

РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-5-29-35

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ КОЛЛАГЕНАЗЫ ИЗ АФРИКАНСКОГО СОМА *Clarias gariepinus* ПРИ ОЖОГАХ И РУБЦАХ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *EX VIVO* И *IN VIVO*

К. И. Стосман^{1,*}, К. В. Сивак¹, Е. Ю. Калинина¹, Б. А. Парамонов²,
В. В. Панов³, К. Б. Чакальский³, И. Ф. Шпаков²

Целью работы было изучение влияния коллагеназы из африканского сома *Clarias gariepinus* (Кгн) в сравнительном аспекте с фермеколом и коллалазином на деградацию коллагена в рубцовой ткани в экспериментах *ex vivo* и на процессы регенерации ожога кожи крыс. Кгн (0,1 мл/см²) при нахождении в течение 7 дней обладает высокой коллагенолитической активностью, сравнимой с активностью ферменкола. Добавление Кгн к рубцовой ткани позволяет до 92 % снизить количество коллагена, по сравнению с применением плацебо ($p < 0,05$). На модели термического ожога у крыс были установлены более ранние сроки отторжения некротического струпа при применении Кгн. На 14 день эксперимента отмечали полное очищение ожоговой раны от некротической корки. Данный эффект был сопоставим с эффектом коллалазина. На этом же сроке наблюдали нормализацию уровня маркеров воспалительного процесса: лимфоцитов и циркулирующих иммунных комплексов, повышенных при смоделированной патологии. У животных, на фоне применения Кгн, концентрация циркулирующих иммунных комплексов в крови снижалась почти в 2 раза по сравнению с группой плацебо ($p < 0,05$). Наблюдалось торможение роста и созревания как коллагеновых волокон, так и гликозаминогликанов, что приводило к отсутствию рубца. Использование Кгн сопровождалось уменьшением уровня растворимого коллагена раневых участков в 2 раза, экстрагируемых гликозаминогликанов — в 1,8 раза, что превосходило эффекты плацебо ($p < 0,05$). Через 1 месяц после моделирования ожога, по данным УЗИ, у всех животных, которым назначали Кгн, толщина эпидермиса и дермы практически не отличалась от таковой в норме. Гистоморфологическое исследование ожоговых ран кожи крыс показало, что Кгн положительно влиял на процессы репарации, наблюдалось формирование грануляционной ткани, активная эпителизация, образование коллагеновых волокон. Низкая себестоимость, более совершенная технология выделения, высокая степень очистки, отсутствие аллергических реакции при применении — всё это делает Кгн перспективным препаратом для лечения ожогов и рубцов (после завершения комплекса испытаний и сертификации).

Ключевые слова: коллагеназа; термический ожог; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Патологические рубцы кожи развиваются после повреждений различного типа: ожогов, ранений, оперативных вмешательств. По данным ВОЗ, термические повреждения занимают второе-третье место в структуре травм мирного времени, на их долю приходится 10 – 12 % всех травматических повреждений [1]. Час-

тота ожогов в настоящее время достигает одного на тысячу населения в год. В Российской Федерации в 2018 г. было зарегистрировано около 240 тыс. пациентов с диагнозом “термический и химический ожог” [5]. Одним из неизбежных последствий такого травматизма, оказывающим значительное влияние на качество жизни, являются патологические рубцы, которые приводят к формированию контрактур и деформаций. Возникновение грубых рубцов, особенно на открытых участках тела, часто приводит к снижению качества жизни, к развитию психозомоциональных расстройств [15].

Коррекция рубцов является одной из наиболее сложных задач в эстетической медицине. Современный арсенал лекарственных средств (ЛС), используемых в терапии гипертрофических рубцов, представлен ЛС различных фармакологических групп [3]. Чаще

¹ ФГБУН Институт гриппа имени А. А. Смородинцева Минздрава России, Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17.

² Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова, Россия, 194044, Санкт-Петербург, улица Академика Лебедева, 6.

³ 1602 Военно-клинический госпиталь Минобороны России, Россия, 344064, г. Ростов-на-Дону, ул. Дачная, 10.

* e-mail: labtox6@rambler.ru

других применяют глюкокортикостероиды (ГКС) и ферментные препараты (коллагеназы и гиалуронидазы) [2]. Последние обеспечивают гидролиз коллагена и гликозаминогликанов в рубцово-измененных тканях и последующее восстановление нормального состава и структуры внеклеточного матрикса. Коллагеназы являются эффективными протеолитическими ферментами, которые за счет усиления миграции и пролиферации кератиноцитов, эндотелиальных клеток и фибробластов могут ускорять процесс репарации [8]. Уникальность этих ферментов заключается в их способности гидролизовать в коллагене, составляющем основу рубцов, специфические пептидные связи, которые практически не поддаются гидролизу другими ферментами (например, трипсином, химопсином, папаином, террилитином, стрептокиназой и др.).

В настоящее время в Российской Федерации применяют несколько ЛС на основе коллагеназ (ферменкол, коллализин, дигестол), рекомендованных для ферментативной очистки ран различного происхождения (ожогов, длительно незаживающих ран, пролежней и трофических язв) и лечения рубцов. Один из наиболее часто используемых в клинической практике ЛС ферменкол представляет собой ферментный комплекс, полученный из камчатского краба. Это ЛС содержит в своем составе 9 коллагенолитических протеаз и способствует разрушению соединительной ткани. Крабовая коллагеназа имеет ограничения для промышленного производства, наблюдаются значительные различия в степени чистоты и активности фермента. Отдельной проблемой является очистка от микроорганизмов, населяющих желудочно-кишечный тракт краба, оболочки клеток которых аллергенны. В коллализин входит ферментный комплекс, полученный из *Clostridium histolyticum*. К недостаткам препаратов микробных коллагеназ относят сравнительно невысокую активность, трудности культивирования продуцентов, а также потенциальную аллергенность.

В связи с указанными обстоятельствами поиск новых эффективных ЛС на основе коллагеназ является актуальным. Перспективным кандидатом для лечения ожогов и рубцов может стать коллагеназа, выделенная из африканского сома *Clarias gariepinus*. Возможность искусственного разведения этого вида быстрорастущих рыб позволяет в достаточном количестве получить материал для выделения коллагеназы с высокой степенью чистоты и активностью.

Цель работы состояла в изучении влияния коллагеназы (Кгн) из африканского сома *Clarias gariepinus* в сравнении с фермеколом и коллализином на деградацию коллагена в рубцовой ткани в экспериментах *ex vivo* и на процессы регенерации ожоговой поверхности кожи крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использовали Кгн из африканского сома (серия 010215, по 50 мг во флаконе), которая

была предоставлена ООО “НИИ СПТ”, Москва. Основным ее компонентом является комплекс коллагенолитических ферментов (20 %), вспомогательные вещества — лактоза (80 %).

В качестве препаратов сравнения были выбраны:

ферменкол, производство ОАО НПК “Высокие технологии”, Санкт-Петербург (1 флакон содержит 5 мг коллагеназы, лиофилизированный порошок).

коллализин, производство Санкт-Петербургский НИИ вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов, Санкт-Петербург (1 ампула содержит коллагеназы 500 КЕ, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций и местного применения). Непосредственно перед применением содержимое флакона разводили в воде для инъекций.

Моделирование *ex vivo*. Гипертрофический рубец, иссеченный у пациента, фрагментировали на срезы стандартной величины и массы 0,05 г. 10 срезов в каждой группе помещали в лунки 24-луночного планшета и инкубировали с растворами Кгн из африканского сома и фермеколом в концентрациях 0,1 и 1 мг/мл в течение 24 ч. Оценивали келоидолитическую активность по количеству оставшегося в срезе коллагена, концентрацию которого определяли спектрофотометрически по связыванию сириуса красного с помощью биохимического набора “Sircol” (Великобритания) [16].

Эксперименты *in vivo*. Экспериментальное исследование проведено в соответствии с этическими принципами обращения с лабораторными животными [4]. Работа выполнена на 60 беспородных крысах-самках с массой тела 160 – 190 г, полученных из сертифицированного питомника лабораторных животных НИЦ “Курчатовский институт” — “ПЛЖ “Рапполово” (Ленинградская область). Животных содержали по 5 особей в клетке в стандартных условиях вивария при температуре воздуха 18 – 22 °С и относительной влажности воздуха 50 – 65 %. В ходе эксперимента обеспечивался свободный доступ к воде и корму. Крысы были разделены на 4 группы ($n = 15$): 1 — интактные; 2 — особи, получавшие плацебо; 3 — особи, получавшие коллализин; 4 — особи, получавшие Кгн из африканского сома.

Животным из 2, 3 и 4 групп наносили на депилированную кожу спины в грудино-поясничной области термический ожог 200 °С металлической пластиной площадью 2 см² с экспозицией 10 с [12]. Анальгезию осуществляли анальгином в дозе 50 мг/кг (внутримышечно) за 30 мин до ожога. Начиная со 2 сут, в течение 7 сут (ежедневно, двукратно) осуществляли применение ЛС. Раствор Кгн в концентрации 1 мг/мл наносили на место ожога в объеме 0,1 мл/см², препарат коллализин — также в объеме 0,1 мл/см² (концентрация препарата составила 500 КЕ/мл). На 7 и 14 сут по 5 животных из каждой экспериментальной группы подвергали эвтаназии с забором крови и раневых дефектов.

Клиническую картину ожоговой травмы оценивали в баллах от 0 (отсутствует) до 3 (сильно выражено) по

показателям: краснота, отек, ожоговый вал, краевое, неполное и полное отторжение струпа, кровоизлияния.

В срезах кожи определяли концентрации растворимых гликозаминогликанов (ГАГ) с помощью биохимического набора “Blyscan” (Великобритания) и растворимого коллагена (КОЛ) с помощью биохимического набора “Sircol” (Великобритания) [16]. Измерение результатов проводили на планшетном спектрофотометре (BioTek Inc., США). Анализ крови осуществляли на гематологическом анализаторе (Abacus Junior Vet, Австрия). Уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в крови определяли методом преципитации в 3,5 % растворе ПЭГ-6000 и подсчитывали по формуле:

$$\text{ЦИК} = (\text{ОП}_{\text{образца}} - \text{ОП}_{\text{контроль}}) \cdot 1000,$$

где ОП — оптическая плотность [8].

Для гистологического исследования ткани фиксировали в 10 % забуференном растворе формалина и подвергали стандартной проводке с последующим заключением в парафин. Из парафиновых блоков изготавливали 5 мкм-срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином, выборочно — пикрофуксином по методу Ван-Гизон на коллагеновые волокна и толуидиновым синим на метакромазию тканей (ГАГ — гликозаминогликаны). Гистологические препараты исследовали в световом микроскопе Leica (Германия) при увеличении 200–400 по 2 среза на 1 препарат с каждой крысы.

Ультразвуковое исследование участка кожи, на котором моделировали термический ожог (эпидермиса и дермы), у 5 крыс из каждой группы проводили с помо-

щью ультразвукового сканера кожи DermaScan C (Cortex, Дания) на частоте 20 МГц через 1 месяц после моделирования.

Обработку полученных результатов выполняли с использованием пакета статистических программ GraphPad Prism 6.0 (США). Проверку на нормальность распределения проводили методом Шапиро – Уилка. Для выявления различий между независимыми группами использовали непараметрические критерии Манна – Уитни и Краскела – Уоллиса, а при попарном сравнении — критерий Данна – Бонферрони и считали значимыми при уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов по изучению влияния разных ЛС на содержание коллагена в рубцовой ткани в экспериментах *ex vivo* показал, что Кгн обладала высокой коллагенолитической активностью. Ее эффект был сравним с таковым для ферменкола. Добавление протеолитического фермента к рубцовой ткани позволило до 83–92 % снизить количество коллагена, основного структурного элемента соединительной ткани, участвующего в образовании ран и рубцов. Остаточное количество коллагена в срезе гипертрофического рубца, обработанного ферменколом, составило 8–12 %, обработанного Кгн — 10–17 % по отношению к плацебо. Полученные данные согласуются с результатами экспериментов *in vitro*, проведенными при оценке средней молекулярной массы растворенного коллагена после его инкубации с ферменколом [11].

На модели термического ожога было показано, что у крыс из группы плацебо на месте ожога кожа была плотная и неподвижная, наблюдалось омертвление с

Таблица 1. Динамика клинических признаков течения термического ожога у крыс ($M \pm m$)

Показатели, баллы	Экспериментальные группы, $n = 5$		
	Плацебо	Коллалазин, 0,1 мл/см ²	Кгн, 0,1 мл/см ²
7 сутки			
Краснота	0	0	0
Отек	0	0	0
Ожоговый вал	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2
Краевое отторжение струпа	1,6 ± 0,2	3,0 ± 0,3*	3,0 ± 0,3*
Неполное отторжение струпа	0	1,0 ± 0,3*	1,2 ± 0,4*
Полное отторжение струпа	0	0,4 ± 0,4	0,4 ± 0,2
Кровоизлияние	0	0	0
14 сутки			
Краснота	0	0	0
Отек	0	0	0
Ожоговый вал	0	0	0
Краевое отторжение струпа	0,4 ± 0,2	1,6 ± 0,2*	1,8 ± 0,4*
Неполное отторжение струпа	0	0,8 ± 0,2*	1,0 ± 0,3*
Полное отторжение струпа	0	2,6 ± 0,2*	1,6 ± 0,6*
Кровоизлияние	0	1,4 ± 0,5*	3,0 ± 0,0*

* — Отличия от группы плацебо.

сильным отеком. При макроскопическом осмотре раневого дефекта на 7 сут выявлены язвенные дефекты, наблюдающиеся под черным струпом со слегка возвышающимися краями. У животных, получавших ЛС, на этом же сроке эксперимента были выявлены язвенные дефекты под темно-коричневым струпом с возвышающимися краями. Отмечалось достоверное ($p < 0,05$) как краевое, так и неполное отторжение струпа за счет лизиса некротических масс по сравнению с контрольной группой, где наблюдалось лишь частичное начало отторжения струпа (табл. 1).

К 14 сут ожоговые раны у крыс экспериментальных групп почти полностью очищались от некротической корки, при этом обнажалась богатая сосудами раневая поверхность. Достоверных различий в эффективности между Кгн и коллализином выявлено не было ($p \geq 0,05$). Ферментативная очистка раны способствовала не только удалению некротической ткани, но и активации миграции клеток, участвующих в эпителизации, а также устранению воспаления, что согласуется с полученными данными, представленными в табл. 2.

Известно, что коллагеназа из *Clostridium histolyticum* влияет непосредственно на процесс репарации: усиливает миграцию и пролиферацию кератиноцитов, эндотелиальных клеток и фибробластов [9]. Способность бактериальной коллагеназы снижать интенсивность процессов рубцевания и воспаления была показана при ее применении в офтальмологической практике [6].

Термический ожог кожи приводит к развитию воспалительной реакции, которая характеризуется отеком, повышением СОЭ, лейкоцитопенией. Наблюдается снижение количества лимфоцитов в крови, что может являться следствием гибели клеток и одним из механизмов иммунной дисфункции [17]. Ожоги, как правило, сопровождаются изменениями в показателях Т- и В-систем иммунитета, реактивности цитокин-продуцирующих клеток. Отмечается низкая способность лимфоцитов к выработке факторов торможения миграции лейкоцитов, а также увеличение продукции циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) [18]. Повышение уровня иммунных комплексов, выяв-

ляемое при хронических персистирующих инфекциях, воспалении, является характерным признаком и ожоговой интоксикации. В проведенном нами исследовании у крыс с термическим ожогом, получавших плацебо, через 7 сут после моделирования патологии наблюдалась лимфоцитопения, повышение уровня ЦИК. На фоне применения ЛС на этом же сроке эксперимента у животных отмечался лимфоцитоз, который является следствием стимуляции репаративных процессов, способствующих снижению генерации медиаторов воспаления, в том числе цитокинов с проапоптогенным эффектом [10]. Регистрируемое увеличение концентрации ЦИК характеризовало наличие воспалительного процесса (табл. 2).

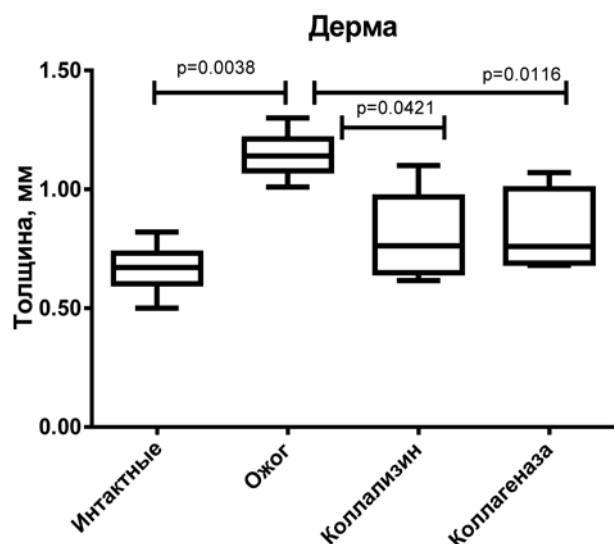
У крыс с ожогом (группа плацебо) высокие значения ЦИК не изменялись на протяжении всего эксперимента, а количество лимфоцитов на 14 сут нормализовалось. На фоне применения ЛС отмечалось достоверное снижение патологически повышенной концентрации ЦИК, что хорошо согласовалось с активным удалением некротического струпа с поверхности ран и может служить маркером уменьшения воспалительного процесса. Терапевтические эффекты коллагеназы из африканского сома и микробной коллагеназы были сопоставимы.

Гликозаминогликаны, являясь обязательными компонентами межклеточного матрикса, участвуют в межклеточных взаимодействиях, формировании и поддержании формы клеток и тканей, образовании каркаса при их формировании. Формирование рубца происходит, в основном, за счет компонентов внеклеточного матрикса: коллагена, гликозаминогликанов, эластина и других белков. Образование коллагена преобладает над его распадом из-за уменьшения выработки коллагеназы, специфического фермента, разрушающего коллаген, вследствие чего развивается мощный фиброз тканей в виде гипертрофических или келоидных рубцов. Общей особенностью всех рубцов кожи является избыточный внеклеточный матрикс, главным образом — за счет коллагена. Коллагеназа гидролизует коллаген и гликозаминогликаны в рубцовой ткани, в результате чего уменьшаются вязкость гликозаминогликанов, способность связывать воду и ионы метал-

Таблица 2. Влияние коллагеназ на динамику лимфоцитов и иммунных комплексов в крови крыс с термическим ожогом ($M \pm m$)

Показатели	Экспериментальные группы, $n = 5$			
	Интактные	Плацебо	Коллализин, 0,1 мл/см ²	Кгн, 0,1 мл/см ²
	7 сутки			
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	7,75 ± 1,11	4,92 ± 0,43*	7,56 ± 0,67^	8,40 ± 0,86^
ЦИК, усл. ед.	10,5 ± 3,5	26,4 ± 3,8*	24,0 ± 4,3*	21,0 ± 6,2*
	14 сутки			
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	7,65 ± 1,11	6,95 ± 0,63	6,48 ± 0,67	6,38 ± 0,42
ЦИК, усл. ед.	10,5 ± 3,5	31,8 ± 4,5*	16,8 ± 3,3^	15,4 ± 4,6^

Примечание: * – отличия от интактных, значимы при $p < 0,05$; ^ – отличия от группы плацебо, значимы при $p < 0,05$.



Влияние коллализина ($0,1 \text{ мл/см}^2$) и КГн ($0,1 \text{ мл/см}^2$) на толщину дермального слоя (мм) кожи крыс через 1 месяц после термического ожога.

Примечание: p – уровень значимости между экспериментальными группами.

лов [15]. Как следствие, увеличивается проницаемость тканей, улучшается их трофика, уменьшаются отеки, повышается эластичность рубцово-измененных участков.

В процессе естественной регенерации кожи (группа плацебо) отмечали сокращение площади ожоговой раны за счет как созревания коллагеновых волокон, так и накопления гликозаминогликанов (ГАГ), участвующих в формировании рубцовых дефектов. Так, к 14 суткам у контрольных крыс, получавших плацебо, площадь ожоговой раны снижалась почти в 9 раз ($p < 0,05$), уровень КОЛ практически не изменился, а уровень ГАГ в кожи возрастал более чем в 5 раз ($p < 0,05$) по сравнению с 7-ми сутками эксперимента (табл. 3). На этом же сроке на фоне проводимого фармакологического воздействия площадь раневой поверхности также уменьшалась, но менее выражено

(примерно в 3 раза, $p < 0,05$), уровень КОЛ раневых участков снизился в 2 раза ($p < 0,05$), а экстрагируемых ГАГ — в 1,8 раза ($p < 0,05$), что существенно превосходило эффекты плацебо и свидетельствовало о выраженных келоидолитических свойствах исследуемой коллагеназы. Снижение содержания коллагена в ожоговом участке кожи у животных с фармакологической поддержкой приводило к замедлению скорости уменьшения площади раны и в дальнейшем предотвращало образование рубца. Достоверных различий между КГн и препаратом сравнения коллализином не установлено ($p \geq 0,05$).

Ожоговая травма способна вызвать повреждение нескольких слоев кожи: эпидермис, дерму и подкожные ткани. УЗИ, проведенное через 1 месяц после моделирования ожога у 5 особей из каждой группы, показало, что у всех опытных животных толщина эпидермиса практически не отличалась от таковой в норме. В дерме у крыс из группы плацебо все еще сохранялась отечность, и величина более глубокого слоя кожи значимо превышала нормальные значения ($p < 0,05$). На фоне применения КГн и коллализина наблюдали нормализацию толщины дермального слоя кожи (рисунок).

Сходный результат был получен у пациентов после оперативного вмешательства на щитовидной железе. Было показано, что положительный эффект применения коллализина сопоставим с таковым для ГКС-терапии (внутрикожные инъекции триамцинолона) и отмечается через 1 месяц после начала терапии [12].

Гистоморфологическое исследование раневых дефектов кожи крыс из группы плацебо на 7 сут эксперимента показало наличие секвестрированных некротизированных масс, четко отграниченных от подлежащей ткани воспалительным валом и макрофагами, с небольшим количеством сегментоядерных гранулоцитов. В обеих группах отмечалось наличие струпа на поверхности язвенных дефектов, состоящего из секвестрированных некротизированных масс, который был четко отграничен от подлежащей ткани воспалитель-

Таблица 3. Влияние коллагеназ на площадь ожоговых ран и содержание компонентов соединительно-тканевого матрикса кожи ($M \pm m$)

Показатели	Экспериментальные группы, $n = 5$		
	Плацебо	Коллализин, $0,1 \text{ мл/см}^2$	КГн, $0,1 \text{ мл/см}^2$
7 сутки			
Площадь ожоговой раны, мм^2	$277,80 \pm 34,10$	$338,75 \pm 31,82$	$345,00 \pm 37,70$
Содержание КОЛ, мкг/мг	$8,45 \pm 1,73$	$9,86 \pm 1,91$	$10,27 \pm 1,54$
Содержание ГАГ, мкг/мг	$0,45 \pm 0,06$	$0,41 \pm 0,04$	$0,38 \pm 0,03$
14 сутки			
Площадь ожоговой раны, мм^2	$31,10 \pm 4,70$	$104,24 \pm 10,53^*$	$92,70 \pm 15,00^*$
Содержание КОЛ, мкг/мг	$7,07 \pm 0,84$	$3,94 \pm 0,77^*$	$3,58 \pm 0,54^*$
Содержание ГАГ, мкг/мг	$2,39 \pm 0,17$	$1,22 \pm 0,19^*$	$1,30 \pm 0,12^*$

Примечание: * – отличия от группы плацебо, значимы при $p < 0,05$.

ным валом и макрофагами. Причем, в группе крыс, получавших КГн, по краям язвенного дефекта отмечалось “наполнение” эпителиальной выстилки на зону деструкции. Воспалительный вал, представленный клетками лимфо-плазмочитарного и макрофагального ряда с небольшим количеством сегментоядерных гранулоцитов, был более выражен в контрольной группе животных. В подлежащих сохранных участках дермы отмечался мукоидный отек основного вещества дермы с наличием грубо-волоконистых горизонтально ориентированных коллагеновых волокон. На 14 сут у крыс группы плацебо отмечалось отсутствие струпа, на месте ожога — зернистая, красноватая поверхность. У животных, получавших ЛС, — отсутствие струпа, уплотненная поверхность дефекта, красноватое зернистое дно. При исследовании раневых дефектов кожи крыс в обеих группах наблюдалось формирование грануляционной ткани. Причем на фоне применения ЛС отмечался более быстрый темп формирования коллагеновых волокон, тогда как в контрольной группе сохранялась многоклеточность грануляционной ткани с менее выраженной коллагенопластикой. Положительное действие коллагеназы отражалось в активной эпителизации поверхности раневого дефекта с менее выраженными реактивными изменениями многослойного плоского эпителия в краях раны по сравнению с контрольной группой, в которой отмечались менее выраженные процессы регенерации с тенденцией к псевдоэпителиоматозной гиперплазии в краях раны. В обеих группах в более глубоких участках отмечалось образование грануляционной ткани, полнокровие тонкостенных сосудов, богатая клеточная инфильтрация с наличием плазматических клеток, фибробластов, лимфоцитов, с образованием положительно окрашенных фуксином вертикально ориентированных, тонких, местами расщепленных коллагеновых волокон.

При сравнении заживления раневых дефектов у крыс с ожогами (группа плацебо) на 7 и 14 сут отмечали активные регенераторные процессы. На этом же сроке исследования на фоне применения ЛС воспалительные процессы в зоне повреждения и патологической регенерации в краях раны были менее выражены, скорость очищения дефектов от некротических масс — более выражена, а процессы коллагенопластики — более ранними. Высокая численная плотность сосудов, сохраняющаяся до конца наблюдения, обеспечивала достаточный уровень оксигенации, нормализацию гомеостаза, ускоренное очищение раны от тканевого и клеточного детрита, пролиферацию фибробластов, процесс фибриллообразования, созревания коллагеновых волокон в ране и, в конечном счете, формирование мягкого, эластичного рубца.

Таким образом, КГн из африканского сома *Clarias gariepinus* обладала выраженной коллагенолитической и противовоспалительной активностью, способствовала очищению пораженных тканей от детрита и гнойного экссудата, активировала грануляцию и эпителиза-

цию, предупреждала развитие грубых гипертрофических рубцов. В экспериментах *ex vivo* показано, что добавление КГн к образцам рубцовой ткани существенно снижало количество коллагена, основного структурного элемента соединительной ткани, участвующего в образовании ран и рубцов. Коллагенолитическая и противовоспалительная активность КГн была сопоставима с активностью препаратов сравнения — фермекола и коллалазина.

Преимуществами КГн являются более низкая себестоимость (из одной рыбы получают до 150 мг чистого фермента), более совершенная технология выделения и высокая степень очистки, отсутствие аллергических реакций при его применении.

ВЫВОДЫ

1. Добавление в экспериментах *ex vivo* коллагеназы из африканского сома *Clarias gariepinus* (КГн) к ткани рубца кожи человека позволяет до 92 % снизить количество коллагена в ткани по сравнению с плацебо ($p < 0,05$). Активность КГн и ферменкола были сопоставимы.

2. Применение КГн способствует полному очищению ожоговой раны от некротической корки на 14 день эксперимента, активизирует грануляцию и эпителизацию ожоговой поверхности. Данный эффект сопоставим с эффектом коллалазина.

3. КГн оказывает выраженный противовоспалительный эффект, сопоставимый с эффектом коллалазина: на 14 сут эксперимента наблюдается нормализация уровня лимфоцитов и циркулирующих иммунных комплексов в крови, повышенных при смоделированной патологии.

4. КГн способствует торможению роста и созреванию коллагеновых волокон в 2 раза ($p < 0,05$) и гликозаминогликанов в 1,8 раза ($p < 0,05$) в ткани кожи при заживлении, что приводит к предупреждению образования рубца. Достоверных различий между КГн и коллалазином не выявлено ($p \geq 0,05$).

ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Алексеев, Т. А. Ушакова, *IV съезд комбустиологов России: сб. науч. тр.*, Москва (2013).
2. Е. Ю. Вертиева, О. Ю. Олисова, Н. Г. Кочергин, И. Я. Пинсон, *Росс. журн. кожн. и венерич. болезней*, **18**(1), 51 – 57 (2015).
3. А. В. Воронков, Э. Ф. Степанова, Ю. Ю. Жидкова, О. Ю. Гамзелева, *Фундаментальные исследования*, **3**, 301 – 308 (2014).
4. Директива 2010 / 63 / EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, Санкт-Петербург (2012).
5. *Здравоохранение в России*. 2019: стат. сб.: офиц. изд., Росстат, Москва (2017).
6. М. И. Згоба, П. В. Лыскин, И. Р. Макаренко, *Саратовский научно-мед. журн.*, **14**(4), 953 – 956 (2018).
7. Л. Д. Калюжная, Е. А. Бардова, *Український журнал дерматології, косметології*, **3**(46), 83 – 88 (2012).

8. *Лабораторные методы исследования в клинике: справочник*, В. В. Меньшиков (ред.), Москва (1987).
9. А. В. Майорова, Б. Б. Сысуев, Ю. О. Иванкова, И. А. Ханалиева, *Фармац. и фармакол.*, **7**(5), 260 – 270 (2019); doi: 10.19163 / 2307-9266-2019-7-5-260-270
10. М. В. Осиков, Е. В. Симонян, О. Т. Саедгалина и др., *Health and Education Millennium*, **19**(1), 104 – 108 (2017).
11. Б. А. Парамонов, И. И. Турковский, С. Ф. Антонов и др., *Вестник эстетической медицины*, **8**(3), 69 – 73 (2009).
12. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая*, А. Н. Миронов (ред.), Гриф и К, Москва (2012).
13. Е. М. Трунин, И. Г. Кандалова, И. В. Нынь и др., *Поликлиника*, **1**, 120 – 121 (2009).
14. А. В. Черняков, *Русс. мед. журн.*, **28**, 2063 – 2068 (2017).
15. Я. А. Юцковская, М. С. Тарасенкова, Г. А. Наумчик, *Клин. дерматол. и венерол.*, **1**(7), 51 – 54 (2010).
16. H. Capella-Monsonis, J. Coentro, V. Graceffa, *Nature. com* (2018), Retrieved from <https://www.nature.com/nprot/journal/v13/n3/abs/nprot.2017.117.html>
17. A. Shalom, E. Kramer, M. Westreich, *Ann. Plast Surg.*, **66**(6), 607 – 609 (2011); doi: 10.1097/SAP.0b013e3181fc04e1
18. Y. C. Xu, C. Q. Luo, X. Li, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **43**, 921 – 929 (2016); doi: 10.1111 / 1440-1681.12620

Поступила 13.12.21

STUDY OF THE POSSIBILITY OF USING COLLAGENASE FROM AFRICAN CATFISH *Clarias gariepinus* FOR TREATMENT OF BURNS AND SCARS IN EX VIVO AND IN VIVO EXPERIMENTS

K. I. Stosman^{1,*}, K. V. Sivak¹, E. Yu. Kalinina¹, B. A. Paramonov², V. V. Panov³, K. B. Chakal'kii³, and I. F. Shpakov²

¹ A. A. Smorodintsev Institute of Influenza, ul. Prof. Popova 15/17, St. Petersburg, 197376 Russia

² S. M. Kirov Military Medical Academy, ul. Akademika Lebedeva 6, St. Petersburg, 194044 Russia

³ 1602 Military Clinical Hospital, ul. Dachnaya 10, Rostov-on-Don, 344064 Russia

* e-mail: labtox6@rambler.ru

This work was aimed to study the influence of collagenase from African catfish *Clarias gariepinus* (Cgn) on collagen degradation in scar tissue *ex vivo* and on regeneration processes of burned skin surface in rats *in vivo* in comparison to the efficacy of Fermecol and Collalysin preparations. It was found that Cgn (1 mg/mL or 0.1 ml/cm² when applied topically for 7 days) has a high collagenolytic activity comparable to that of Fermecol, while its addition to the scar tissue provides up to 92% reduction of collagen compared to placebo application ($p < 0.05$). On the model of thermal burn in rats, earlier time of necrotic scab detachment was established when Cgn was used. On the 14th day of experiment, complete clearing of the burn wound from the necrotic crust was observed, this effect being comparable with that of Collalysin ($p < 0.05$). For the same period of time, normalization of the level of inflammatory process markers – lymphocytes and circulating immune complexes (CIC) (elevated in the model pathology) was observed. In animals treated with Cgn, the CIC concentration exhibited almost 2-fold decrease as compared to the placebo group ($p < 0.05$). Inhibition of growth and maturation of both collagen fibers and glycosaminoglycans was observed, which led to the absence of scarring. The application of Cgn was accompanied by decrease in the level of soluble collagen in the wound areas by 2 times, and extractable GAG by 1.8 times, which was superior to the placebo effects ($p < 0.05$). According to ultrasound data in all experimental animals treated with Cgn, the thickness of epidermis and dermis one month after the model burn induction almost did not differ from the norm. Histomorphological study of burn wounds in the skin of rats showed that Cgn had a positive effect on reparation processes: the formation of granulation tissue, active epithelialization, and formation of collagen fibers were observed. Low cost, improved extraction technology, high purification degree, absence of allergic reactions – all this makes Cgn a promising medicine for the treatment of burns and scars (after completing the set of tests and certification).

Keywords: collagenase; thermal burn injury; rats.