

Стимулирующий эффект различных форм коллагеновых раневых покрытий на процесс эпителизации ран кожи

Н.В. Калмыкова¹, А.А. Андреев-Андриевский^{2,3,4}, И.А. Демьяненко¹,
В.Н. Манских², Е.А. Лагерева^{2,4}, А.С. Попова^{2,3,4}, Ю.С. Хац¹, А.П. Суслев¹

¹ – ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного акад. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва

² – ООО «НИИ Митоинженерии МГУ», Москва

³ – ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

⁴ – ФГБУН ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

Контактная информация: Калмыкова Нина Владимировна, k.nina.v@mail.ru

Химические и биологические свойства коллагена, основного структурного белка соединительных тканей, обуславливают его способность к стимуляции репаративной регенерации кожи. В настоящее время выпускается множество раневых покрытий на основе коллагена для лечения ран различной этиологии. Однако особенности биологического действия разных типов раневых покрытий на течение раневого процесса в стандартных моделях *in vivo*, как правило, подробно не охарактеризованы. В настоящей работе исследовали воздействие различных форм коллагеновых раневых покрытий (мембраны, порошка и гидрогеля) на репаративные процессы в полнослойных эксцизионных кожных ранах у крыс. Наркотизированным животным хирургически удаляли полнослойный кожный лоскут в межлопаточной области спины. На сформированный раневой дефект крысам опытных групп накладывали раневые покрытия из коллагена. Раны животных контрольной группы заживали под струпом. На 7-е и 14-е сутки после нанесения ран животных выводили из эксперимента и проводили забор кожных лоскутов с раной для гистологического исследования. Полученные гистологические препараты подвергали морфологическому и морфометрическому анализу. Результаты проведенного эксперимента показали, что заживление ран под коллагеновыми раневыми покрытиями приводило к ускорению эпителизации раневой поверхности. Данный эффект был наиболее выражен при применении покрытия в виде гидрогеля. Мы предполагаем, что повышенная терапевтическая эффективность данной формы может быть обусловлена созданием влажного микроокружения раны, а также повышенной биодоступностью коллагена для ферментативного гидролиза кератиноцитами.

Ключевые слова: коллаген, раневые покрытия, заживление полнослойных кожных ран.

Введение

Коллаген, основной фибриллярный белок соединительных тканей, применяется для изготовления различных биодеградируемых медицинских изделий на протяжении многих десятилетий, начиная с конца XIX века [7, 15, 17]. Столь длительное и широкое использование данного белка в качестве биоматериала

обусловлено его высокой доступностью, простотой получения, способностью к биорезорбции, а также низкой иммуногенностью [8, 10, 16]. Одним из направлений регенеративной медицины, в котором применяют коллагеносодержащие материалы, является лечение ран кожи различной этиологии [14, 24]. Изначально интерес к коллагеновым ра-

невым покрытиям был связан с их высокой гемостатической и адсорбционной активностью, способностью коллагена в их составе выступать в качестве провизорного матрикса для миграции клеток в регенерирующих тканях [20]. Тем не менее, многочисленные исследования показали, что коллаген способен напрямую воздействовать на биохимические и клеточные процессы, происходящие в тканях раневого дефекта кожи, стимулируя таким образом репаративную регенерацию [22]. Так, коллаген, а также пептиды, возникающие при его ферментативной деградации, стимулируют привлечение лейкоцитов, фибробластов и кератиноцитов в область раны, усиливают пролиферацию данных клеток, а также секрецию ими цитокинов и ростовых факторов, стимулирующих синтез компонентов аутологичного внеклеточного матрикса и эпителизацию [9]. Особого внимания заслуживают опубликованные данные о том, что раневые покрытия на основе коллагена способны связывать и инактивировать протеолитические ферменты в раневом экссудате, обратимо связывать ростовые факторы, защищая их от протеолиза, и, более того, обезвреживать активные формы кислорода [11, 12].

В настоящее время выпускаются разнообразные формы раневых покрытий, содержащих коллаген, имеющие различные эксплуатационные, эргономические и физико-химические характеристики [6, 10, 14]. Однако особенности биологического действия каждого из них на течение острого или хронического раневого процесса подробно не охарактеризованы. В связи с этим для разработки наиболее эффективных терапевтических стратегий лечения ран

при помощи коллагеновых раневых покрытий необходимо проведение сравнительных экспериментальных и клинических исследований их действия на регенерацию кожи.

Целью настоящей работы явилось проведение сравнительного морфологического исследования эффекта различных форм коллагеновых раневых покрытий «КОЛЛОСТ» на репаративные процессы в полнослойных эксцизионных кожных ранах у крыс.

Отечественные медицинские изделия «КОЛЛОСТ» (ООО «БИОФАРМАХОЛДИНГ», Россия) изготавливают из коллагена волокнистого внеклеточного матрикса децеллюляризированной дермы кожи крупного рогатого скота, полученного путем многокомпонентной щелочной очистки [3]. В работе для сравнительного анализа мы использовали различные формы данных изделий, значительно различающиеся по своим структурным свойствам, а именно: «мембрану» – коллагеновую пластину толщиной 1,5 мм; «порошок» – коллаген, измельченный до мелкодисперсного порошка; «гель» – коллагеновый гидрогель.

Материалы и методы

Лабораторные животные

В работе использованы 80 самцов крыс стока Wistar массой 221 ± 26 г, свободных от специфицированной патогенной микрофлоры (SPF). Животные были получены из питомника лабораторных животных «Пушино» (Московская обл.). Крыс содержали в индивидуальных пластиковых клетках ТЗ (ООО «НПК Открытая Наука», Россия) на подстилке Lignocel («JRS», Германия)

при температуре 22-26°C, влажности 35-75%, соблюдении равных по длительности (12/12 ч) светового и темного периодов, а также при неограниченном доступе к деионизованной воде и гранулированному корму («Ассортимент-агро», Россия) в виварии ООО «НИИ Митоинженерии МГУ». Весь материал, поступающий животным, стерилизовали автоклавированием.

Регулирующие стандарты

Обоснованность использования лабораторных животных в исследовании, размер выборок, прижизненные манипуляции, способ выведения животных из эксперимента рассмотрены и утверждены биоэтической комиссией ООО «НИИ Митоинженерии МГУ» (протокол № 87 от 12 октября 2015 г.).

Схема эксперимента

В исследовании использовали модель заживления эксцизионной полнослойной кожной раны [2]. В данной модели у наркотизированных животных хирургически создают кожный дефект, удаляя полнослойный лоскут кожи на спине.

Животных разделяли на контрольную и три опытные группы методом рандомизации. В контрольной группе (n=20) заживление ран происходило под струпом. В опытных группах заживление ран происходило под коллагеновыми раневыми покрытиями «КОЛЛОСТ». На раны опытной группы № 1 (n=20) непосредственно после удаления полнослойного кожного лоскута наносили медицинское изделие «КОЛЛОСТ – мембрана»; опытной группы № 2 (n=20) – «КОЛЛОСТ – порошок»; опытной группы № 3 (n=20) – «КОЛЛОСТ – гель 7%». На 7-е (n=40) и 14-е сут (n=40) после нанесения ран живот-

ных выводили из эксперимента путем ингаляционного воздействия углекислого газа и проводили забор тканей кожного лоскута в области раневого дефекта для гистологического исследования.

Моделирование ран

Крыс наркотизировали внутрибрюшинным введением Золетила (30 мг/кг) в сочетании с Ксилазином (3 мг/кг). Затем в межлопаточной области спины электрической машинкой сбрасывали шерсть и обрабатывали поверхность кожи антисептиком АХД 2000 («Лизоформ», Россия). После этого при помощи скальпеля и хирургических ножниц удаляли со спины полнослойный кожный лоскут диаметром ~20 мм, создав таким образом раневую дефект. Раны животных контрольной группы оставляли непокрытыми. Фрагмент «КОЛЛОСТ – мембраны», предварительно замоченный на 15 мин в 0,9% NaCl (согласно инструкции производителя), вырезанный по форме и размерам дефекта кожи, помещали на раны крыс опытной группы № 1. Раны опытных групп №№ 2 и 3 полностью заполняли «порошком» и «гелем» «КОЛЛОСТ» соответственно. Коллагеновые раневые покрытия фиксировали пластырем Hydrofilm («Paul Hartmann», Германия) и оставляли на ранах до момента выведения животных из эксперимента.

Гистологическое исследование

После выведения из эксперимента со спины животных иссекали полнослойный кожный лоскут, содержащий раневую дефект. Вырезанные фрагменты тканей фиксировали в 10% формалине на фосфатном буфере (pH=7,2) в течение 48 ч. После фиксации полученный фрагмент кожи разделяли на две половины острым лезвием в попереч-

ной плоскости через середину раневой поверхности. Затем ткани подвергали стандартной гистологической обработке и заливали в парафин таким образом, чтобы срезанная сторона лоскута с раневой поверхностью располагалась на той стороне блока, с которой были впоследствии получены срезы при микротомировании. В дальнейшем при помощи микротомы RM2245 («Leica», Германия) изготавливали гистологические срезы полученных образцов толщиной 3 мкм и окрашивали их гематоксилином и эозином, а также по Ван Гизону. Гистологические препараты анализировали на микроскопе Axio Scope A1 («Carl Zeiss», Германия). Репрезентативные микрофотографии получали при помощи цифровой камеры высокого разрешения MRc.5 («Carl Zeiss», Германия).

Морфометрическое исследование

Для количественной оценки репаративных процессов в кожных ранах проводили морфометрическое исследование полученных препаратов на цифровых микрофотоснимках, полученных с помощью камеры MRc.5. Для анализа площади грануляционной и рубцовой тканей, а также эпителизации на малом увеличении микроскопа (объектив $\times 4$) делали серию микрофотографий, полностью захватывающих всю плоскость каждого гистологического среза. Для анализа нейтрофильной инфильтрации и показателей васкуляризации с помощью объектива $\times 40$ получали по 2 микрофотографии краевых зон каждого раневого дефекта и по 2 микрофотографии их центральной зоны. Области съемки при этом выбирали случайным образом.

Морфометрический анализ проводили на полученных микрофотографиях

при помощи программы AxioVision 3.0 («Carl Zeiss», Германия). Для оценки интенсивности новообразования соединительной ткани в зоне раневого дефекта измеряли в мм^2 площадь, занимаемую грануляционной (на 7-е сут) и рубцовой (на 14-е сут) тканями на срезе. Для оценки скорости регенерации эпидермиса рассчитывали степень эпителизации раневой поверхности (в %) как отношение длины эпителизированной поверхности раны к неэпителизированной. Для оценки воспалительной нейтрофильной инфильтрации ран подсчитывали суммарное число нейтрофилов на анализируемых участках срезов. Выражали полученные данные в виде числа нейтрофилов, приходящегося на 1 мм^2 площади среза. Для оценки васкуляризации раневого дефекта измеряли число профилей сосудов, а также их площадь на анализируемых участках срезов. Затем рассчитывали число профилей сосудов, приходящееся на 1 мм^2 площади среза, и плотность сосудов как процентное отношение суммарной измеренной площади сосудов и общей площади проанализированных участков срезов.

Статистическая обработка

Статистическую обработку полученных результатов производили при помощи программы GraphPad Prism, версия 6.0. Для анализа нормальности распределения полученных выборок применяли критерий Шапиро-Уилка. Для анализа равенства дисперсий применяли тест Левена. Для оценки статистической значимости отличий между выборками использовали однофакторный дисперсионный анализ с последующим попарным сравнением групп по Даннету. Критическое значение уровня статистической значимости при провер-

ке гипотез о нормальности распределения полученных экспериментальных данных, равенстве дисперсий, а также отсутствии различий между экспериментальными группами принимали равным $p=0,05$.

Результаты исследований

Гистологическое исследование поперечных срезов центральной области ран показало, что на 7-е сут заживления во всех исследованных группах животных дно раневого дефекта на всем своем протяжении заполнено грануляционной тканью (рис.). При этом ткани интактной кожи, окружающей раны, не имеют каких-либо видимых патологических изменений. В новообразованной соединительной ткани преобладают веретеновидные низкодифференцированные фибробласты, между которыми присутствует небольшое количество внеклеточного матрикса, окрашивающегося пикрофуксином в слабый розовый цвет. Также в грануляционной ткани присутствует большое количество сосудов микроциркуляторного русла и клеток смешанного воспалительного инфильтрата, представленных преимущественно нейтрофилами, моноцитами/макрофагами и лимфоцитами. Наблюдается краевая эпителизация ран пластами утолщенного эпидермиса (в некоторых случаях – с явлением погружного роста), наиболее выраженная в экспериментальной группе, получавшей раневую повязку «КОЛЛОСТ – гель 7%» (рис.).

На 14-е сут заживления раневой дефект у всех животных заполнен незрелой рубцовой тканью (рис.). В соединительнотканном регенерате преобладают переплетающиеся, ориентированные преимущественно параллельно повер-

ности раны зрелые пучки коллагеновых волокон, окрашивающиеся пикрофуксином в красный цвет. Между волокнами внеклеточного матрикса присутствуют зрелые фибробласты. По сравнению с 7-ми сут заживления общее число клеточных форм, клеток воспалительного инфильтрата, а также сосудов микроциркуляторного русла в новообразованной соединительной ткани значительно снижено. Количество рубцовой ткани, а также её толщина в различных участках среза сильно варьирует у отдельных животных внутри всех исследованных групп. Поверхность ран в разной степени покрыта новообразованным эпидермисом, местами утолщенным и в некоторых случаях – с явлениями погруженного роста. У крыс контрольной группы полностью эпителизированные раны не выявлены. В то же время на 14-е сут в опытной группе № 1 («мембрана») поверхность ран полностью закрыта эпидермисом у трех животных, в группе № 2 («порошок») – также у трех животных, а в группе № 3 («гель») – у пяти животных из десяти.

Морфометрический анализ показателей репаративной регенерации кожи (табл.) выявил статистически достоверное увеличение степени эпителизации раневой поверхности в опытных группах № 2 ($p=0,004$) и № 3 ($p=0,002$) по сравнению с контрольной группой на седьмые сутки заживления. В свою очередь, достоверность различий между контролем и группой № 1 также приближалась к уровню статистической значимости ($p=0,059$). Кроме того, на данном этапе было обнаружено достоверное уменьшение площади грануляционной ткани на срезах ран животных из групп «порошок» ($p=0,048$) и «гель» ($p=0,009$)

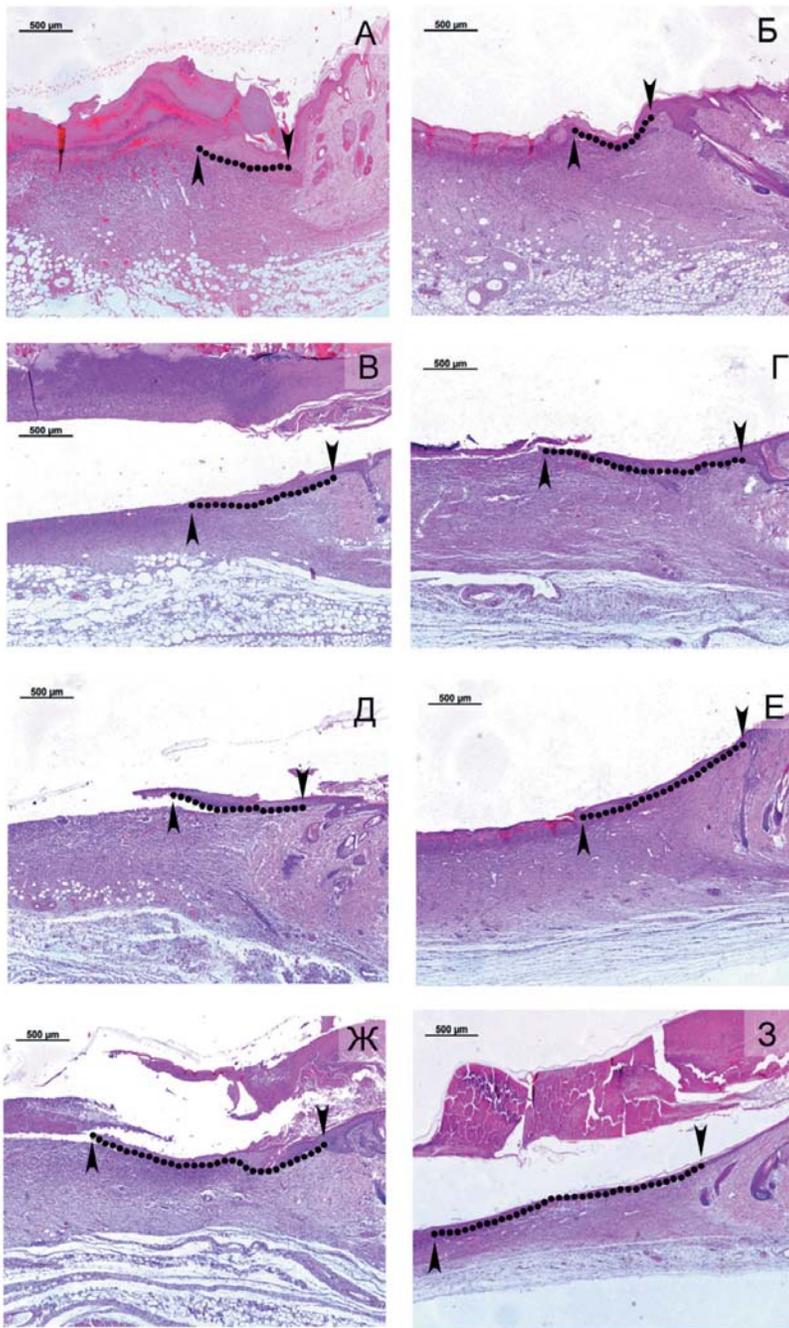


Рис. Гистологические срезы (репрезентативные микрофотографии) центральной области ран животных контрольной группы (А, Б), а также опытных групп «мембрана» (В, Г), «порошок» (Д, Е) и «гель 7%» (Ж, 3) на 7-е (А, В, Д, Ж) и 14-е (Б, Г, Е, 3) сутки заживления. Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув. x40. Образцы фиксированы 10% формалином на фосфатном буфере в течение 48 ч. Стрелками и пунктирной линией отмечены пласты регенерирующего эпидермиса.

Таблица
Морфометрические показатели репаративных процессов в области раневого дефекта кожи на 7-е и 14-е сут заживления

Морфометрический параметр	Срок (сут)	Группы животных			
		Контроль	«Мембрана»	«Порошок»	«Гель»
Степень эпителизации раны, %	7	18,5±4,4	24,2±4,5	27,4±6,6*	28,6±8,6*
	14	42,5±23,0	71,6±29,5*	65,4±27,6	84,1±20,5*
Площадь грануляционной (7-е сут) или рубцовой (14-е сут) ткани, мм ² /срез	7	17,8±5,9	12,7±5,3	12,5±4,3*	10,5±6,4*
	14	8,0±2,5	8,3±3,6	7,1±4,4	6,0±2,9
Число нейтрофилов, ед./мм ²	7	662,2±558,8	510,8±342,7	644,9±378,2	718,4±373,7
	14	562,9±539,5	649,3±489,4	450,1±331,8	290,2±303,5
Число профилей сосудов, ед./мм ²	7	5,8±2,6	5,2±3,2	6,6±2,3	7,0±4,2
	14	6,8±4,0	3,6±2,5	4,0±3,4	4,3±2,9
Объемная плотность сосудов, %	7	6,8±3,7	8,0±3,7	5,9±1,7	8,4±5,5
	14	4,8±2,7	2,8±2,8	3,3±3,7	2,2±1,9

Примечание: * – отличие от контрольной группы статистически достоверно ($p < 0,05$). Данные представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартное отклонение.

по сравнению с крысами контрольной группы (табл.).

Количественное гистологическое исследование ранозаживления на 14-е сут эксперимента показало статистически достоверное увеличение степени эпителизации ран в опытных группах «мембрана» ($p=0,026$) и «гель» ($p=0,002$) по сравнению с контрольными животными (табл.). При этом среднее значение данного показателя в группе «гель» двукратно превосходило таковое в контрольной группе.

Обсуждение результатов

Восстановление эпителиального покрова над областью раневого дефекта кожи является ключевым параметром, характеризующим успешность его заживления. Нарушение процессов эпителизации является одним из факторов, в значительной степени способствующим

их развитию длительно незаживающих ран [19].

Результаты проведенного морфологического исследования свидетельствуют об усилении процесса регенерации эпидермиса в полнослойных кожных ранах у крыс при их заживлении под различными формами коллагеновых раневых покрытий. Вместе с тем, на обоих исследованных сроках наиболее выраженная стимуляция эпителизации раневых дефектов наблюдалась при применении коллагенового гидрогеля. Статистически достоверное улучшение эпителизации при использовании раневых покрытий в форме порошка выявлено на более раннем (7-е сут), а при использовании мембраны – на более позднем (14-е сут) сроках заживления.

Основным клеточным компонентом эпидермиса, составляющим его структурную основу и принимающим основ-

ное участие в его физиологической и репаративной регенерации, являются кератиноциты. Из литературы известно, что контакт кератиноцитов с коллагеном типа I необходим для инициации процесса регенерации поврежденного эпидермиса [21]. Данный факт может отчасти обуславливать выявленные в настоящем эксперименте репаративные свойства коллагеновых раневых покрытий, направленные на ускорение восстановления эпителиального покрова раневого дефекта кожи. Ранее было показано, что ферментативная деградация коллагена типа I матриксными металлопротеиназами, выделяемыми кератиноцитами, обязательно предшествует началу направленной миграции эпителиальных клеток в область раны [21, 23]. Можно предположить, что различная доступность коллагена, присутствующего в составе исследованных форм раневых покрытий, для деградации данными ферментами приводит к наблюдаемым отличиям в эффекте медицинских изделий на показатель эпителизации ран на разных сроках эксперимента. Так, гидратация раневого покрытия раневым эксудатом, содержащим протеолитические ферменты, очевидно, осуществляется быстрее в случае заполнения раны мелкодисперсным порошком, нежели при наложении на неё «монолитной» коллагеновой пластины («мембраны»). Раневое покрытие в форме коллагенового гидрогеля при аппликации на раневую поверхность уже содержит в своем составе значительное количество влаги, способствуя, таким образом, эффективному поступлению коллагена в область повреждения, а также ускорению его ферментативного гидролиза. Необходимо отметить, что само по себе увлажне-

ние раневого дефекта широко известно как отдельный фактор, стимулирующий процессы репаративной регенерации кожи, включая и миграцию кератиноцитов [18, 25]. В связи с этим мы предполагаем, что эффективное обеспечение заживления ран в условиях влажной среды при применении коллагенового гидрогеля также может обуславливать повышенную эффективность данной формы раневого покрытия к стимуляции эпителизации.

Помимо эффекта коллагеновых раневых покрытий на показатель эпителизации ран, было показано статистически достоверное снижение количества грануляционной ткани в раневых дефектах кожи, заживавших под формами порошка и геля на 7-е сут эксперимента. В то же время не выявлено значимых отличий между группами по показателям воспалительной нейтрофильной инфильтрации и васкуляризации новообразованной соединительной ткани. На 14-е сут заживления не обнаружено достоверных отличий по количеству сформированной рубцовой ткани. Ранее при исследовании биохимических свойств коллагенсодержащего раневого покрытия PROMOGRAN («Johnson & Johnson», Великобритания) была показана способность коллагена наряду с окисленной регенерированной целлюлозой нековалентно обратимо связывать факторы роста [11, 12]. Экстраполируя эти данные на результаты, полученные в настоящем эксперименте, можно предположить, что снижение скорости новообразования соединительной ткани на раннем этапе заживления ран при нанесении медицинских изделий на основе коллагена в форме порошка и геля вызвано частичным временным депонированием ростовых

факторов, способствующих стимуляции новообразования соединительной ткани (например, PDGF и TGF β 1). Последующее же высвобождение ростовых факторов приводит к нормализации процесса регенерации соединительной ткани, приводящей к нивелированию отличий между группами на 14-е сут заживления. Способность к обратимому связыванию факторов роста коллагеном в составе раневых покрытий может играть главенствующую роль в их защите от протеолиза в условиях длительно незаживающих ран различной этиологии, обуславливая терапевтическую эффективность медицинских изделий на основе коллагена. Косвенно в пользу данного предположения говорят опубликованные данные об ускорении заживления трофических язв и пролежней в клинике при применении различных форм раневых покрытий «КОЛЛОСТ» [1, 4, 5, 13].

Заключение

Сравнительное морфологическое исследование воздействия коллагеновых раневых покрытий в форме мембраны (пластины), порошка и гидрогеля на репаративные процессы в полнослойных эксцизионных кожных ранах у крыс показало, что в данной экспериментальной модели терапевтическое действие настоящих медицинских изделий направлено на стимуляцию эпителизации раневой поверхности. При этом наибольшую эффективность проявляет раневое покрытие в виде коллагенового гидрогеля.

Список литературы

1. **Богомолов М.С.** Сравнительный анализ эффективности современных перевязочных средств при лечении венозных трофических язв // Раны и раневые инфекции. – 2015. – Т. 2. – № 4. – С. 33-39.
2. **Бурякина А.В., Фролова Н.Ю., Мельникова Т.И., Вишневская Е.К., Авенирова Е.Л., Сивак К.В., Караваева А.В., Зебрев А.И., Моисеева М.Н.** Методические рекомендации по доклиническому изучению дерматотропных лекарственных средств // В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – М.: Гриф и К. – 2012. – Т. 1. – С. 738-744.
3. **Калмыкова Н.В., Демьяненко И.А., Шевлягина Н.В., Андреевская С.Г., Суслев А.П.** Сравнительный анализ эффективности простого и многокомпонентного методов щелочной децеллюляризации на примере очистки волокнистого внеклеточного матрикса дермы // Морфологические ведомости. – 2016. – Т. 24. – № 4. – С. 36-45.
4. **Корейба К.А., Кудыкин М.Н., Минабутдинов А.Р.** Лечение раневых дефектов у больных с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы с применением биопластического материала // Хирургия. – 2015. – № 7. – С. 69-74.
5. **Корейба К.А., Минабутдинов А.Р.** Биопластические материалы на основе нативного коллагена I типа при лечении больных с синдромом диабетической стопы // Хирургия. – 2014. – № 10. – С. 83-87.
6. **Легонькова О.А., Васильев В.Г., Асанова Л.Ю.** Исследование эксплуатационных свойств полимерных перевязочных средств // Раны и раневые инфекции. – 2015. – Т. 2. – № 2. – С. 32-39.
7. **Хилькин А.М., Шехтер А.Б., Истратов Л.П., Леменив В.Л.** Коллаген и его применение в медицине. – М.: Медицина. – 1976. – 256 с.
8. **Abou Neel E.A., Bozec L., Knowels J.C., Syed O., Mudera V., Day R., Hyun J.K.** Collagen – emerging collagen based therapies hit the patient // Adv. drug deliv. rev. – 2013. – V. 65. – No. 4. – Pp. 429-456.
9. **Brett D.** A review of collagen and collagen-based wound dressings // Wounds. – 2008. – V. 20. – No. 12. – Pp. 347-356.

10. *Chattopadhyay S., Raines R.T.* Collagen-based biomaterials for wound healing // *Biopolymers*. – 2014. – V. 101. – No. 8. – Pp. 821-833.
11. *Cullen B., Smith R., McCulloch E., Silcock D., Morrison L.* Mechanism of action of PROMOGRAN, a protease modulating matrix, for the treatment of diabetic foot ulcers // *Wound repair regen.* – 2002. – V. 10. – No. 1. – Pp. 16-25.
12. *Cullen B., Watt P.W., Lundqvist C., Silcock D., Schmidt R.J., Bogan D., Light N.D.* The role of oxidized regenerated cellulose/collagen in chronic wound repair and its potential mechanism of action // *Int. J. Biochem. cell biol.* – 2002. – V. 34. – No. 12. – Pp. 1544-1556.
13. *Dibirov M.D., Gadzhimuradov R.U., Korieba K.A., Minabutdinov A.R.* Biomedical technologies in the treatment of skin and soft tissue defects in patients with diabetic foot syndrome // *IJBM*. – 2016. – V. 6. – No. 1. – Pp. 41-45.
14. *Holmes C., Wrobel J.S., Maceachem M.P., Boles B.R.* Collagen-based wound dressings for the treatment of diabetes-related foot ulcers: a systematic review // *Diabetes metab. syndr. obes.* – 2013. – V. 6. – Pp. 17-29.
15. *Lister J.* An address on the catgut ligature // *Br. Med. J.* – 1881. – V. 1. – No. 1049. – Pp. 183-185.
16. *Lynn A.K., Yannas I.V., Bonefield W.* Antigenicity and immunogenicity of collagen // *J. Biomed. mater. res. B appl. biomater.* – 2004. – V. 71. – No. 2. – Pp. 343-354.
17. *Macewen W.* Clinical lectures on some points connected with the treatment of wounds // *Br. Med. J.* – 1881. – V. 1. – No. 1049. – Pp. 185-187.
18. *Mosti G.* Wound care in venous ulcers // *Phlebology*. – 2013. – V. 28. – Suppl. 1. – Pp. 79-85.
19. *Pastar I., Stojadinovic O., Yin N.C., Ramirez H., Nusbaum A.G., Sawaya A., Patel S.B., Khalid L., Isseroff R.R., Tomic-Canic M.* Epithelialization in Wound Healing // *Adv. wound care.* – 2014. – V. 3. – No. 7. – Pp. 445-464.
20. *Patino M.G., Neiders M.E., Andreana S., Noble B., Cohen R.E.* Collagen as an implantable material in medicine and dentistry // *J. Oral Implantol.* – 2002. – V. 28. – No. 5. – Pp. 220-225.
21. *Plicher B.K., Dumin J.A., Sudbeck B.D., Krane S.M., Welgus H.G., Parks W.C.* The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on type I collagen matrix // *J. Cell biol.* – 1997. – V. 137. – No. 6. – Pp. 1445-1457.
22. *Rangaraj A., Harding K., Leaper D.* Role of collagen in wound management // *Wounds UK*. – 2011. – V. 7. – No. 2. – Pp. 54-63.
23. *Rohani M.G., Parks W.C.* Matrix remodeling by MMPs during wound repair // *Matrix Biol.* – 2015. – V. 44-46. – Pp. 113-121.
24. *Ruszczak Z.* Effect of collagen matrices on dermal wound healing // *Adv. drug deliv. rev.* – 2003. – V. 55. – No. 12. – Pp. 1595-1611.
25. *Vasconcelos A., Cavaco-Paulo A.* Wound dressings for a proteolytic-rich environment // *Appl. microbiol. biotechnol.* – 2011. – V. 90. – No. 2. – Pp. 445-460.

References

1. *Bogomolov M.S.* Sravnitel'nyj analiz jefektivnosti sovremennyh perevjazozhnyh sredstv pri lechenii venoznyh troficheskikh jazv [A comparative analysis of efficiency of modern dressing-room agents at treatment of venous trophic ulcers]. Rany i ranevye infekcii [Wounds and wound fevers]. 2015. T. 2. No. 4. Pp. 33-39. (In Russian).
2. *Burjakina A.V., Frolova N.Ju., Mel'nikova T.I., Vishnevskaja E.K., Avenirova E.L., Sivak K.V., Karavaeva A.V., Zebrev A.I., Moiseeva M.N.* Metodicheskie rekomendacii po doklinicheskomu izucheniju dermatotropnyh lekarstvennyh sredstv [Methodical references on preclinical studying of dermatotropic medicines]. V kn.: Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv [In the book: Guide to carrying out preclinical study of medicines]. Moscow: Grif i K. 2012. T. 1. Pp. 738-744. (In Russian).

3. **Kalmykova N.V., Dem'janenko I.A., Shev-ljagina N.V., Andreevskaja S.G., Sus-lov A.P.** Sravnitel'nyj analiz jeffektivnosti prostogo i mnogokomponentnogo metodov shhelochnoj decelljuljarizacii na primere ochistki voloknistogo vnekletocnogo matriksa dermy [The comparative analysis of efficiency of simple and multicomponent methods of alkaline decellularization on the example of purification of a fibrous extracellular matrix of a derma]. *Morfologicheskie vedomosti [Morphological sheets]*. 2016. T. 24. No. 4. Pp. 36-45. (In Russian).
4. **Korejba K.A., Kudykin M.N., Minabutdinov A.R.** Lechenie ranevyh defektov u bol'nyh s nejroishemicheskoy formoj sindroma diabeticheskoy stopy s primeneniem bioplasticheskogo materiala [Treatment of wound defects in patients with a neuroischemic form of the diabetic foot syndrome with use of bioplastic material]. *Hirurgija [Surgery]*. 2015. No. 7. Pp. 69-74. (In Russian).
5. **Korejba K.A., Minabutdinov A.R.** Bioplasticheskie materialy na osnove nativnogo kollagena I tipa pri lechenii bol'nyh s sindromom diabeticheskoy stopy [Bioplastic materials based on native collagen of the type I in the treatment of patients with diabetic foot syndrome]. *Hirurgija [Surgery]*. 2014. No. 10. Pp. 83-87. (In Russian).
6. **Legon'kova O.A., Vasil'ev V.G., Asanova L.Ju.** Issledovanie jekspluatacionnyh svojstv polimernyh perevzochnyh sredstv [Research of the operational properties of polymeric dressing-room agents]. *Rany i ranevye infekcii [Wounds and wound infections]*. 2015. T. 2. No. 2. Pp. 32-39. (In Russian).
7. **Hil'kin A.M., Shehter A.B., Istranov L.P., Lemenev V.L.** Kollagen i ego primenenie v medicine [A collagen and its use in medicine]. Moscow: Medicina. 1976. 256 p. (In Russian).
8. **Abou Neel E.A., Bozec L., Knowels J.C., Syed O., Mudera V., Day R., Hyun J.K.** Collagen – emerging collagen based therapies hit the patient. *Adv. drug deliv. rev.* 2013. V. 65. No. 4. Pp. 429-456.
9. **Brett D.** A review of collagen and collagen-based wound dressings. *Wounds*. 2008. V. 20. No. 12. Pp. 347-356.
10. **Chattopadhyay S., Raines R.T.** Collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*. 2014. V. 101. No. 8. Pp. 821-833.
11. **Cullen B., Smith R., McCulloch E., Silcock D., Morrison L.** Mechanism of action of PROMOGRAN, a protease modulating matrix, for the treatment of diabetic foot ulcers. *Wound repair regen.* 2002. V. 10. No. 1. Pp. 16-25.
12. **Cullen B., Watt P.W., Lundqvist C., Silcock D., Schmidt R.J., Bogan D., Light N.D.** The role of oxidized regenerated cellulose/collagen in chronic wound repair and its potential mechanism of action. *Int. J. Biochem. cell biol.* 2002. V. 34. No. 12. Pp. 1544-1556.
13. **Dibirov M.D., Gadzhimuradov R.U., Korieba K.A., Minabutdinov A.R.** Biomedical technologies in the treatment of skin and soft tissue defects in patients with diabetic foot syndrome. *IJBM*. 2016. V. 6. No. 1. Pp. 41-45.
14. **Holmes C., Wrobel J.S., Maceachem M.P., Boles B.R.** Collagen-based wound dressings for the treatment of diabetes-related foot ulcers: a systematic review. *Diabetes metab. syndr. obes.* 2013. V. 6. Pp. 17-29.
15. **Lister J.** An address on the catgut ligature. *Br. Med. J.* 1881. V. 1. No. 1049. Pp. 183-185.
16. **Lynn A.K., Yannas I.V., Bonefield W.** Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J. Biomed. mater. res. B appl. biomater.* 2004. V. 71. No. 2. Pp. 343-354.
17. **Macewen W.** Clinical lectures on some points connected with the treatment of wounds. *Br. Med. J.* 1881. V. 1. No. 1049. Pp. 185-187.
18. **Mosti G.** Wound care in venous ulcers. *Phlebology*. 2013. V. 28. Suppl. 1. Pp. 79-85.
19. **Pastar I., Stojadinovic O., Yin N.C., Ramirez H., Nusbaum A.G., Sawaya A., Patel S.B., Khalid L., Isseroff R.R., Tomic-Canic M.** Epithelialization in Wound

- Healing. Adv. wound care. 2014. V. 3. No. 7. Pp. 445-464.
20. *Patino M.G., Neiders M.E., Andreana S., Noble B., Cohen R.E.* Collagen as an implantable material in medicine and dentistry. J. Oral Implantol. 2002. V. 28. No. 5. Pp. 220-225.
21. *Plicher B.K., Dumin J.A., Sudbeck B.D., Krane S.M., Welgus H.G., Parks W.C.* The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on type I collagen matrix. J. Cell Biol. 1997. V. 137. No. 6. Pp. 1445-1457.
22. *Rangaraj A., Harding K., Leaper D.* Role of collagen in wound management. Wounds UK. 2011. V. 7. No. 2. Pp. 54-63.
23. *Rohani M.G., Parks W.C.* Matrix remodeling by MMPs during wound repair. Matrix Biol. 2015. V. 44-46. Pp. 113-121.
24. *Ruszczak Z.* Effect of collagen matrices on dermal wound healing. Adv. drug deliv. rev. 2003. V. 55. No. 12. Pp. 1595-1611.
25. *Vasconcelos A., Cavaco-Paulo A.* Wound dressings for a proteolytic-rich environment. Appl. microbiol. biotechnol. 2011. V. 90. No. 2. Pp. 445-460.

The stimulating effect of various forms of collagenic wound coverings on the epithelization process of skin wounds

N.V. Kalmykova, A.A. Andreyev-Andrievskiy, I.A. Demyanenko, V.N. Manskikh, E.A. Lagereva, A.S. Popova, Yu.S. Khats, A.P. Suslov

Collagen represents the main structural protein of connective tissues. The chemical and biological properties of collagen determine its ability to stimulate reparative skin regeneration. Currently, a lot of wound dressings based on collagen are available for the treatment of wounds of various etiologies. However, differences in biological action of various types of wound dressings are not described in detail in the conventional *in vivo* models. In the present study we examined the effect of different forms of collagen wound dressings, namely, membrane, powder and hydrogel, on reparative processes in full-thickness excisional skin wounds in rats. The full-thickness skin flap in the interscapular region was surgically removed in the anesthetized animals. Wounds of rats from the experimental groups were superimposed wound dressings from collagen. The wounds in the animals of the control group were healed under the scab. On the 7th and 14th day of the experiment the animals were euthanized and the skin flaps containing wounds were excised for histological examination. The obtained histological slides were subjected to morphological and morphometric analysis. The results of the experiment revealed that the collagen wound dressings significantly accelerate epithelization of wound surface. This effect was most pronounced when applying the hydrogel as wound coverage. We hypothesize that the increased therapeutic efficacy of this form may be due to the creation of a moist wound microenvironment, as well as increased bioavailability of collagen for enzymatic hydrolysis by keratinocytes.

Key words: collagen, wound dressings, healing of full-thickness skin wounds.