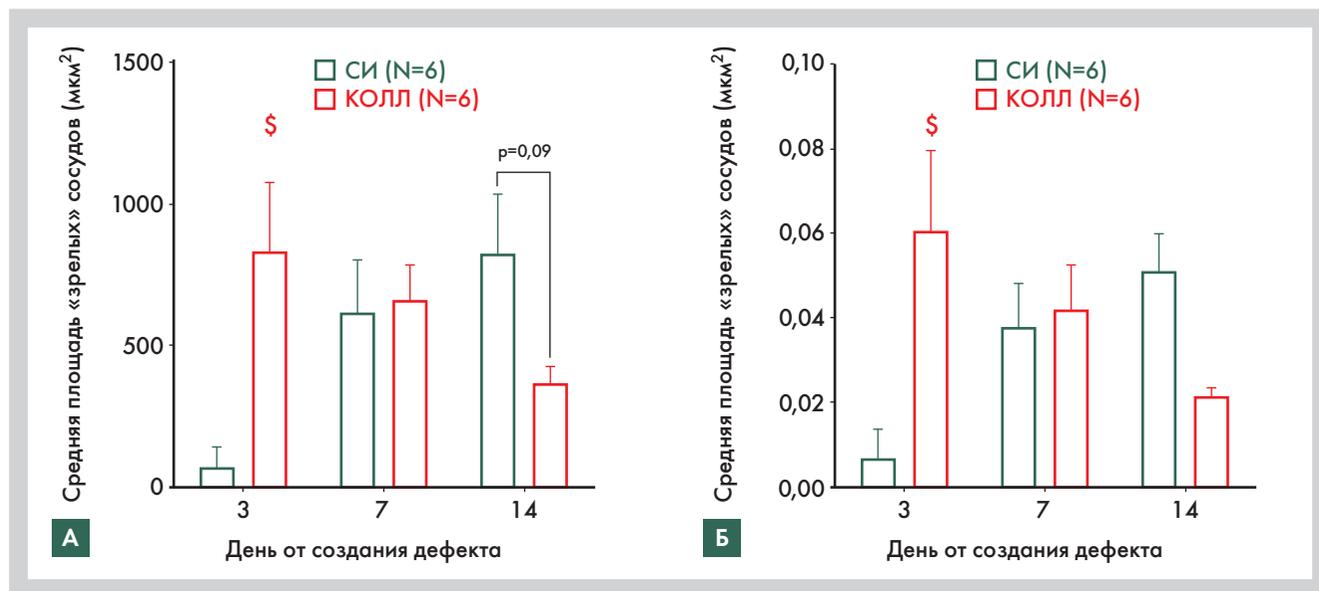


Рис. 9. Площадь «зрелых» сосудов (обладающих окрашивающейся антителами к актину гладкомышечной выстилкой) в грануляционной ткани ран крыс экспериментальных групп через 3, 7 и 14 сут. после операции, по данным иммуногистохимического исследования. Статистика: средняя площадь «зрелых» сосудов: взаимодействие «группа×срок» –  $F(2, 30)=11.11$ ,  $p=0.0002$ ; срок –  $F(2, 30)=2.10$ ,  $p=0.1398$ ; группа –  $F(1, 30)=2.34$ ,  $p=0.1363$  (А); суммарная площадь «зрелых» сосудов: взаимодействие «группа×срок» –  $F(2, 30)=7.64$ ,  $p=0.0021$ ; срок –  $F(2, 30)=1.54$ ,  $p=0.2318$ ; группа –  $F(1, 30)=1.14$ ,  $p=0.2951$  (Б). Статистической обработке подвергали преобразованные в ранги данные. \$ –  $p < 0.05$  по отношению к СИ, тест Сидака

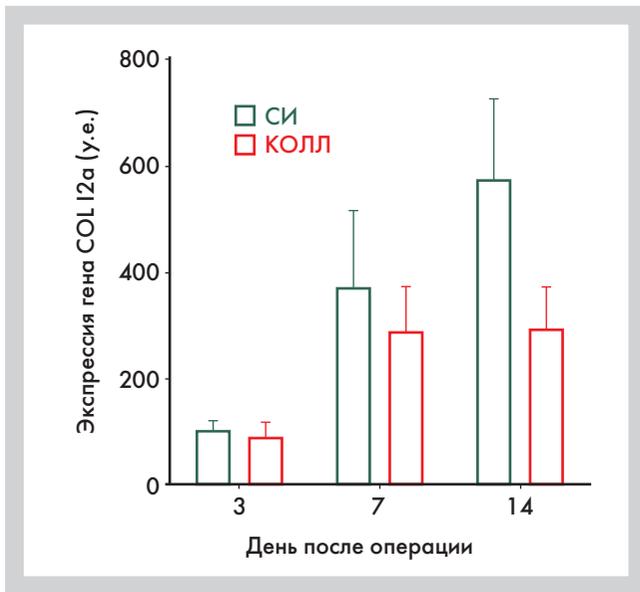


Рис. 10. Экспрессия гена коллагена первого типа в ранах крыс экспериментальных групп через 3, 7 и 14 сут. после операции

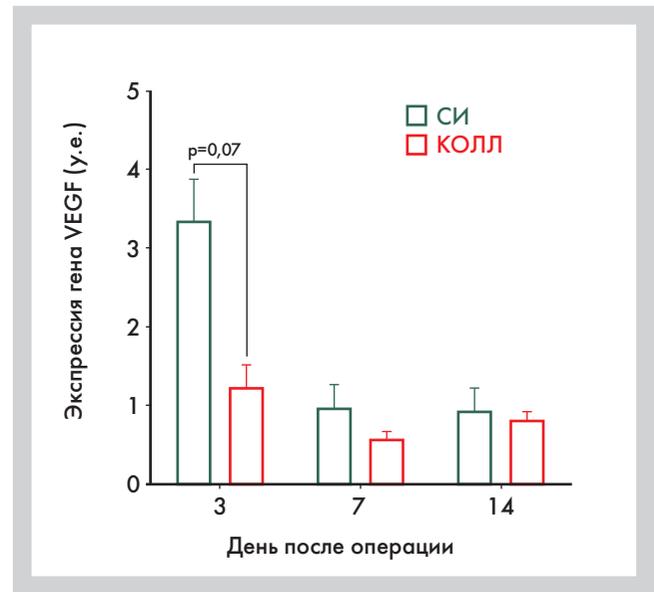


Рис. 11. Экспрессия гена фактора роста эндотелия сосудов в тканях ран крыс экспериментальных групп через 3, 7 и 14 сут. после операции

гель 7%, была в целом снижена. При парном сравнении групп на отдельных временных точках различия не достигли уровня статистической значимости.

5) Экспрессия гена фактора роста эндотелия сосудов (рис. 11) была наибольшей на третьи сутки репарации дефекта кожи и снижалась к 7-м суткам. В этот период репарационного процесса экспрессия гена VEGF у крыс, получавших исследуемое медицинское изделие Коллост® гель, была значимо меньше, чем у крыс группы СИ.

*Эти данные свидетельствуют об ускорении и изменении характера ранозаживления при применении Коллост® гель 7%, поскольку интенсивный васкулогенез характерен для ранних этапов ранозаживления, а избыточное образование сосудов может обуславливать физиологические косметические недостатки новообразованной ткани. Применение биоматериала Коллост® гель 7% оказывает оптимизирующее действие на процесс образования сосудов и тем самым обеспечивает физиологическую перестройку экстрацеллюлярного матрикса*

6) Экспрессия гладкомышечного актина (рис. 12) была наибольшей на 7-е сутки репарации. В этот период у крыс группы КОЛЛ, на которых применяли

исследуемое медицинское изделие, экспрессия гладкомышечного актина была значимо ниже, чем у крыс пилотной группы и СИ.

*Снижение экспрессии гладкомышечного актина является еще одним свидетельством изменения хода репарационных процессов при использовании медицинского изделия Коллост® гель 7% и может отражать снижение образования миофибробластов или созревания новообразованных сосудов*

7) Экспрессия трансформирующего фактора роста (рис. 13) у крыс экспериментальных групп была в целом равномерной во времени. У животных группы КОЛЛ, получавших исследуемое медицинское изделие, уровень экспрессии этого белка был статистически значимо меньше, чем у нелеченых крыс на 7-й день репарации. TGF-β1 участвует в репарационных процессах от начала воспалительной реакции до прекращения воспалительных явлений. Также известно, что TGF-β1 ингибирует созревание и активацию макрофагов – эти данные согласуются со статистически

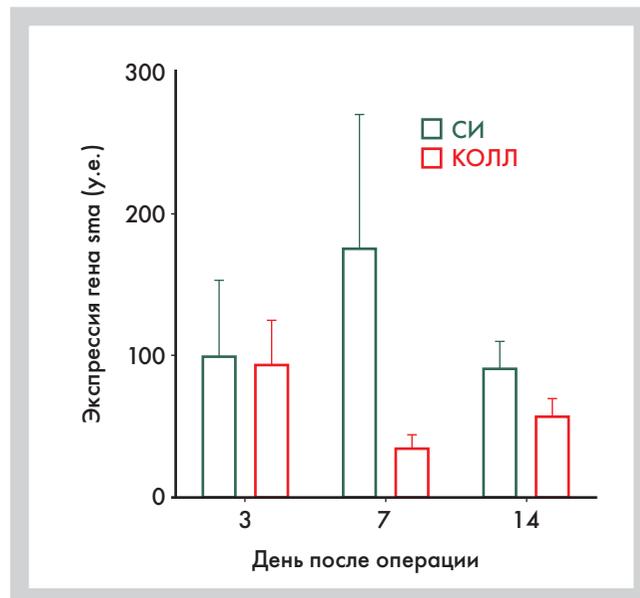


Рис. 12. Экспрессия гена гладкомышечного актина в тканях ран крыс экспериментальных групп через 3, 7 и 14 сут. после операции

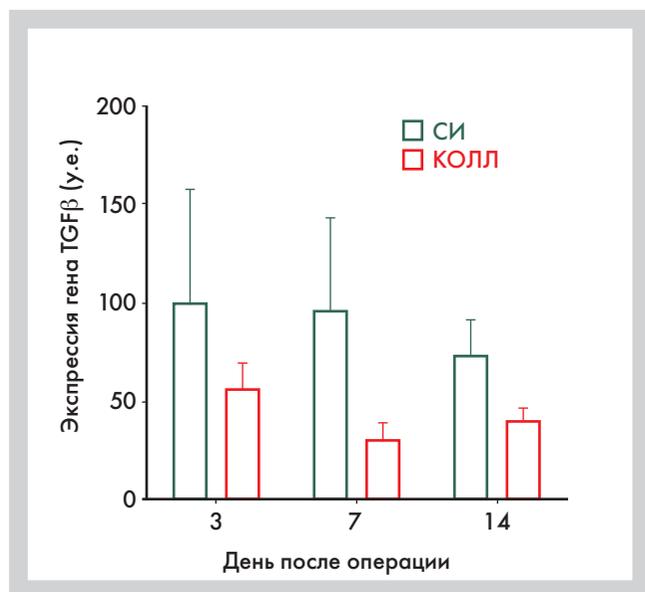


Рис. 13. Экспрессия гена трансформирующего фактора роста бета в тканях ран крыс экспериментальных групп через 3, 7 и 14 сут. после операции

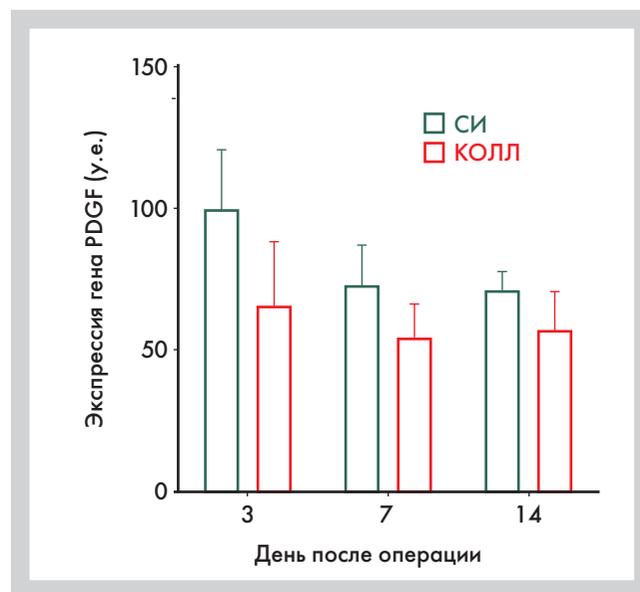


Рис. 14. Экспрессия гена фактора роста тромбоцитов в тканях ран крыс экспериментальных групп через 3, 7 и 14 сут. после операции

значимым увеличением числа М2-макрофагов в группе животных, получавших медицинское изделие Коллост® гель 7%.

*Снижение уровня экспрессии TGF-β1 в данном случае говорит о снижении воспалительных процессов на фоне применения медицинского изделия Коллост® гель 7% и обеспечении условий для пролиферативной активности*

8) Для экспрессии гена фактора роста тромбоцитов были характерны в целом те же закономерности, что и для трансформирующего фактора роста (рис. 14). А поскольку тромбоцитарный фактор роста, помимо прочего, обладает провоспалительным эффектом, полученные данные подчеркивают замедление воспалительных процессов в тканях на фоне применения медицинского изделия Коллост® гель 7%.

## Обсуждение результатов

Заживление ран является важнейшей комплексной реакцией организма на повреждение. В этом процессе участвуют многие типы клеток, в том числе лейкоциты, эпителиоциты, фибробласты и макрофаги, а также многочисленные

гуморальные факторы, вырабатываемые этими клетками. Успешное заживление ран достигается в ходе четырех запрограммированных фаз: гемостаза, воспаления, пролиферации и ремоделирования [7, 9, 11, 13, 16]. Эти фазы частично перекрываются, но для осуществления нормального ранозаживления каждая из них должна начинаться и заканчиваться в определенное время [15]. В основе воспалительной фазы лежат процессы активации эндотелия и рекрутинг из микроциркуляторного русла различных клеток-эффекторов [7]. Первыми клетками-эффекторами являются нейтрофилы, а затем – М1-макрофаги (так называемые классически активированные макрофаги), которые осуществляют уничтожение патогенов и резорбцию некротических масс. Эти клетки выделяют провоспалительные цитокины (TNF, IL-1β) и вызывают повреждение тканей свободными радикалами (активными формами кислорода и азота) и матриксными металлопротеиназами. Процессы пролиферации начинаются вскоре после начала фазы воспаления и характеризуются появлением клеток-эффекторов этой фазы – М2-макрофагов, которые выделяют противовоспалительные цитокины, создавая условия для эффективной репарации тканей. М2-макрофаги продуцируют факторы роста, способствующие пролиферации эндотелия, росту сосудов

(неоваскуляризации), пролиферации фибробластов и дифференцировке их в миофибробласты [16]. Фибробласты, в свою очередь, обеспечивают выработку собственного коллагена и факторов роста, включая основной фактор роста фибробластов, эндотелиальный фактор роста, обеспечивая ангиогенез в области повреждения, фактор роста кератиноцитов, который способствует не только восстановлению эпидермального слоя, но и стратификации эпидермиса [21]. Морфологически эта фаза выражается в образовании грануляционной ткани [7]. Миофибробласты обладают повышенной способностью к сокращению, что способствует стягиванию краев раны, а также секретируют ферменты, расщепляющие первичный внеклеточный матрикс (такие как металлопротеазы внеклеточного матрикса), и интенсивно синтезируют новый внеклеточный матрикс, в том числе коллаген разных типов, волокна которого более упорядочены. На последней стадии ранозаживления происходит ремоделирование рубца. Осуществляется частичный лизис незрелых неправильно ориентированных и избыточных коллагеновых волокон под действием матриксных металлопротеаз, выделяемых макрофагами, фибробластами и эндотелиальными клетками, и постепенное их замещение более толстыми фибриллами [4]. Хронические раны характеризуются

нарушением нормальной смены стадий ранозаживления. Этиология хронических ран разнообразна, но подавляющее большинство из них связано с сосудистой недостаточностью, диабетом, возрастными изменениями и трофическими нарушениями мягких тканей [14], при которых основным патогенетическим фактором является ишемический компонент. Заживление ишемизированной раны представляет собой значительно более сложный (в смысле влияющих факторов) процесс по сравнению с репарацией нормальной кожи [10]. Прежде всего это связано с нарушенной васкуляризацией ишемизированных участков, что не только препятствует доставке метаболитов, необходимых для регенерации ткани, но и затрудняет миграцию различных клеток (нейтрофилов, макрофагов, стволовых элементов) в участок повреждения. Из-за отсутствия адекватного кровоснабжения в участке ткани тормозится развитие эффектов первой фазы воспаления, в частности, резорбция погибшей ткани нейтрофилами и M1-макрофагами, а впоследствии – и второй фазы, зависящей от присутствия M2-макрофагов. Поэтому восстановление васкуляризации является ключевым фактором, влияющим на эффективность репарации ткани.

В настоящей работе были исследованы молекулярные и клеточные механизмы ранозаживляющего действия медицинского изделия Коллост® геля 7% в модели ишемизированных полнослойных ран кожи на крысах. Используемая в данном эксперименте модель ишемизированных полнослойных ран кожи и ее экспериментально подобранные параметры (диаметр ран, сроки сбора биоматериала) позволила решить задачи исследования. Так, за 14 сут. наблюдения в контрольной группе, получавшей медицинское изделие сравнения, заживление дефекта было практически не выражено, в то время как у крыс опытной группы, получавших исследуемое медицинское изделие, происходило значительное (по данным фотопланиметрического исследования) или почти полное (по данным гистологического исследования тканей ран) заживление дефекта. Для выбранных клеточных

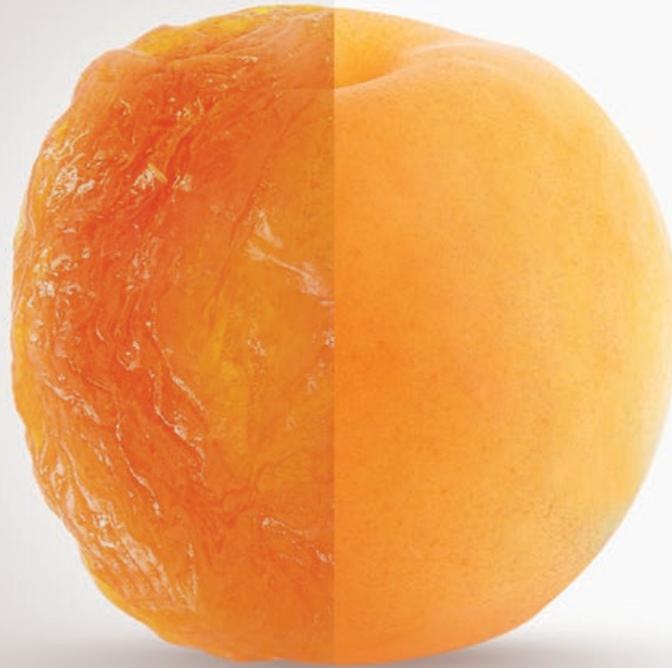
и молекулярных маркеров различных элементов репарационного процесса были обнаружены закономерные изменения уровня экспрессии, соответствующие литературным данным [3]. Таким образом, модель была чувствительна к ранозаживляющему действию на выбранном для исследования временном интервале. Медицинское изделие сравнения (СИ) оказало явное негативное влияние на рост сосудов, выявляемых иммуногистохимическими реакциями на CD31 и гладкомышечный актин. Отсутствие сосудов послужило причиной резкого уменьшения нейтрофильной инфильтрации на третий день эксперимента, а персистирующие некротизированные компоненты тканей обусловили постоянную провоспалительную стимуляцию (выявленную по высокому уровню IL-1 $\beta$  на протяжении всего периода наблюдения). В таких условиях репарация тканей оказывается крайне затрудненной, что проявлялось в виде запоздания появления миофибробластов в ране, отсутствия уменьшения раневого дефекта и его слабой эпителизации на протяжении всего срока наблюдения. В данном исследовании применение медицинского изделия Коллост® гель 7% приводило к существенному изменению профиля экспрессии генов ряда маркеров ранозаживления. В частности, по сравнению с ранами крыс контрольной группы в ранах крыс, получавших Коллост® гель 7%, была снижена экспрессия генов провоспалительного цитокина IL1b, металлопротеазы MMP1, PDGF, а экспрессия гена фактора роста эндотелия сосудов, напротив, повышена. Сниженная по сравнению с контрольной группой экспрессия фактора роста эндотелия сосудов не сопровождалась снижением васкуляризации тканей ран. Напротив, васкуляризация грануляционной ткани у получавших нативный коллаген крыс на ранних сроках существенно опережала неоваскулогенез в тканях ран крыс группы сравнения, а ее последующее снижение отражает созревание сосудов и деградацию образующегося на ранних этапах репарации избыточного их количества. Основным эффектом Коллост® геля на клеточном уровне было обнаруженное иммуногистохимически повышение числа CD163-положительных

M2-макрофагов на 3–7 сут. после создания дефекта. Баланс «провоспалительных» M1 и «противовоспалительных» M2 в тканях раны считается ключевым элементом ранозаживления применительно к труднозаживающим ранам и язвам [10]. Длительное персистирование M1 макрофагов и минимальное количество M2 макрофагов характерно для хронических ишемизированных ран. Противовоспалительный эффект Коллост® геля непосредственно подтвердился в виде достоверного снижения продукции IL-1 $\beta$  (провоспалительного цитокина M1 макрофагов) по сравнению с контрольной группой. Это является как следствием, так и причиной увеличения числа M2-макрофагов в тканях ран этих животных. M2-макрофаги в ткани являются важным источником факторов роста эндотелия сосудов, тромбоцитарного и трансформирующего факторов роста, принимая тем самым активное участие в стимуляции пролиферации клеток, образования грануляционной ткани и роста сосудов. Учитывая очевидное ускорение заживления ран у крыс опытной группы, сниженная экспрессия ряда ростовых факторов в ранах крыс этой группы отражает его более эффективное протекание и «отсутствие необходимости» в продукции макрофагами и другими клетками больших количеств ростовых факторов. Таким образом, наблюдаемый эффект медицинского изделия Коллост® гель свидетельствует о его выраженном потенциале для лечения труднозаживающих ран у человека. Коллост® гель применяется в клинической практике для лечения пролежней у человека [26] и язвенных дефектов при синдроме диабетической стопы [27].

При анализе наиболее интегральных показателей ранозаживления (площади ран, степени их эпителизации) было обнаружено выраженное ранозаживляющее действие Коллост® геля по сравнению с контрольной группой животных, получавших медицинское изделие сравнения. По сравнению с полученными ранее данными о влиянии Коллост® геля на репарацию неосложненных ран [22] можно отметить более выраженный эффект исследуемого медицинского изделия в настоящем исследовании.

# КОЛЛОСТ®

ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ КОЛЛАГЕНОВЫЙ КОМПЛЕКС



**КОЛЛОСТ** – натуральный инъекционный коллаген, максимально приближенный по строению к коллагену человека, способствующий восстановлению дермы за счет активации коллагеногенеза и улучшающий дермальные характеристики.

## ПОКАЗАНИЯ:

- Возрастные изменения кожи лица, шеи, области декольте
- Сниженный тонус и тургор кожи
- Атрофические рубцы на лице и теле: постакне, посттравматические, постхирургические, стрии
- Подготовка к пластическим операциям
- Реабилитация после пластических операций, агрессивных процедур

## ПРЕИМУЩЕСТВА:

- Возможность проведения терапии в любом возрасте – КОЛЛОСТ способен восстановить структуру кожи даже при ее сниженном регенераторном потенциале
- Эффективное лечение застарелых рубцов и стрий
- Стойкий пролонгированный результат
- Интервал между процедурами – 3-4 недели, рекомендуемый курс – 3-5 процедур



## КОМПАНИЯ НИАРМЕДИК

125252, г. Москва, ул. Авиаконструктора Микояна, 12  
Тел./факс: +7 (495) 741-49-89

[www.collost.ru](http://www.collost.ru)



@collostgel

## Выводы

На основании результатов макроскопических, гистологических, иммуногистохимических и молекулярно-биологических методов показано, что механизм действия нативного коллагена I типа Коллост® геля включает привлечение макрофагов и/или усиление их трансформации в M2-макрофаги, которые, в свою очередь, обеспечивают каскад репаративных процессов, в том числе

через модуляцию профиля экспрессии ростовых факторов, вовлеченных в заживление ран. Снижение выраженности воспаления или сокращение длительности воспалительной стадии репаративного процесса, ускорение неоваскулогенеза.

Применение нативного коллагена I типа Коллост® геля позволяет привести хронический процесс к нормальному физиологическому процессу ранозаживления, который является

важнейшей комплексной реакцией организма на повреждения. На последней стадии ранозаживления происходит ремоделирование рубца за счет частичного лизиса незрелых неправильно ориентированных и избыточных коллагеновых волокон под действием матриксных металлопротеаз, выделяемых макрофагами, фибробластами и эндотелиальными клетками, и постепенное их замещение более толстыми фибриллами. ■

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] Ansell D.M., Holden K.A., Hardman M.J. Animal models of wound repair: Are they cutting it? // *Experimental Dermatology*. – 2012. – № 8 (21). – Pp. 581–585.
- [2] Chattopadhyay S., Raines R.T. Review collagen-based biomaterials for wound healing // *Biopolymers*. – 2014. – № 8 (101). – Pp. 821–833.
- [3] Deonarine K. [u др.]. Gene expression profiling of cutaneous wound healing // *Journal of Translational Medicine*. – 2007. – № 1 (5). – P. 11.
- [4] Diegelmann R.F., Evans M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing // *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. – 2004. – № 9. – Pp. 283–289.
- [5] Edwards J. Hydrogels and their potential uses in burn wound management // *British journal of nursing (Mark Allen Publishing)*. – 2010. – № 11 (19). – Pp. S12–S14–6.
- [6] Elgharably H. [u др.]. A modified collagen gel dressing promotes angiogenesis in a preclinical swine model of chronic ischemic wounds // *Wound Repair and Regeneration*. – 2015. – № 6 (22). – Pp. 720–729.
- [7] Eming S.A., Krieg T., Davidson J.M. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2007. – № 3 (127). – Pp. 514–525.
- [8] Gould L.J. [u др.]. Optimization and validation of an ischemic wound model // *Wound Repair and Regeneration*. – 2005. – Pp. 576–582.
- [9] Gurtner G.C. [u др.]. Wound repair and regeneration // *Nature*. – 2008. – № 7193 (453). – Pp. 314–321.
- [10] Hunt T.K., Hopf H., Hussain Z. Physiology of wound healing // *Advances in skin & wound care*. – 2000. – № 2 Suppl (13). – Pp. 6–11.
- [11] Koh T.J., DiPietro L.A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage // *Expert reviews in molecular medicine*. – 2011. – № 13. – e23.
- [12] Moor A.N. [u др.]. Consequences of age on ischemic wound healing in rats: altered antioxidant activity and delayed wound closure // *AGE*. – 2014. – № 2 (36). – Pp. 733–748.
- [13] Reinke J.M., Sorg H. Wound repair and regeneration // *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes*. – 2012. № 1 (49). – Pp. 35–43.
- [14] Schrementi M.E., Ranzer M.J., DiPietro L.A. *Impaired Wound Repair and Delayed Angiogenesis Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg*, 2016; 1003–1015.
- [15] Singer A.J., Clark R.A. Cutaneous wound healing // *The New England journal of medicine*. – 1999. – № 10 (341). – Pp. 738–746.
- [16] Tashireva L.A. [u др.]. Types of immune-inflammatory responses as a reflection of cell–cell interactions under conditions of tissue regeneration and tumor growth // *Biochemistry (Moscow)*. – 2017. – № 5 (82). – Pp. 542–555.
- [17] Trujillo A.N. [u др.]. Demonstration of the Rat Ischemic Skin Wound Model // *Journal of Visualized Experiments*. – 2015. – № 98. – Pp. 1–7.
- [18] Zhang P., Lu J., Jing Y. et al. Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis. *Ann Med*. 2017 Mar; 49(2): 106–116.
- [19] Wiegand C., Bühren B.A., Bünemann E., Schrumpf H., Homey B., Frykberg R.G., Lurie F., Gerber P.A. A novel native collagen dressing with advantageous properties to promote physiological wound healing // *J Wound Care*. 2016. Vol. 25. № 12. Pp. 713–720.
- [20] Godwin J. The promise of perfect adult tissue repair and regeneration in mammals: Learning from regenerative amphibians and fish. *Bioessays*. 2014 Sep; 36(9): 861–871.
- [21] Галстян Г.П. и др. Клинико-экономическое обоснование стоимости квоты на лечение пациентов с синдромом диабетической стопы // *Сахарный диабет*. – 2013. – № 3. – С. 71–83.
- [22] Калмыкова Н.В. [u др.]. Стимулирующий эффект различных форм коллагеновых раневых покрытий на процесс эпителизации ран кожи // *Биомедицина*. – 2017. – № 4. – С. 85–96.
- [23] *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А.Н. Миронова*. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
- [24] Биопластический коллагеновый материал Коллост в лечении пациентов с синдромом диабетической стопы (результаты многоцентрового исследования) / В.А. Ступин, С.В. Горюнов, С.Ю. Жидких, В.А. Горский, А.С. Сивков, А.Н. Комаров, К.А. Корейба, М.С. Богомолов, Е.П. Баранцевич, В.Т. Кривихин, М.Е. Елисеева, М.Ю. Бакунов, Д.В. Кривихин, Е.А. Богданов, Р.Б. Габитов, Л.С. Золотарева, Е.В. Силина // *Хирургическая практика*. – 2017. – № 1. – С. 5–11.
- [25] MD L.M.M., MD T.J.P. *Wound healing and treating wounds // Journal of American Dermatology*. Elsevier Inc, 2016. Vol. 74, № 4, Pp. 589–60517.
- [26] Клиническая эффективность биопластического материала на основе нативного коллагена в лечении пролежней у пациентов в нейрореабилитации: рандомизированное сравнительное исследование / А.Н. Комаров, Л.П. Кезина, Е.В. Силина, Р.Б. Габитов, А.С. Орлова, К.А. Корейба // *Вестник восстановительной медицины*. – 2017. – № 2. – С. 74–83.
- [27] Силина Е.В., Ступин В.А., Габитов Р.Б. Роль коллагена в механизмах заживления хронических ран при синдроме диабетической стопы // *Клиническая медицина*. – 2018. – № 96(2). – С. 106–115.