

Антипова Л.В., Титов С.А., Пискова М.А., Сухов И.В.

## ИЗУЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОДИФИЦИРОВАННОГО КОЛЛАГЕНА ПРЭСНОВОДНЫХ РЫБ КАК МАТЕРИАЛА ДЛЯ СРЕДСТВ ЛИЧНОЙ ГИГИЕНЫ

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», 394036, Воронеж

**Введение.** Проведены исследования взаимодействия коллагена пресноводных рыб с водой для определения перспектив его использования как материала впитывающего слоя средств личной гигиены, а также противопролежневых повязок и простыней для людей с ограниченной подвижностью. Предложен способ обработки шкур пресноводных рыб для получения материала с повышенной водопоглощающей способностью, изучены ранозаживляющие свойства полученного материала, его аллергенные свойства, проведены испытания на соответствие санитарно-эпидемиологическим требованиям.

**Материал и методы.** Исследуемый материал получали последовательной обработкой шкур рыб в слабых растворах щелочей и органических кислот. Для исследования ранозаживляющих свойств полученных коллагеновых субстанций использовались гистологические, гистохимические и планиметрические методы. Гистохимические исследования заключались в изучении содержания РНК в пределах росткового слоя Мальпиги эпидермиса, которое определяли по методике с применением Азура В, а также содержания сульфидрильных групп белков по методу Швермана и Фредерика. Аллергенность определяли методом накожных аппликаций, соответствие нормам санитарно-эпидемиологической безопасности – согласно нормативно-правовым документам.

**Результаты.** После обработки в растворах кислот и щелочей величина набухаемости, отражающая влагоемкость материала, повышается почти в 10 раз и составляет 30 г на 1 г сухого вещества. Репаративные процессы в мягких тканях под воздействием полученной коллагеновой субстанции из рыбного сырья ускоряются. Это проявлялось в стимуляции коллагеногенеза, активации метаболических процессов. Аллергенное и токсическое действие полученный материал не оказывает, он соответствует нормам санитарно-эпидемиологической безопасности.

**Обсуждение.** Описанные свойства рыбного коллагена связаны с особенностью расположения полипептидных цепей его молекулы, которые менее прочно связаны по сравнению с молекулой коллагена млекопитающих.

**Выводы.** В результате проведенных исследований показано, что коллаген пресноводных рыб, модифицированный обработкой в растворах щелочей и органических кислот, может быть применен как материал для впитывающего слоя средств личной гигиены и противопролежневых средств.

Ключевые слова: коллаген пресноводных рыб; сорбция; набухаемость; безопасность; средства личной гигиены.

**Для цитирования:** Антипова Л.В., Титов С.А., Пискова М.А., Сухов И.В. Изучение использования модифицированного коллагена пресноводных рыб как материала для средств личной гигиены. *Гигиена и санитария*. 2018; 97(8): 714-720. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-8-714-720>

**Для корреспонденции:** Антипова Людмила Васильевна, доктор техн. наук, проф., гл. науч. сотр., директор НОЦ «Живые системы» ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет инженерных технологий. E-mail: [antipova.L54@yandex.ru](mailto:antipova.L54@yandex.ru)

Antipova L.B., Titov S.A., Piskova M.A., Sukhov I.V.

### A PROMISING USE OF COLLAGEN SUBSTANCES IN THE MANUFACTURING OF PERSONAL HYGIENE MEANS

Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, 394036, Russian Federation

There were performed studies of the interaction of collagen of freshwater fish with water to determine the prospects for its use as an absorbent layer of personal care products, a method for treating freshwater fish skins for obtaining a material with an increased water-absorbing capacity has been developed; thermal stability, allergenic properties of this material have been studied; toxicity tests have been carried out. Methods of thermogravimetry, differential scanning calorimetry, spectroscopy in the visible and ultraviolet region of the spectrum of light waves were used. Allergenicity was determined by the method of cutaneous applications, toxicity - according to State Standards. The most part of moisture was shown to be bound by adsorption or osmotic pathways, only 7% of moisture bound by the samples is retained in the capillaries. The sufficiently high binding energies of about 4 J/mol suggest the ability of the functional groups of fish collagen to create a powerful hydrated membrane. For the loosening of the material, sequential treatment of fish skin in weak solutions of alkalis and organic acids is suggested, after which the swelling capacity reflecting the moisture capacity of the material rises by almost 10 times and amounts to 30 g per 1 g of dry matter. The aggregation of polydisperse systems of processed collagen in the temperature range of 38–46°, which can lead to a decrease in moisture capacity with an increase in temperature to these values, is found. The obtained material has no allergic neither toxic effects. As a result of the studies, it was shown that collagen of freshwater fish, modified by treatment in alkali and organic acid solutions, can be used as a material for the absorbent layer of personal care products under the condition of sparing temperature regimes during their manufacture.

Key words: collagen; freshwater fish; sorption; swellingness; safety; personal hygiene.

**For citation:** Antipova L.B., Titov S.A., Piskova M.A., Sukhov I.V. A promising use of collagen substances in the manufacturing of personal hygiene means. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2018; 97(8): 714-720. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-8-714-720>

**For correspondence:** Lyudmila V. Antipova, MD, Ph.D., DSci., professor, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, 394036, Russian Federation. Email: [antipova.L54@yandex.ru](mailto:antipova.L54@yandex.ru)

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

Received: 01 March 2018

Accepted: 02 July 2018

## Введение

Совершенствование и создание новых средств личной гигиены является актуальной многоотраслевой задачей. В частности, такие средства гигиены, как прокладки, тампоны, салфетки, памперсы и т. п., поглощают выделения организма и поэтому должны иметь как можно большую влагоёмкость, желателен с дезодорирующим эффектом и в то же время не должны доставлять дискомфорт, вызывать аллергию и ухудшать состояние кожи человека. В настоящее время совершенствование, например, прокладок идёт по пути изменения формы и конструкции [1–3], однако подбор материалов слоя, впитывающего влагу, для таких средств личной гигиены уделяется значительно меньшее внимание, а отечественное их производство отсутствует. В настоящее время эти материалы можно разделить на 3 категории: синтетические (поливиниловые спирты, полиэтиленоксиды, сшитые полиакрилаты) [2]; натуральные (целлюлоза, гуаровая или ксантановая камеди); модифицированные натуральные (сшитые крахмалы, сульфитная целлюлоза, крафт-целлюлоза) [1]. Могут использоваться и смеси полимеров синтетического и натурального происхождения. Частицы этих полимеров, (их еще называют сверхадсорбирующими полимерами) могут быть в виде порошка, зёрен, гранул или волокон. Использование смесей в виде волокон встречается чаще других, так как в этом случае образуется разветвлённая капиллярная сеть, способная дополнительно удерживать значительное количество влаги в макрокапиллярах.

При выборе материалов для впитывающего слоя предпочтение, на наш взгляд, следует отдавать натуральным или модифицированным натуральным материалам. Они, как правило, не вызывают аллергии, экологически чистые, и вообще прекрасно воспринимаются человеческим телом. К натуральным материалам, которые могли бы использоваться в средствах личной гигиены, относится коллаген – белок соединительных тканей животных, рыб и птиц, в организме которых он в наибольшей степени распространён [4].

Вместе с тем коллаген сосредоточен в побочных продуктах и отходах перерабатывающих отраслей АПК [5], базирующихся на переработке этих объектов. Поэтому можно считать, что источники коллагена доступны и недороги, использование их для получения коллагеновых субстанций способствует уменьшению загрязнения окружающей среды. Широкий спектр технологической переработки и разнообразие источников [6–8] даёт возможность применения коллагена не только в составе впитывающих слоёв, но и в других слоях средств личной гигиены. Коллаген играет важную роль в осуществлении репаративной функции соединительной ткани [9], полностью совместим с кожей человека [10], поэтому ожидается, что эффекты раздражения, дискомфорта и прочие негативные действия на кожу как систему будут минимальны.

Коллаген – фибриллярный белок, образует волокнистый материал [11–13], т. е. он так же, как и целлюлоза может быть сформирован в виде прядей, в зазоры между которыми проникает вода. Кроме того, подобно целлюлозе, он способен набухать в воде за счёт проникновения воды в структуру самого материала в связи с наличием большого числа функциональных групп и их повышенной гидратационной способности [14, 15]. Это создаёт предпосылки для применения коллагена во впитывающих слоях средств личной гигиены как материала, способного конкурировать с наиболее широко используемой в настоящее время целлюлозой и другими известными материалами.

Наибольший интерес в этом отношении представляет рыбный коллаген благодаря особым реологическим свойствам, обладающим его технологическую обработку (он более низкомолекулярный, чем коллаген животных, не требует обязательного гидролиза при переработке сырья, а материалы из него более эластичны) [16]. Однако открытым остается вопрос о методах его обработки для обеспечения и повышения его водопоглощающей способности.

Широкому применению коллагена в косметической, медицинской и пищевой промышленности препятствует его возможная аллергенность. Так, при проведении мезотерапевтических процедур с инъекциями коллагена примерно у 6% женщин раз-

вивается аллергическая реакция [17]. Но при этом следует учитывать, что, как правило, это относится к коллагену животных или морских рыб. В то же время, например, в [18, 19] имеются отдельные сведения о том, что коллаген пресноводных рыб проявляет минимальную аллергенность или её полное отсутствие по сравнению с коллагеном морских рыб. Результаты исследований аллергенности коллагена, полученного из пресноводных рыб и обработанного для повышения водопоглощающей способности, авторам статьи неизвестно. Кроме того, практически не исследованы микробиологические и токсикологические показатели коллагена рыб внутренних водоёмов.

Еще одной весьма интересной областью применения коллагена является создание противопролежневых повязок и простыней для людей с ограниченной подвижностью. Высокие требования к водопоглощающей способности сохраняются и в этом случае. Существуют гемостатические коллагеновые губки [20], оказывающие кровоостанавливающее и асептическое действие, а также стимулирующие процессы регенерации тканей. Однако они изготавливаются путём гидролиза коллагена спилка шкур крупного рогатого скота. Процесс гидролиза чрезвычайно длителен, требует применения дорогостоящих реактивов, что делает такие губки изделием с высокой стоимостью. Но этих недостатков лишены изделия из рыбного коллагена, и вопрос о том, смогут ли они конкурировать со стандартными губками по ранозаживляющим свойствам, требует отдельного исследования.

Цель настоящей работы состоит в изучении водопоглотительной способности коллагена пресноводных рыб и поиске возможностей её повышения, оценке эффекта ранозаживления, санитарно-эпидемиологической безопасности и аллергенности материала, полученного на основе коллагена из пресноводных рыб внутренних водоёмов.

## Материал и методы

Объектом исследования служил коллагеновый продукт, полученный путём специальной обработки шкур прудовых рыб в соответствии с авторской технологией (патент РФ № 2614273). Использовали шкуры толстолобика, являющегося ценным источником белков, среди которых преобладающая фракция – коллаген [21]. Шкуры рыб обрабатывали в слабых растворах щелочей и органических кислот, полученные препараты лиофильно высушивали, при этом материал приобретал форму губки.

Для исследования набухаемости полученного материала использовали заданное количество воды (в нашем случае 20 мл), предварительно взвешивая ёмкость для обработки и исследуемый материал, измеряли изменение массы воды без губки после установления постоянного объёма свободной жидкости, затем пересчитывали на изменение массы губки.

Исследование эффекта ранозаживления проводили гистологическими и гистохимическими методами [22] на животных одного возраста, полученных из вивария и лабораторий Воронежского государственного медицинского университета имени Н.Н. Бурденко. Все животные прошли карантинный режим, не имели признаков заболеваний и получали стандартный пищевой рацион. Средняя масса животных составила  $300 \pm 25$  г, разброс по исходной массе не превышал 15%.

Исследования выполнены на 168 белых лабораторных крысах, разделённых на 3 группы: две контрольных и одна основная (табл. 1).

Моделирование ран проводили по модифицированной методике И.А. Сыченикова (1974). Под эфирным наркозом в асептических условиях на выбритом от шерсти участке, после обработки кожи раствором антисептика, одноразовым медицинским скальпелем по наружной поверхности средней трети бедра производили линейный разрез кожи, фасции и мышц длиной 1 см. Мягкие ткани разводили зажимом и разминали. Площадь ран перед началом лечения в группах составила в среднем  $26,0 \pm 0,5$  мм<sup>2</sup> без её достоверных различий между группами. Лечение во второй контрольной и основной группах начинали сразу после моделирования раневого процесса.

В первой контрольной группе лечение не проводили. Во второй контрольной группе лечение ран осуществляли путём её промывания непосредственно после моделирования 5 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия и введения в рану стандартной

Таблица 1

## Характеристика групп исследования

Группа исследования	Количество животных	Характеристика групп
1-я контрольная	56	Без лечения
2-я контрольная	56	Стандартная коллагеновая губка
Основная	56	Коллагеновая субстанция из рыбного сырья

коллагеновой губки, которую вырезали по площади раневого дефекта для его полного закрытия. В основной группе в отличие от второй контрольной использовали аналог из рыбного сырья.

Динамика купирования раневого процесса оценивалась на основании следующих методов исследования:

**Клинические методы** – общее состояние животных, показатели течения раневого процесса (скорость закрытия дефекта, экссудация, наличие некротических масс, появление грануляций, эпителизации и др.).

**Планметрические методы** – площадь раны по методике Л.Н. Поповой (метод целлофаногрфии) и её динамика. Для вычисления процента изменения площади раны за сутки использовали следующую формулу:

$$S\% = (S - S_n/S) \cdot 100\%,$$

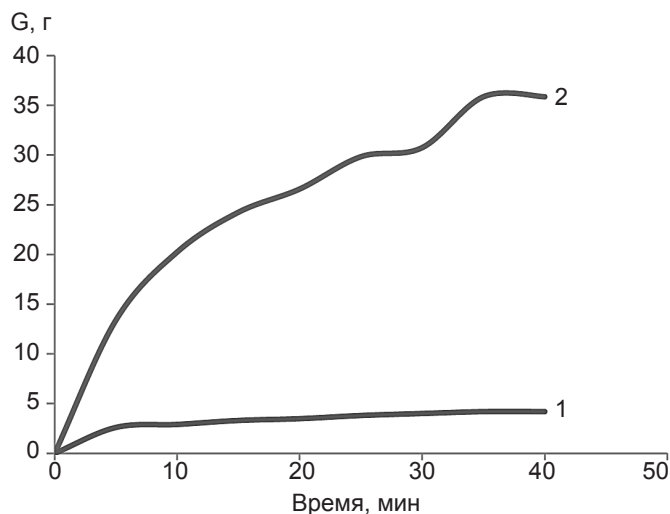
где S – площадь раны при предыдущем измерении; S<sub>n</sub> – площадь раны при данном измерении.

**Гистологические методы.** Для изучения динамики гистологических изменений на 1-, 3-, 7- и 11-е сутки от начала лечения выполняли иссечение тканей с захватом интактной кожи, дна и края раны размерами 1,0 · 1,0 · 0,5 см. Полученный материал фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, обезжировали, в дальнейшем получали парафиновые срезы толщиной 6 мкм, которые окрашивали гематоксилином-эозином и по Ван-Гизону. Препараты изучали в световом микроскопе путём перекрёстного изучения нескольких полей зрения. Изображения получали с помощью системы анализа изображений LeicaQwinStandartV2.6 (Leica, Германия), состоящей из микроскопа LeicaDRM, оснащённого цифровой фотокамерой LeicaDC 300F, компьютера с программным обеспечением LeicaQ 550W. Микрофотоснимки обрабатывали с использованием электронных программ компании Microsoft.

**Гистохимические методы.** Для гистохимических исследований окрашенные срезы образцов коллагена фотографировали при 400-кратном увеличении, затем проводили эквивалентное гистограмме контрастирование, после чего при использовании функции-фильтра «Порог» (Threshold) производили выделение на изображении продукта реакции. Для выделенных областей определяли площадь в пикселях, которые пересчитывали в микрометры путём фотографирования устройством, которым был выполнен снимок, объекта с площадью в 1 мкм с переводом данного изображения в пиксели.

Изучали содержание рибонуклеиновой кислоты (РНК) в срезах с тканей дна и края раны с использованием методики с Азуром В по S. Shea, что обеспечивало селективное выявление ядрышковой и цитоплазматической РНК и делало возможным проведение количественного исследования содержания РНК в пределах росткового слоя Мальпиги эпидермиса. Обработка срезов в 100%-ном уксусном ангидриде при комнатной температуре позволяла блокировать потенциально реакционноспособные аминогруппы белка, а дифференцировка в третином бутиловом спирте обеспечивала удаление молекул Азура В, не связанных с РНК.

Изучали содержание сульфгидрильных групп белков (SH-группы) в срезах с тканей дна и края раны по методу Швермана и Фредерика. Данная реакция представляет собой биохимический тест на цистеин, при котором образуется нерастворимый осадок берлинской лазури. Количественная оценка содержания SH-групп в пределах росткового слоя позволила определять степень созревания и дифференцировки эпидермиса при различных методах лечения ран.



Кинетика набухаемости G шкуры рыб до обработки в органических кислотах (кривая 1) и после обработки (кривая 2).

Исследования санитарно-эпидемиологической безопасности рыбного коллагена, прошедшего обработку в разбавленных щелочах и кислотах, на соответствие нормативно-правовому акту ТР ТС 009/2011 проводили в ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Воронежской области» (протокол испытаний № 9627п от 09.02.2017 г.). Определение содержания тяжёлых металлов – мышьяка, ртути, свинца – проводили согласно ГОСТ 26930–86, ГОСТ 26927–86, ГОСТ 30178–96, водородного показателя – по ГОСТ 29188.2–96. Кожно-раздражающее действие рыбной коллагеновой субстанции и воздействие на слизистые оболочки определяли по инструкции 1.1.11-1 352004, токсическое действие, определяемое альтернативными методами *in vitro* с использованием спермы крупного рогатого скота – по документу № 29ФЦ1394 от 29.01.2002.

Микробиологические показатели рыбной коллагеновой субстанции определяли по следующим ГОСТам: общее количество мезофильных аэробных и факультативно-аэробных микроорганизмов – по ГОСТ ISO 21149–2013, *Candida albicans* – по ГОСТ ISO 18416–2013, *Escherichia coli* – по ГОСТ ISO 21150–2013, *Staphylococcus aureus* – по ГОСТ ISO 22718–2013, *Pseudomonas aeruginosa* – по ГОСТ ISO 22717–2013.

Исследование на аллергенность проведена в тех же условиях (протокол о проведении технических и токсикологических исследований в рамках доклинических испытаний пористых медицинских материалов из рыбного сырья № 105/6 от 01.07.2014 г.). Аллергенные свойства коллагеновой субстанции рыбного происхождения изучали на морских свинках путём кожных аппликаций.

Провокационные кожные пробы совершали следующим образом. Перед началом аппликаций проводили сенсибилизацию животных путём многократного нанесения на кожу коллагеновой дисперсии. Ежедневно на выстриженный участок кожи трём морским свинкам наносили водные дисперсии модифицированного коллагена в разведениях 1:1; 1:10 и 1:100 в течение 14 дней (продолжительность инкубационного периода).

В течение всего периода опыта на морских свинками вели наблюдение, проводили измерение температуры тела, толщины кожной складки на месте аппликации, определяли температуру на месте введения.

## Результаты

Графические зависимости, отражающие кинетику набухаемости коллагена шкур рыб представлены на рисунке (кривая 1). Набухаемость – это количество воды, впитываемое единицей массы материала при гидратации, является характеристикой, наиболее адекватно отражающей водопоглощающие свойства материала впитывающих слоёв средств личной гигиены.

Динамика изменения площади ран животных, мм<sup>2</sup>

Группа исследования	После нанесения раны	Сроки после моделирования ран, сутки			
		1-е	3-и	7-е	11-е
1-я контрольная	26,1 ± 0,5	18,5 ± 0,5 <sup>1</sup>	9,2 ± 0,4 <sup>1</sup>	4,5 ± 0,4 <sup>1</sup>	Сформированный рубец
2-я контрольная	26,0 ± 0,5	12,8 ± 0,6 <sup>1,2</sup>	5,7 ± 0,3 <sup>1,2</sup>	1,5 ± 0,3 <sup>1,2</sup>	" "
Основная	26,1 ± 0,5	12,6 ± 0,6 <sup>1,2</sup>	5,8 ± 0,3 <sup>1,2</sup>	1,5 ± 0,3 <sup>1,2</sup>	" "

Примечание. 1 – достоверность различий по сравнению с исходными данными; 2 – достоверность различий по сравнению с данными первой контрольной группы.

На рисунке видно, что установленное значение набухаемости кожи рыб составляет около 3 г влаги на 1 г сухого вещества. После обработки кож рыб и получения материала набухаемость и, соответственно, влагоёмкость увеличивается примерно в 10 раз (см. рисунок, кривая 2). При этом количество влаги, связываемое образцом, оказывается равным 30 г на 1 г сухого вещества. Согласно данным [2], для сверхадсорбирующего полимера, который используется в средствах личной гигиены, требуемое значение этого показателя равно 10 г воды на 1 г сухого вещества. Предлагаемая обработка позволяет получить материал, сопоставимый или превосходящий по влагоёмкости полимеры, традиционно используемые во впитывающих слоях средств личной гигиены. Получение коллагеновых материалов из шкур пресноводных рыб путём модификации целесообразно, так как позволяет увеличить влагоёмкость материала.

Результаты гистологических исследований подопытных животных при исследовании ранозаживления были следующими.

*Первые сутки после начала лечения.* Во всех группах кожа вокруг ран отёчная и гиперемизированная, пальпация в проекции раны вызывает беспокойство животного. Отмечается серозно-геморрагическое отделяемое. В группах, где использовали коллагеновые губки и коллагеновую субстанцию из рыбного сырья (вторая контрольная и основная группы) отмечали визуальную менее выраженную воспалительную реакцию (уменьшение отёка и гиперемии).

В первой контрольной группе выявлена гистологическая картина травматического воспаления: повреждение эпидермиса, кровонезилиния, некротические массы, инфильтрация значительным количеством нейтрофильных лейкоцитов. Мышечные волокна раздвинуты вследствие межмышечного отёка. Соединительная ткань воспалена. Отёк тканей возрастает в паравуальных тканях и сопровождается сдавлением капилляров и венул, препятствующих оттоку крови. Отмечалась повышенная проницаемость сосудистой стенки с выходом в ткани форменных элементов и белковых составляющих крови. Наиболее интенсивную базофилию при выявлении РНК наблюдали в пределах базального и шиповатого слоёв, что косвенно указывает на наиболее активные метаболические процессы на данном уровне. Продукт реакции (РНК) откладывается в клетках эпидермиса в виде дисперсной базофилии в цитоплазме. Встречались клетки с более крупными гранулами.

Во второй контрольной группе дефект эпидермиса густо инфильтрирован полиморфноядерными лейкоцитами, лимфоцитами, плазмочитами и макрофагами. Выражены полнокровие, отёк и набухание коллагеновых волокон. Мышечные волокна раздвинуты вследствие отёка, на некоторых заметны выраженная дистрофия и явления миоллиза. В межмышечных пространствах воспалительная инфильтрация представлена преимущественно полиморфноядерными лейкоцитами.

В основной группе в области дефекта наблюдались воспалительная реакция, умеренный некроз и отёк мягких тканей с лейкоцитарной инфильтрацией.

*Третьи сутки после начала лечения.* Поведение подопытных животных практически не отличалось от поведения здоровых.

В первой контрольной группе имелись признаки умеренной воспалительной и отёчной реакции окружающих тканей, менее выраженные по сравнению с первыми сутками. В воспалительном инфильтрате присутствовали клеточные компоненты: лейкоциты с распадающимися ядрами, единичные тканевые базофилы, макрофаги и лимфоциты; по периферии инфильтрата мышечные волокна имели протяжённые участки некроза, были видны единичные фибробласты; в области дна раны были замечены единичные очаги грануляционной ткани. Отмечали выпадение фибрина, который связан со стенками раневого дефекта. В сетчатом слое дермы наблюдалось единичное количество коллагеновых волокон. Интенсивность окраски эпителиальных клеток усиливалась особенно в глубоких слоях эпидермиса, где наблюдалось равномерное отло-

жение базофильного материала или его локализация в перинуклеарной зоне.

Во второй контрольной группе отмечены умеренная воспалительная и отёчная реакции в паравуальной зоне, на поверхности – формирование грануляционной ткани и сосудисто-капиллярной сети: организованный фибрин, фибробласты, гистиоциты и эндотелиоциты, небольшие скопления полиморфноядерных лейкоцитов.

В основной группе дефект эпидермиса уменьшен, края раны отчётные. Присутствовали признаки восстановления целостности кожи, что проявлялось в утолщении краевого эпидермиса в результате активации репаративной регенерации. Отмечалось расхождение мышечных волокон за счёт воспалительной инфильтрации, заполняющей межмышечные пространства, формирование молодых грануляций, по периферии раны – пролиферативная реакция эпидермиса и элементов кожи. Коллагеновые волокна инфильтрированы макрофагами, фибробластами и эозинофильными лейкоцитами.

*Сельные сутки после начала лечения.* В первой контрольной группе воспалительная реакция была менее выражена, сохранялась инфильтрация клетками воспаления. Поверхность раны заполнена грануляционной тканью, присутствовали микроабсцессы различной локализации. В зоне формирования рубца наблюдалось повышенное количество фибробластов, извитые с преимущественным горизонтальным направлением коллагеновые волокна, формирующиеся мелкие капилляры.

Во второй контрольной группе отмечали минимальные признаки воспалительной реакции, в некоторых ранах еще присутствовали лейкоциты, выраженные коллагено- и ангиогенез. Поверхность раны была покрыта эпидермисом с подлежащей грануляционной тканью, богатой полнокровными сосудами и капиллярами, с большим количеством эозинофилов, фибробластов, гистиоцитов и тканевых базофилов. Наблюдали значительное количество коллагеновых волокон, по периферии – наличие некоторого количества тучных клеток. В глубине раны, в межмышечных пространствах происходило формирование мелких капилляров.

В основной группе наблюдали в зоне раневого дефекта восстановление тканей, в дерме – сформированные коллагеновые волокна и грануляционную ткань.

*Одиннадцатые сутки после начала лечения.* К одиннадцатым суткам во всех группах клинически наблюдали полностью сформировавшийся рубец, сформировавшуюся грануляционную ткань, которая полностью закрывала раневой дефект.

Во второй контрольной группе образовался сформированный эпителизированный рубец.

В основной группе раневой дефект был полностью закрыт, в дерме присутствовали сформированные коллагеновые волокна.

По наблюдениям за животными основной и контрольных групп отметили, что площадь ран животных уменьшается в основной и во второй контрольной группах быстрее, чем в первой контрольной (табл. 2).

Исходя из клинических признаков (табл. 3), можно заключить, что ко вторым суткам во второй контрольной и основной группах и к третьим суткам после начала лечения в первой контрольной группе происходило полное купирование признаков воспаления с заживлением ран под полоской струпа. Можно констатировать, что признаки воспаления или первая фаза раневого процесса купировалась в основной группе в среднем на 34–65% быстрее по сравнению с первой контрольной группой.

Таблица 3

**Клинические признаки течения раневого процесса, сутки**

Клинический признак	Группа исследования		
	1-я контрольная	2-я контрольная	основная
Купирование гиперемии кожи	1,8 ± 0,5	1,3 ± 0,5	1,3 ± 0,4
Купирование отёка тканей	2,2 ± 0,3	1,7 ± 0,4	1,6 ± 0,3*
Уменьшение отделяемого до скудного количества	2,7 ± 0,4	1,7 ± 0,4*	1,7 ± 0,4*

Примечание. \* – достоверность различий по сравнению с первой контрольной группой  $p < 0,05$ .

Гистохимические показатели раневого процесса представлены в табл. 4, из которой следует, что на всех стадиях его течения в основной группе уровень РНК и SH-групп в срезах с тканей дна и края раны выше, чем в первой и второй контрольных группах. Это говорит об активно идущих метаболических процессах, а также о высоких темпах созревания и дифференцирования эпидермиса.

При сравнении морфологии ран можно отметить более выраженную положительную динамику заживления ран во второй контрольной и основной группах, что проявилось в более быстром снижении отёчности тканей, организации фибрина и формировании коллагена. Установлено, что коллагеновый материал, накладываемый на поверхность раны, способствовал местному гемостатическому действию.

Анализ токсичности действующего материала показал, что острого состояния в исследовании не обнаружено. Отклонения частоты дыхательных движений и сердечных сокращений находились в пределах нормы вне зависимости от группы исследования. Температура тела варьировалась в пределах  $\pm 0,7-0,8$  °C также вне зависимости от группы исследования. Неврологическо-поведенческий статус не изменялся. Суммарный тест в основной группе «Открытое поле» составлял 52,4 с, а «Подвисание» – 11,2 с. Качественный анализ иммуноглобулина E показал отсутствие сенсибилизирующего эффекта на седьмые сутки исследования.

Таким образом, в ходе проведения исследований ранозаживления различий между применением стандартной коллагеновой губки и коллагеновой субстанции из рыбного сырья отмечено не было. При проведении сравнения с группой животных, не получавших дополнительного лечения, были собраны данные, свидетельствующие об ускорении репаративных процессов в мягких тканях под воздействием стандартной коллагеновой губки и коллагеновой субстанции из рыбного сырья, особенно выраженного в первой фазе раневого процесса, что проявлялось в стимуляции коллагенеза, активации метаболических процессов, сопровождающихся повышением уровня реакций при выявлении РНК и SH-групп. Проведённые экспериментальные исследования не выявили токсического и аллергического действий коллагеновой субстанции из рыбного сырья как при анализе клинических данных, так и при изучении результатов гистологического и гистохимического исследований.

Таблица 4

**Гистохимические показатели раневого процесса**

Группа исследования	Сутки после начала лечения							
	1-е	3-и	7-е	11-е	1-е	3-и	7-е	11-е
	Содержание рибонуклеиновой кислоты (РНК), усл.ед.				Содержание SH-групп, усл. ед.			
1-я контрольная	0,25	0,25	0,31	0,30	0,25	0,26	0,30	0,29
2-я контрольная	–	0,27	0,30	0,30	–	0,27	0,29	0,28
Основная	0,28	0,29	–	0,31	0,31	0,29	–	0,30

Таблица 5

**Результаты испытаний модифицированного коллагена на санитарно-гигиеническую безопасность**

Определяемые показатели	Результат исследований	Величина допустимого уровня
Мышьяк, мг/кг	< 0,025	Не более 5,0
Ртуть, мг/кг	< 0,03	Не более 1,0
Свинец, мг/кг	< 0,25	Не более 5,0
Водородный показатель	4,6	2,5–8,5
Кожно-раздражающее действие, балл	0	0
Воздействие на слизистые оболочки (однократно), балл	0	0
Токсическое действие, определяемое альтернативными методами <i>in vitro</i>	0	0
Общее количество мезофильных аэробных и факультативно-аэробных микроорганизмов	85	Не более 103
<i>Candida albicans</i>	0	Не допускается
<i>Escherichia coli</i>	0	Не допускается
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	Не допускается
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	Не допускается

Примечание. 0 – отсутствие результата исследования.

Результаты исследований санитарно-эпидемиологической безопасности согласно ТР ТС 009/2011 коллагеновой субстанции из рыбного коллагена представлены в табл. 5, из которой следует, что отклонений от требований безопасности не обнаружено.

При испытаниях на аллергенность в течение всего периода опыта изменений в клиническом статусе животных, а также изменения состояния кожи на месте аппликаций коллагеновой субстанции не выявлено. На основе полученных результатов ответную реакцию по аллергенности можно оценить как отрицательную.

**Обсуждение**

Обработка биополимеров в органических кислотах нередко применяется с целью модификации биомакромолекул и придания материалам необходимых физико-химических свойств [23–25]. Есть и упоминания об обработке рыбного коллагена органическими кислотами для облегчения его диспергирования [26, 27]. Это возможно благодаря начинающимся при обработке в кислотах процессам деструкции волокон коллагена [28], что, по-видимому, связано с разрывом связей между полипептидными цепями коллагена. В результате изменения структуры образуется разветвлённая капиллярная сеть, куда и проникает влага, что увеличивает общую влагоёмкость исследуемого материала.

Одинаковое ранозаживляющее действие стандартной коллагеновой губки на основе модифицированного рыбного коллагена можно объяснить следующим образом.

Молекула коллагена млекопитающих состоит из трёх полипептидных  $\alpha$ -цепей, взаимосвязанных в структуру тройной правозакрученной суперспирали наподобие трехжильной верёвки [11], что придаёт структуре высокую прочность и большую молекулярную массу. Эти цепи соединены между собой поперечными связями. Отличительной особенностью рыбного коллагена является односпиральность и параллельное расположение полипептидных цепей, молекулярная масса которых значительно ниже, чем у коллагена млекопитающих и находится на уровне тропоколлагена [19]. Как следствие, рыбный коллаген менее прочен и, вероятно, не столь сильно связан с остальными элементами ткани, чем коллаген млекопитающих. Поэтому он не требует предварительного гидролиза и в процессе обработки

в слабых щелочных и кислотных растворах легко выделяется из шкур рыб. Затем при контакте с поверхностью раны полипептидные цепи рыбного коллагена встраиваются в структуру регенерата, аналогично фрагментам молекулы животного коллагена после длительного его гидролиза в жёстких режимах.

Из представленных данных по санитарно-эпидемиологическому состоянию испытуемых образцов следует, что исследуемая коллагеновая субстанция содержит ионы тяжёлых металлов в концентрациях в десятки раз меньше допустимого уровня, не оказывает кожно-раздражающего и общетоксического действия, а также воздействия на слизистые оболочки и, кроме того, содержит на порядок меньшее допустимого порога общее количество мезофильных аэробных и факультативно-аэробных микроорганизмов. В исследованных образцах отсутствует патогенная микрофлора. Поэтому полученные коллагеновые материалы рыбного происхождения биобезопасны, имеют выраженный ранозаживляющий эффект, к тому же технология их получения выгодно отличается от процесса изготовления стандартных материалов.

Кроме превосходных влагопоглощающих ранозаживляющих свойств модифицированный рыбный коллаген обладает существенной сорбирующей способностью. Так, в [29, 30] доказана высокая сорбционная ёмкость рыбных коллагеновых субстанций за счёт наличия разнообразных функциональных групп, гидрофильных и гидрофобных участков в структуре молекулы. Такое обстоятельство позволяет положительно оценивать перспективность использования коллагеновых субстанций в составе средств личной гигиены с дезодорирующим эффектом.

## Заключение

Полученные в настоящей работе результаты исследований физико-химических характеристик коллагеновых материалов из пресноводных рыб с модифицированной структурой свидетельствуют о перспективности их использования в качестве впитывающего слоя средств личной гигиены ввиду их высокой влагопоглощающей способности, которая на порядок выше влагоёмкости необработанного коллагена и выше влагоёмкости сверхадсорбирующих полимеров, требуемой для использования в средствах личной гигиены.

Полученный материал соответствует требованиям санитарно-эпидемиологической безопасности и, как можно заключить по результатам испытаний на животных, аллергенного действия на кожу не оказывает. Этот материал ускоряет репаративные процессы в такой же степени, как и коллаген, используемый в стандартных гемостатических губках при простоте технологии его получения, дешевизне и доступности сырья. Совокупность результатов даёт основание считать перспективным развитие отечественного производства рыбных коллагеновых материалов, в том числе и для использования в составе средств личной гигиены.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Литература

- Kessler T. et al. Absorbent product hygienic gasket. Patent US. N 2229868;2004
- Mason P. C. et al. Inserting gasket with the indicator of improved characteristics. Patent US, N 2373911;2007
- Paukshto M.V.et al. Collagen materials, films and methods of their production. Patent US N 2009125186/05;2007
- Антипова Л.В. Коллагены: источники, свойства, применения. Воронеж: ВГУИТ. 2014.
- Глотова, И. А., Болтыхов Ю.В. Реологические характеристики полифункциональных дисперсных систем на основе коллагеновых белков животных тканей. *Успехи современного естествознания*.2008; (2): 43-4.
- Батечко, С.А. Коллаген. Новая стратегия сохранения здоровья и продления молодости Колечково, 2010
- Истранова, Е.В. Модификация коллагена: физико-химические и фармацевтические свойства и применение. *Химико-фармацевтический журнал*. 2006; 40 (2): 32-6
- Антипова Л.В., Сторублевцев С.А., Бобрешова М.В. Шкуры рыб - как объект для получения коллагеновых субстанций Научная конференция хранительна наука, техника и технологии – Научно-трудовые Университет по хранительна технологии Пловдив; Том LIX. - 2012: 976-78
- Антипова Л.В., Кораблева С.А., Болгова С.Б. Перспективы получения и применения для заживления ранматериалов на основе коллагена рыбы Материалы 1-го Международного конгресса. Промышленно-научные сети в сотрудничестве с фармацевтической, химической и пищевой отраслями. 2014: 116-20
- Игнатъева Н.Ю. Коллаген — основной белок соединительной ткани. *Эстетическая медицина*. 2005; 4 (3): 257 -58.
- Boriskina, E. P. Physical factors of stability of three-spiral collagen-type. Kharkiv; 2006 (in Ukraine).
- Васильев М.П. Коллагеновые нити, волокнистые и пленочные материалы: Монография. Спб.: СПГУИТД, 2004. 397 с.
- Габуда С.П., Гайдаш А.А., Вязовая Е.А. Структура коллагена и разупорядоченность водной подсистемы в фибриллярных белках. *Биофизика*. 2005 (2): 231-5.
- Li, G. Y. Physicochemical properties of collagen isolated from calf limed splits. *Amer. Leather Chem. Ass.* 2003; 98: 224-229
- Финкельштейн А.В., Птицин О.Б. Физика белка. КДУ: 2012.
- Bechir, A., Sirbu R., Leca M., Maris M., Maris D.A., Cadar E., The Nanobiotechnology of Obtaining of Collagen Gels from Marin Fish Skin and Yours Reological Properties for using Like New Materials in Dental. *Medicine International Journal of Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering*. 2008;2(6):190-196
- Казмирова К. Непознанный коллаген. *Косметология*. 2012; 56 (6):90-3
- Дворянинова О.П. Биотехнологический потенциал рыб внутренних водоемов: глубокая переработка и высокотехнологичные импортозамещающие производства: Автореф. дис. д. тех. наук. В.; 2013. 124 с.
- Дворянинова, О.П. Получение, свойства и применение коллагеновых дисперсий из кожи рыб: Автореф. дис. д. тех. наук. В., 2002. 218 с.
- Истранов Л. П., Абоянц Р. К., Истранова Е. В. Антимикробная гемостатическая губка, патент РФ № 2396984, от 27.03.2010
- Спиридонова М.В., Дворянинова О.П. Продукты разделки толстолобика - как источник белка в технологии кормопроизводства. Спиридонова М.В., Дворянинова О.П., Соколов А.В. *Международный студенческий научный вестник*. 2016 (3-1): 136-7.
- Алексеева Н.Т. Морфологическая оценка регенерата при заживлении гнойных кожных ран под влиянием различных методов регионального воздействия. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2014; 3 (2): 14-8.
- Matthews J. A. *Biomacromolecules*. 2002;(3): 232-238.
- Bhatarai N. *Biomaterials*. 2005; 3(26): 6176 - 6184.
- Mo X., Chen Z., Weber H. J. 'Electrospun nanofibres of collagen - chitosan and p(LLA-CL) for tissue engineering' *Frontiers. Medicines science in China* .2007;1(1): 20-23
- Семеньева Л.В. Способ получения уксусной дисперсии высокомолекулярного рыбного коллагена. Патент на изобретение №: 2567171 , 2015.
- Воробьев, В.И. Использование рыбного коллагена и продуктов его гидролиза. *Известия Калининградского государственного технического университета*. 2008 (13): 55-8.
- Глотова И.А. Рязских В.И. Галочкина Н.А. Макаркина Е.Н. Галочкин М.Н. Получение функциональных дисперсных систем на основе коллагеновых белков: формализованный подход к описанию тепло-массообменных процессов. *Фундаментальные исследования*. 2012. 11(2): 383-8.
- Антипова Л.В., Сторублевцев С.А. Сорбционные свойства коллагеновых субстанций в создании мясных функциональных продуктов питания. Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова. 2016. № 1: 367-9.
- Сторублевцев С.А., Антипова Л.В. Попов В.И., Стукало О.Г., Болгова С.Б. Оценка бактериостатического эффекта иммобилизованных на коллагеновом носителе антибиотиков и ионов серебра в обеспечении асептики, *Гигиена и санитария*. 2015; 94(9): 54-7.

## References

- Kessler T. et al. Absorbent product hygienic gasket. Patent US. N 2229868; 2004.
- Mason P. C. et al. Inserting gasket with the indicator of improved characteristics. Patent US, N 2373911; 2007
- Paukshto M.V. et al. Collagen materials, films and methods of their production. Patent US N 2009125186/05; 2007
- Antipova L. V. the Collagens: sources, properties, applications. Voronezh; 2014 (in Russian).
- Glотова, I. A., Boltachev V. Rheological characteristics of multifunctional disperse systems based on collagen proteins of animal tissues. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 2008; (2): 43-44 (in Russian).
- Batechko, S. A. Collagen. A new strategy of preservation of health and youth. Koleczkowo; 2010.
- Istranova, E. V., Istranov, L. P., Tchaikovskiy E. A., Collagen modification: physico-chemical and pharmaceutical properties and applications. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal*. 2006 ;40(2): 32-36(in Russian).
- Antipova L. V., Storublevtsev S. A., Bobreshova M. V. Skins of fish - as an object for obtaining collagen substances. Scientific conference «Science, technology and technology» Plovdiv LIX. 2012;976-978(in Russian).
- Antipova L. V. Korobleva S. A., Bolgova S. B. Prospects of obtaining and application for wound healing materials based on collagen fish: Proceedings of the 1st international Congress of Industrial and scientific networks in cooperation with pharmaceutical, chemical and food industries: Voronezh, 2014;116-120 (in Russian).
- Ignatieva, N. Yu. Collagen - the basic protein of connective tissue. *Esteticheskaya medicina*. 2005; 3(4): 257 -258 (in Russian).
- Boriskina, E. P. Physical factors of stability of three-spiral collagen-type. Kharkiv; 2006 (in Ukraine).
- Vasiliev M. P. Collagen filaments, fibrous and film materials. St. Petersburg; 2004 (in Russian).
- Gabuda, S. P., Gaidash A. A. The Structure of collagen and disorder of the water subsystems in fibrillar proteins. *Biofizika*. 2005; (2):231-235. (in Russian).
- Li, G. Y. Physicochemical properties of collagen isolated from calf limed splits. *Amer. Leather Chem. Ass.* 2003; 98: 224-229
- Finkelstein A.V. Ptitsin OB Physics of Protein, KDU; 2012
- Bechir, A., Sirbu R., Leca M., Maris M., Maris D.A., Cadar E., The Nanobiotechnology of Obtaining of Collagen Gels from Marin Fish Skin and Yours Reological Properties for using Like New Materials in Dental. *Medicine International Journal of Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering*. 2008;2(6):190-196
- Kazimirova K. Unidentified collagen. *Kosmetologiya*. 2012; (6): 90-93.
- Dvoryaninova, O. P. Biotechnological potential of internal fish water bodies: Dr. tech. sci. diss. Voronezh;2013. (in Russian).
- Dvoryaninova, O. P. Production, properties and application of collagen dispersion of fish skin. Dr. tech. sci. diss. Voronezh;2002 (in Russian).
- Istranov LP, Aboyants RK, Istranova Ye. V. Antimicrobial haemostatic sponge. Patent of the Russian Federation No. 2396984, dated 27.03.2010.
- Spiridonova M. V., Dvoryaninova O. P., Sokolov A.V. Products of carp cutting - as a source of protein in the technology of forage production. *Mezhdunarodnyj studencheskij nauchnyj vestnik*. 2016; (3): 136-137 (in Russian).
- Alekseeva N.T. Morphological evaluation of regenerate during healing of purulent skin wounds under the influence of various methods of regional exposure. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*. 2014; 3 (2): 14-18.
- Matthews J. A. Biomacromolecules. 2002;(3):232-238
- Bhattarai N. Biomaterials. 2005; 3(26): 6176 - 6184
- Mo X., Chen Z., Weber H. J. 'Electrospun nanofibres of collagen - chitosan and p(LLA-CL) for tissue engineering' *Frontiers. Medicines science in China* .2007;1(1): 20-23.
- Semenycheva L. V. Method for producing acetic dispersion of high-molecular fish collagen. Patent RF, N 2567171: 2015(in Russian).
- Vorobyov, V. I. Use of fish collagen and products of its hydrolysis. *Izvestiya Kaliningradskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta*. 2008; 13: 55-58 (in Russian).
- Glотова I A, Ryazhskikh V.I., Galochkina N.A., Makarkina E.N., Galochkin M.N. Production of functional disperse systems based on collagen proteins: a formalized approach to the description of heat and mass transfer processes. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2012; (11): 383-388 (in Russian).
- Antipova L. V., Storublevtsev S. A., Sorption properties of collagen substances in the creation of meat functional foods. International scientific and practical conference dedicated to the memory of Vasily Gorbatov. 2016; 1: 367-369 (in Russian).
- Storublevtsev S. A., Antipova L. V Stukalo O. G., Bolgova S. B. Evaluation of bacteriostatic effect of immobilized on collagen carrier of antibiotics and silver ions in providing asepsis. *Gigiena i sanitariya*. 2015; 94 (9): 54-57. (in Russian).