

УДК 616-003.93-018:001.17(575.2)

## МОРФОЛОГИЯ КОЖИ ПОСЛЕ ТЕРМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ В УСЛОВИЯХ КОМПЛЕКСНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ХИТОЗАНА, ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ И АНГИОГЕНИНА

В.Х. Габитов, А.Б. Уметалиева

*Научный центр реконструктивно-восстановительной хирургии МЗ КР, г. Бишкек, Кыргызстан*

Экспериментальное исследование репарации ткани, индуцированной комбинированным использованием хитозана, гиалуроновой кислоты и ангиогенина, показало, что они служат основой, на которой организуется нормальная тканевая архитектура, что делает эти препараты необходимым компонентом ранней терапии термических повреждений кожи для опосредованной коррекции лимфатического дренажа ожоговой раны. Применение комплекса «хитозан+гиалуроновая кислота+ангиогенин» является наиболее эффективным способом восстановления структуры кожи.

**Ключевые слова:** структура кожи, термический ожог, хитозан, гиалуроновая кислота, ангиогенин.

**Введение.** Термические поражения кожи представляют собой серьезную медицинскую, социальную и экономическую проблему и занимают третье место в структуре травматизма мирного времени [6, 8, 9, 19].

В условиях глубокого ожога лимфатические сосуды не в состоянии дренировать и отводить из тканей региона жидкость [3, 14]. Это объясняется закупоркой просвета сосудов, тромбозом, спазмом, блокадой синусов лимфатических узлов и крупных лимфатических коллекторов. Как показали исследования А.С. Корягина и соавт., хитозан снижает интерстициальный отек и может быть использован при лечении ожоговых ран [1]. Одним из перспективных направлений в клинической медицине является разработка методов восстановления и роста собственной капиллярной сети (управляемый процесс ангиогенеза). Ключевую роль в процессе ангиогенеза играет белок ангиогенин [4, 13]. В последние годы в медицинской практике все большее применение находит и гиалуроновая кислота [15–18]. Анализ результатов местного лечения ожоговых ран показывает, что ни одно из применяемых лекарственных средств не является универсальным.

Вместе с тем, сведения о комплексном влиянии хитозанового биогеля, геля гиалуро-

новой кислоты и ангиогенина на течение регенераторных процессов соединительной и эпителиальной тканей при термическом воздействии на кожу отсутствуют.

**Цель исследования.** Выявить структурно-клеточные преобразования в коже после термического воздействия в условиях комплексного применения хитозана, гиалуроновой кислоты и ангиогенина.

**Материалы и методы.** Работа выполнена на 315 самцах крыс массой 180–200 г. Животные содержались в стандартных условиях при температуре 20–22 °С и обычном световом режиме. Работу с животными проводили в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12.08.1977).

Использовалась модель термического ожога кожи IIIA степени, так как поверхностные ожоги являются адекватной моделью для доклинического изучения местных ранозаживляющих препаратов [11]. Был использован контактный способ нанесения ожога насадкой к электропаяльнику размером 2×2 см, разогретой до 232 °С, с 4-секундной экспозицией.

Распределение животных в сериях производилось следующим образом: 1-я группа – интактный контроль (без какого-либо патологического воздействия); 2-я группа – с ожогом IIIА степени без лечения (спонтанное заживление); 3-я группа – с ожогом IIIА степени, леченные общепринятым препаратом – мазью «Левомеколь»; 4-я группа – с ожогом IIIА степени, леченные с использованием сочетания мази «Левомеколь» и хитозанового биогеля; 5-я группа – с ожогом IIIА степени, для заживления которого использовалось сочетание мази «Левомеколь» с гелем гиалуроновой кислоты; 6-я группа – с ожогом IIIА степени, леченные сочетанием мази «Левомеколь» с ангиогенином; 7-я группа – с ожогом IIIА степени, в лечении которого использовались мазь «Левомеколь» и комплекс «хитозан + гиалуроновая кислота + ангиогенин».

Лечебные мероприятия проводились спустя час после нанесения травмы. Обработку ожоговой раны проводили 1 раз в день в течение 25 сут.

Оценка состояния ожоговой раны проводилась на 1, 3, 7, 15 и 25 сут после нанесения травмы и проведения курса лечения. Применялись общепринятые светооптические и ультраструктурные исследования. При морфометрическом исследовании в каждой группе животных определяли следующие показатели: толщину эпидермиса, сосочкового и сетчатого слоев дермы (мкм); количество (на 1 мм<sup>2</sup>) и диаметр (мкм) сосудов микроциркуляторного русла.

Оценку изменения клеточного состава проводили путем подсчета общего количества клеток, популяций тучных клеток (гранулированных и дегранулированных), нейтрофилов, лимфоцитов, макрофагов, плазмочитов, фибробластов, фиброцитов и их процентного содержания в пересчете на 1 мм<sup>2</sup> площади препарата.

**Результаты и обсуждение.** Проведенное экспериментальное исследование показало, что выбранная нами модель приводит к развитию ожогов IIIА степени. При этом происходит некротизация и гибель эпидермиса, разрушение соединительно-тканевого каркаса сосочкового и сетчатого слоев дермы с во-

влечением в воспалительный процесс рядом и нижележащих тканей, формирование плотного струпа. Дальнейшая пролиферация фибробластов и усиление их синтетической активности являются одним из механизмов образования грубого послеожогового рубца.

Исследование показало, что ожоговая травма кожи приводит к существенным изменениям и в сосудах микроциркуляторного русла. К 7-м сут развивались обширные участки ишемии дермы, в которых просматривались лишь единичные сосуды. К 25-м сут отмечалась облитерация некоторых сосудов.

Таким образом, полученные результаты проведенных морфологического и морфометрического исследований регенерации дермы позволили нам выявить объективные показатели степени тяжести термического ожога кожи, их фазность в различные сроки с учетом определения тяжести и исхода.

Применение нами комплекса традиционно используемых методов лечения ускорило процессы заживления ожоговой травмы. Тем не менее достоверных отличий от группы нелеченного контроля толщина эпителиального слоя не имела. Начиная с 7-х сут отмечается стихание деструктивных процессов, подтверждаемое прогрессивным снижением числа нейтрофилов, которое на 25-е сут было в 5,5 раза меньше, чем в группе сравнения. О более раннем переходе в продуктивную стадию воспаления можно судить и по динамике фибробластов, количество которых начинает прогрессивно возрастать на 7-е сут наблюдения.

Анализ состояния кровоснабжения дермы показал, что аналогично изменениям в группе со спонтанным заживлением в начальные сроки развивается расширение микрососудов, приводящее к увеличению их диаметра в 2,8 и 1,3 раза соответственно по сравнению с контролем и группой сравнения. К концу наблюдения сохраняющиеся процессы перестройки кровеносного русла приводят к снижению данного показателя, составляющего 75,2 и 84,9 % от значений контроля и группы спонтанного заживления.

Таким образом, проведенное нами исследование подтверждает факт недостаточной эффективности классической фармакотера-

пии, которая не всегда может обеспечить адекватную помощь в лечении термических повреждений кожи, что согласуется с данными литературы [5, 8, 19].

При добавлении нами в комплекс традиционно используемых при лечении термического воздействия на кожу хитозанового биогеля происходит снижение воспалительных реакций, ускорение процессов эпителизации, нормализация кровоснабжения дермы. Так, толщина дермы в этой группе максимальна на 7-е сут наблюдения и в 1,8 раза превышает показатель контроля. Отмечено стихание эксудативной фазы воспаления и отечных проявлений. Этому способствуют активные пролиферативные процессы в периферической зоне, где максимальная толщина эпителия отмечена также на 7-е сут, а к 15-м сут наблюдается формирование многослойного плоского эпителия.

Применение хитозанового биогеля демонстрирует выраженный ангиогенный эффект уже на 3-и сут наблюдения, когда отмечается появление единичных сосудов в стро-ме дермы. При этом ультраструктурно отмечена сохранность цитоплазматических органоидов и микропиноцитозных везикул эндотелиоцитов кровеносных и лимфатических капилляров кожи. Данный процесс играет существенную роль в течении репаративных процессов, поскольку усиленная васкуляризация способствует улучшению обменных процессов и отмечена также в других экспериментальных работах по использованию хитозана [2, 7].

Отличительной особенностью течения воспалительного процесса при добавлении в комплекс лечения термического ожога геля гиалуроновой кислоты явилось развитие обширных отеков в гиподерме зоны поражения и сетчатом слое дермы периферической зоны, о чем свидетельствует увеличение толщины сетчатого слоя на 7-е сут наблюдения в 2 раза по сравнению с контролем и в 1,5 раза по сравнению с группами традиционного лечения и лечения хитозаном. Данный феномен можно объяснить тем, что вследствие своей высокой гидрофильности гиалуроновая кислота связывает и удерживает интерстициальную воду в межклеточных пространствах [17].

Выраженные отличия имеет и процесс перестройки сосудистого русла. Так, начиная с 3-х сут диаметр сосудов становится в 2 раза больше показателей контроля и группы с применением хитозана, дилатация сохраняется вплоть до 15-х сут, когда просветы сосудов достоверных отличий от групп сравнения не имеют. К 25-м сут наблюдения этот показатель не имеет достоверных отличий от группы с традиционным лечением и ниже значений, полученных в других экспериментальных группах.

Таким образом, установлено, что применение геля гиалуроновой кислоты в ранней фазе воспаления приводит к существенному подавлению ангиогенеза, ингибированию клеточной миграции и пролиферации. Примечательно, что образование межклеточного вещества преобладает над синтезом коллагеновых волокон, что предотвращает избыточное образование грануляционной ткани и формирование грубых рубцов [10, 12].

Морфометрический анализ показал, что у животных при применении ангиогенина особенности регенераторного процесса проявляются в увеличении пролиферативной активности фибробластов, ускорении посттравматического развития лейкоцитарной и макрофагической реакций, а также формировании грануляционной ткани. На 7-е сут наблюдения отмечается лучший гистоархитектурный порядок, лучшая васкуляризация и отсутствие клеток воспаления на уровне прилежащих мышц. Это приводит к ускорению новообразования грануляционной ткани и в первую очередь микрососудов, а также образованию регенерата, по морфологии приближающегося к нормальной картине.

К 15-м сут отмечалась выраженная пролиферация фибробластов и формирование сосудистой сети. После применения ангиогенина значительно быстрее, чем при традиционном лечении, происходит эпителизация поверхности раны. Применение ангиогенина сокращает период рубцевания термической раны почти на неделю.

Комплекс «хитозан+гиалуроновая кислота+ангиогенин» оказывает протективное действие на структурную организацию эндотелиоцитов лимфатических капилляров кожи,

обуславливая большую эффективность дренажной функции лимфатической системы региона термического поражения, удаление токсичных метаболитов, создавая благоприятные условия микроокружения и ускоряя развитие всех фаз раневого процесса.

При комплексном лечении с добавлением хитозанового биогеля, геля гиалуроновой кислоты и ангиогенина структурные изменения и динамика морфометрических показателей (табл. 1) была максимально положительной по сравнению с отдельно используемыми препаратами. При этом уже на 1-е сут эксперимента общее количество клеточных форм в 4 и 1,6 раза превышает показатели контроля и группы с традиционным лечением. На 3-и сут в краевой зоне отмечается активизация про-

лиферативных процессов как со стороны эпидермиса, так и со стороны эпителия волосяных луковиц, образующих сосочковые разрастания в сторону раны. На 7-е сут наблюдается прорастание тонкого пласта эпителия под струп и начало его отторжения. Определяется стихание отечных проявлений, активное новообразование грануляционной ткани. Параллельно резко увеличивается и содержание фибробластов, превышая значения сравнимых групп в 1,3–2 раза. На 15-е сут отмечается восстановление эпидермиса, созревание грануляционной ткани, формирование сосочкового слоя. Полная эпителизация раневой поверхности наступала к 25-м сут эксперимента.

Таблица 1

**Динамика изменения клеточного состава дермы в зоне травмы  
(абсолютное количество на 1 мм<sup>2</sup>)  
при включении в традиционное лечение термического ожога хитозанового биогеля,  
геля гиалуроновой кислоты и ангиогенина (M±m)**

Наименование клеток	Показатели контрольной группы	Показатели по срокам наблюдения				
		1 сут	3 сут	7 сут	15 сут	25 сут
Тучные клетки	2,6±1,6	37±5	87±5* <sup>+</sup>	56±4* <sup>+</sup>	7,9±1,1 <sup>+</sup>	5,9±1,9*
Нейтрофилы	-	695±20* <sup>+</sup>	679±39,3*	477±28* <sup>+</sup>	5,3±1,1	-
Лимфоциты	2,6±1,6	109±13 <sup>+</sup>	71±3,2 <sup>+</sup>	171±14* <sup>+</sup>	54±4,2* <sup>+</sup>	34±6,7*
Макрофаги	-	80±6* <sup>+</sup>	71±6,3* <sup>+</sup>	68±3* <sup>+</sup>	0,9±1,1	-
Плазмоциты	14,5±3,1	55±6 <sup>+</sup>	53±6	40±4 <sup>+</sup>	22±2,3*	47±4* <sup>+</sup>
Фибробласты	121±8	145±8 <sup>+</sup>	236±13* <sup>+</sup>	147±7* <sup>+</sup>	286±11*	293±14* <sup>+</sup>
Общее количество	321±12,5	1296±35* <sup>+</sup>	1388±60* <sup>+</sup>	1154±32 <sup>+</sup>	574±17* <sup>+</sup>	525±26* <sup>+</sup>

**Примечание.** \* – достоверное отличие показателя от значения группы со спонтанным заживлением; <sup>+</sup> – достоверное отличие от аналогичного показателя группы с традиционным лечением (p<0,05).

Необходимо отметить, что высокая численная плотность сосудов, сохраняющаяся до конца наблюдения, обеспечивает достаточный уровень оксигенации, нормализацию гомеостаза, ускоренное очищение раны от тканевого и клеточного детрита, пролиферацию фибробластов, процесс созревания коллагеновых волокон в ране и в конечном счете формирование мягкого, эластичного рубца.

Таким образом, при включении в лечение ожоговых ран комплекса гелевых форм хитозана, гиалуроновой кислоты и ангиогенина

отмечена наиболее благоприятная динамика репаративных процессов с несомненным их доминированием над альтернативно-воспалительными процессами в ожоговой ране. Наблюдалось быстрое увеличение числа функционально активных фибробластов, более раннее формирование грануляционной ткани, что сокращало сроки заживления. Темп стихания воспалительного и начала репаративно-резорбтивных процессов был несколько выше, чем в группах сравнения. Вероятно, это связано с тем, что использование

хитозана, гиалуроновой кислоты и ангиогенина в комплексе обеспечивает проявление трех механизмов: защищает рану от высыхания, создает оптимальные условия для образования сосудов и грануляций, оказывает мощнейший регенерирующий эффект посредством выделения биологически активных веществ и факторов роста, а самое главное – протектирует ускорение нормализации функции лимфатического коллектора региона.

Из вышеизложенного можно заключить, что примененный нами комплекс «хитозан+гиалуроновая кислота+ангиогенин» является активным стимулятором репаративных процессов в обожженной коже благодаря способности комплекса быстро проникать в глубинные слои дермы, активируя местную защитную реакцию, что приводит к ускорению процессов заживления, улучшению кровоснабжения и обмена веществ. Примененный нами комплекс стимулирует физиологические репаративные процессы и ангиогенез, а также направляет фиброгенез по органотипическому пути.

Исследование репарации ткани, индуцированной комбинированным использованием хитозана, гиалуроновой кислоты и ангиогенина, показало, что они служат основой, на которой организуется нормальная тканевая архитектура, что делает эти препараты необходимым компонентом ранней терапии термических повреждений кожи для опосредованной коррекции лимфатического дренажа ожоговой раны. Применение комплекса «хитозан+гиалуроновая кислота+ангиогенин» является наиболее эффективным способом восстановления структуры кожи.

**Заключение.** Комбинированное использование предложенного комплекса «хитозан+гиалуроновая кислота+ангиогенин» в лечении термической раны кожи выявило максимальное ускорение регенераторных процессов, снижение процессов деструкции, стимуляцию ангиогенеза и восстановление архитектуры кожи.

1. Анализ антиоксидантных свойств хитозана и его мономеров / А. С. Корягин [и др.] // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – № 10. – С. 444–446.

2. *Апсатаров Э. К.* Морфофункциональные преобразования в асептической и гнойной ране при применении хитозанового геля и ангиогенина : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Э. К. Апсатаров. – Новосибирск, 2003. – 21 с.

3. *Бгатова Н. П.* Комплексное лечение ожоговых ран / Н. П. Бгатова, А. Б. Уметалиева // Вестник КРСУ. – 2011. – Т. 11, № 7. – С. 57–60.

4. *Бурлева Е. П.* Морфологическая оценка эффективности лечения экспериментальной ишемии конечности рек-ангиогенином / Е. П. Бурлева, Н. Б. Крохина, Н. П. Мертвцов // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2002. – № 2. – С. 46–50.

5. *Вазина И. Р.* Динамика летальности и причин смерти обожженных за последние 30 лет XX в. в Российском ожоговом центре МЗ РФ / И. Р. Вазина, С. Н. Бугров, Е. Ю. Сосин // Вестн. хирургии. – 2004. – Т. 163, № 3. – С. 47–50.

6. Влияние коррекции лимфатического дренажа ожоговой раны кожи на структуру и функцию клеток и органов в послеожоговом периоде / Н. П. Бгатова [и др.] // Материалы Сибирского съезда лимфологов с международным участием. – Новосибирск, 2006. – С. 41–44.

7. *Голикова Е. Л.* Влияние хитозанового геля на процессы ангиогенеза при щелочном ожоге роговицы и конъюнктивы глаза в эксперименте / Е. Л. Голикова, Ф. Р. Ниязова, В. Х. Габитов // Проблемы саногенного и патогенного эффектов экологического воздействия на внутреннюю среду организма : материалы V Междунар. научного симпозиума. – 2001. – Т. II. – С. 125–130.

8. *Грибань П. А.* Современные аспекты исследования микроциркуляции у больных с тяжелой термической травмой : автореф. дис. ... канд. мед. наук / П. А. Грибань. – Владивосток, 2011. – 19 с.

9. Комбустиология / Э. Я. Фисталь [и др.] ; под ред. Э. Я. Фисталь, Г. П. Козинец. – Донецк, 2006. – 236 с.

10. *Костина Г. А.* Использование гиалуроновой кислоты в медицине и косметологии / Г. А. Костина, И. Н. Радаева // Косметика и медицина. – 1999. – № 2–3. – С. 53–57.

11. *Парамонов Б. А.* Методы моделирования ожогов кожи при разработке препаратов для местного лечения / Б. А. Парамонов, В. Ю. Чеботарев // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т. 134, № 11. – С. 593–597.

12. *Строителев В. В.* Гиалуроновая кислота в медицинских и косметических препаратах / В. В. Строителев, И. А. Федорищев // Косметика и медицина. – 2000. – № 3. – С. 21–31.

13. *Шестенко О. П.* Ангиогенин и его роль в ангиогенезе / О. П. Шестенко, С. Д. Никонова, Н. П. Мертвцов // Молекулярная биология. – 2001. – Т. 35, № 3. – С. 349–371.

14. Angiogenin expression in burn blister fluid: implications for its role in burn wound neovascu-

larization / S. C. Pan [et al.] // *Wound Repair Regen.* – 2012. – Vol. 20, № 5. – P. 731–739.

15. Articular cartilage engineering with Hyalograf C: 3-year clinical results / M. Marcacci [et al.] // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 2005. – № 435. – P. 96–105.

16. *Lambros V. S.* Hyaluronic acid injections for correction of the tear trough deformity / V. S. Lambros // *Plast. Reconstr. Surgery.* – 2007. – № 6. – P. 74–80.

17. *Lapitsky Y.* Modular biodegradable biomaterials from surfactant and polyelectrolyte mixtures

/ Y. Lapitsky, T. Zahir, M. S. Shoichet // *Biomacromolecules.* – 2008. – № 1. – P. 166–174.

18. *Sato K.* Expression and distribution of CD44 and hyaluronic acid in human vocal fold mucosa / K. Sato, K. Sakamoto, T. Nakashima // *Ann. Oto. Rhinol. Laryngol.* – 2006. – № 10. – P. 741–748.

19. *Voigt J.* Hyaluronic acid derivatives and their healing effect on burns, epithelial surgical wounds, and chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials / J. Voigt, V. R. Driver // *Wound Repair Regen.* – 2012. – Vol. 20, № 3. – P. 317–331.

## MORPHOLOGY OF THE LEATHER AFTER THERMAL INFLUENCE IN CONDITIONS OF COMPLEX APPLICATION CHITOZAN, HYALURONIC ACIDS AND ANGIOGENIN

V.H. Gabitov, A.B. Umetalieva

*Centre of Science of Reconstructive-Regenerative Surgery, Bishkek, Kyrgyzstan*

The experimental research of a reparation of the fabric induced by combined use chitozan, hyaluronic acids and angiogenin, has shown, that they form a basis on which it is organized normal fabric structure that does these preparations by a necessary component of early therapy of thermal damages of a leather for through corrections of a lymphatic drainage burn wounds. Joint application of a complex “chitozan+hyaluronic acids+angiogenin” is the most effective way of restoration of structure of a leather.

**Keywords:** structure of a leather, a burn, chitozan, hyaluronic an acid, angiogenin.