

УДК 612

## ГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ РАН

Глухов А.А., Фролов Р.Н., Алексеева Н.Т., Андреев А.А.

ГБОУ ВПО ВГМА им. Н.Н. Бурденко Минздрава России, Воронеж, e-mail: vsurgeon@yandex.ru

В эксперименте на белых крысах с ранами мягких тканей оценивали влияние различных способов введения коллагена на репаративные процессы. Для оценки эффективности применяемого лечения проводили морфологическое исследование тканей в области раны с постановкой гистохимических реакций. Применение аппликационно-инъекционного введения гидролизата коллагена способствует стимулированию репаративных процессов, сокращает сроки лечения с улучшением косметического результата. Наибольшая эффективность лечения асептических ран при аппликационно-инъекционном введении коллагена проявляется степенью восстановительных преобразований, выражающихся в прогрессирующем накоплении РНК в функционально активных слоях эпидермиса на фоне эпидермизации раны; максимальном содержании SH-групп к 7-м суткам с последующим снижением, что соответствует ускорению стратификации эпидермиса, приближающегося по толщине и степени дифференцировки к интактным кожным покровам.

**Ключевые слова:** раны мягких тканей, гидролизат коллагена, лечение

## THE HISTOCHEMICAL CHARACTERISTIC OF RECOVERY PROCESSES WHEN WOUNDS ARE HEALING

Glukhov A.A., Frolov R.N., Alekseeva N.T., Andreev A.A.

Voronezh N.N. Burdenko State Medical Academy, Voronezh, e-mail: vsurgeon@yandex.ru

In experiments on white rats with wounds of soft tissues examined the effects of different methods of introduction of collagen to repair processes. To test the effect of the treatment was carried out morphological studies of tissue in the wound with the production of histochemical reactions. The use of appliqué and injection introduction collagen hydrolyzate helps to stimulate repair processes, reduces the treatment with improved cosmetic result. The maximum efficiency of treatment aseptic wounds in the third experimental group. It shows the degree of recovery transformation, as the accumulation of RNA in a functionally active layers of the epidermis against epidermization wounds, the maximum content of SH-groups in the 7-th day and then decreased, which corresponds to accelerate epidermal stratification approaching the thickness and grade to intact skin cover.

**Keywords:** wounds of soft tissue, collagen hydrolyzate, treatment

Репаративные процессы в лечение ран остаются краеугольным камнем хирургии, значение которого еще более возрастает с увеличением количества стихийных бедствий, производственных и бытовых травм, военных конфликтов [10, 5, 4, 8]. Известно множество исследований, направленных на изучение гистологических и гистохимических аспектов заживления ран у человека [1, 3, 6, 4], однако полностью морфологические аспекты заживления ран, в том числе на фоне применения различных методов лечения, еще до конца не выяснены [7, 5, 2, 4].

**Цель исследования** – морфологически обосновать целесообразность использования коллагена и способы его введения при лечении кожных ран.

### Материалы и методы исследования

Исследования проводились на 96 половозрелых белых крысах самцах массой 250 ± 25 г. Работа включала 4 группы животных – 1 контрольную и 3 опытные по 6 животных в каждой. Всем животным под эфирным наркозом на выбритом от шерсти участке в области передней поверхности средней трети бедра наносили стандартную линейную рану 1,0×0,5 см. Лечение проводили сразу после моделирования. Для лечения применялся гидролизат коллагена с содержанием сухого вещества 16%. В первой опытной группе лечение заключалось в аппликационном на-

несении гидролизата коллагена на область раны. Во второй опытной группе гидролизат коллагена вводили вокруг раны инъекционно, перпендикулярно к поверхности раны, на глубину 0,5 см, из расчета 2 мл на 1 см<sup>3</sup>, что позволило выполнить оптимальное введение вещества по всему объему тканей околораневой зоны, без лишней травматизации тканей. В третьей опытной группе применялся комплексный подход инъекционно-аппликационного введения – сначала выполнялись инъекции, а затем аппликации гидролизатом коллагена. Во всех опытных группах лечение проводилось однократно на первые сутки от начала моделирования раны. В контрольной группе лечение не применялось.

Для оценки эффективности применяемого лечения проводили морфологическое исследование тканей в области раны с постановкой гистохимических реакций. Взятие материала для морфологического исследования осуществлялось на 1, 3, 7 и 11-е сутки от начала лечения. Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине, изготавливали парафиновые срезы. Для структурно-функциональной оценки восстановительных процессов в пределах эпидермиса проводили анализ гистохимических реакций при выявлении РНК с Азуром Б по S. Shea и сульфгидрильных групп (SH-групп) белков по Швермону и Фредерику [9, 11]. Визуально оценивалась интенсивность цветной гистохимической реакции и топохимия осадка. Для количественного анализа определяли продукты гистохимических реакций в пределах базального и шиповатого слоёв как наиболее функционально активных, обеспечивающих репаративные процессы

в эпидермисе, с помощью анализатора изображений «Видеотест». Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы Statistica 6. Достоверность различий оценивали по двухстороннему критерию Стьюдента с поправкой Ньюмана–Кейлса.

### Результаты исследований и их обсуждение

Выявление РНК у животных контрольной группы показало наличие продукта гистохимической реакции в виде базофильной субстанции различной степени интенсивности. Наиболее интенсивная базофилия наблюдается в пределах базального и шиповатого слоев, что косвенно указывает на активные метаболические процессы на данном уровне. Поверхностно расположенные слои дают менее интенсивную гистохимическую реакцию. Визуальная оценка содержания РНК в клетках эпидермиса позволила установить, что продукт реакции откладывается в виде пылевидной базофилии в цитоплазме, встречаются клетки с более крупными гранулами в перинуклеарной зоне или по периферии цитоплазмы. По данным микрофотометрии, средняя оптическая плотность РНК в клетках базального и шиповатого слоев составила  $0,24 \pm 0,01$  усл. ед. Определение SH-групп в пределах эпидермиса показало разнообразие гистохимической реакции на уровне различных слоев. Наибольшее количество сульфгидрильных групп отмечается в роговом слое, менее выраженная реакция отмечается в глуболежащих слоях эпидермиса. SH-группы распространены в основном диффузно или в виде мелкозернистой массы. Более высокая реакционная способность определяется в поверхностных слоях интактного эпителиального пласта по сравнению с эпидермисом околораневой зоны. Средний уровень оптической плотности SH-группы в клетках базального и шиповатого слоев составил  $0,26 \pm 0,01$  усл. ед. На 3-и сутки у животных контрольной группы на фоне репаративных процессов изменяются гистохимические показатели. Интенсивность окраски эпителиальных клеток при выявлении РНК усиливается, выраженность реакции выше в глубоких слоях эпидермиса, где преобладает равномерное отложение продукта реакции, в отдельных клетках наблюдается локализация базофильного материала в перинуклеарной зоне. Среднее значение оптической плотности РНК составляет  $0,26 \pm 0,01$  усл. ед. Анализ гистохимической реакции выявления сульфгидрильных групп в пределах слоев эпидермиса в области раны позволил установить, что визуально не определяются особенности в топахимии осадка. Количественная оценка средней оптической

плотности SH-групп в клетках базального и шиповатого слоев ( $0,26 \pm 0,01$  усл. ед.) констатирует сохранение уровня предыдущего экспериментального срока. На 7-е сутки в пределах раневого дефекта продолжается эпителизация, выражающаяся в увеличении толщины и протяженности пласта новообразованного эпидермиса. Данные морфологические преобразования сочетаются с повышением обменных процессов, что подтверждается увеличением среднего значения оптической плотности РНК ( $0,30 \pm 0,01$  усл. ед.) в пределах базального и шиповатого слоев. Количество сульфгидрильных групп в эпидермисе увеличивается, средняя оптическая плотность в пределах базального и шиповатого слоев составляет  $0,28 \pm 0,02$  усл. ед. На 11-е сутки в препаратах контрольной группы в области новообразованного эпидермиса при выявлении РНК определяется выраженная базофилия на уровне глубоких слоев. Установлено увеличение уровня РНК ( $0,31 \pm 0,02$  усл. ед.) на фоне существенного снижения оптической плотности SH-групп ( $0,27 \pm 0,01$  усл. ед.), что может свидетельствовать о незавершенности процессов стратификации эпидермиса.

Выбор эффективных методов регионального воздействия на ткани в области раны определяется необходимостью не только стимулировать репаративные процессы в зоне дефекта тканей, но и создавать оптимальные условия для пролиферативных превращений, обеспечивающих качественное восстановление кожи.

На 1-е сутки в первой опытной группе после аппликации гидролизата коллагена при выявлении РНК выявляется умеренная цитоплазматическая базофилия с более выраженной реакцией в пределах базального и шиповатого слоев, где среднее значение оптической плотности составило  $0,25 \pm 0,01$  усл. ед., не имея достоверных отличий от контрольного уровня. Выявление SH-групп показало, что по краям раны эпидермис характеризуется невысоким уровнем средней оптической плотности SH-групп ( $0,26 \pm 0,02$  усл. ед.), не отличающийся от контрольных значений. На 3-и сутки после лечения в эпидермисе отмечается стимуляция синтетических процессов, о чем свидетельствует повышение метаболической активности в пределах базального и шиповатого слоев – среднее значение оптической плотности повышено ( $0,27 \pm 0,01$  усл. ед.) по сравнению с контролем и с предыдущим экспериментальным сроком. Процессы реэпителизации раны характеризуются незначительным повышением среднего значения оптической плотности сульфгидрильных групп ( $0,26 \pm 0,01$  усл. ед.).

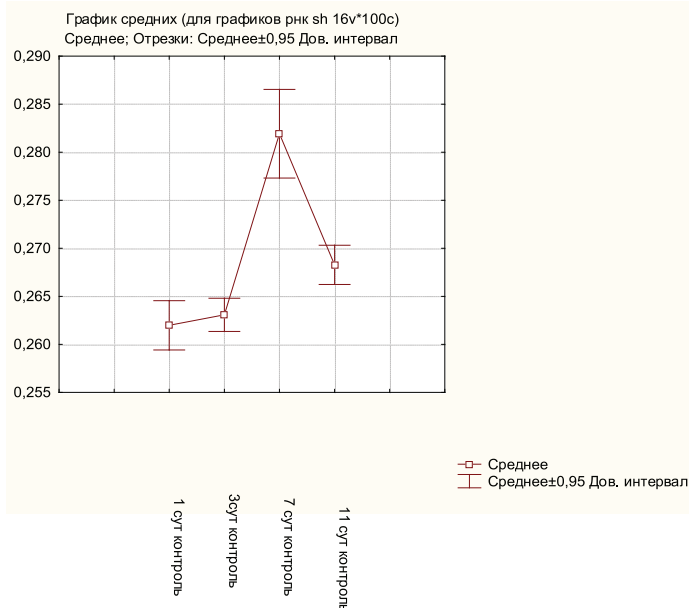


Рис. 1. Значения средней оптической плотности SH-групп в клетках базального и шиповатого слоев контрольной группы

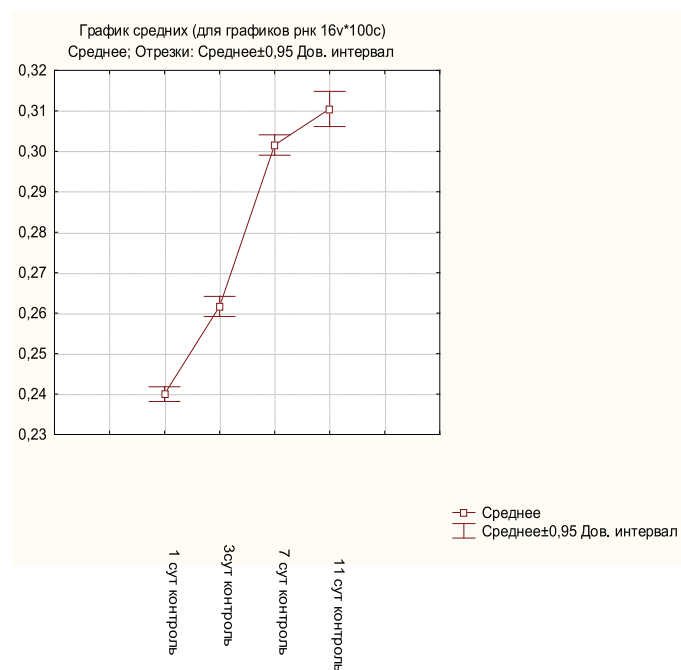


Рис. 2. Значения средней оптической плотности РНК в клетках базального и шиповатого слоев контрольной группы

На 7-е сутки процесс регенерации усиливается, что выражается в восстановлении целостности кожного покрова почти у всех животных; это находит подтверждение в гистохимических показателях: среднее значение оптической плотности РНК составляет  $0,31 \pm 0,02$  усл. ед., превышая контрольный уровень. Отмечается отложение продуктов реакции при выявлении SH-групп преимущественно в поверхностных слоях,

что указывает на процессы ороговения. В функционально активных слоях среднее значение сульфгидрильных групп превышает контрольный уровень и составляет  $0,29 \pm 0,01$  усл. ед. На 11-е сутки в первой опытной группе толщина слоев увеличена по сравнению с эпидермисом интактной кожи в основном за счет глубжележащих слоев. Среднее значение оптической плотности РНК в клетках базального и шипова-

того слоев составляет  $0,32 \pm 0,01$  усл. ед., что превышает уровни контрольной группы и предыдущего экспериментального срока. Это свидетельствует о том, что ремоделирование раны продолжается на фоне повышенной синтетической активности эпидермиса. Выявление сульфгидрильных групп показало, что качественных особенностей в распределении продуктов гистохимической реакции не отмечалось, количественный анализ указывает на тенденцию к снижению среднего значения оптической плотности SH-групп ( $0,28 \pm 0,01$  усл. ед.) по сравнению с предыдущим экспериментальным сроком, что свидетельствует о стабилизации процессов дифференцировки в пределах эпидермиса.

Во второй опытной группе после инъекционного введения гидролизата коллагена в область раны на 1-е сутки активизируются синтетические процессы на уровне базального и шиповатого слоев эпидермиса, это отражается повышением уровня РНК и SH-групп. Средний уровень оптической плотности РНК составляет  $0,25 \pm 0,01$  усл. ед., а сульфгидрильных групп  $0,27 \pm 0,02$  усл. ед.; данные показатели превышают контрольные значения. На 3-и сутки в результате структурно-метаболических преобразований тканей в зоне восстановления кожных покровов на фоне реэпителизации раны происходит усиление пролиферативных процессов, что сопровождается повышением уровня РНК ( $0,27 \pm 0,01$  усл. ед.) по сравнению с контрольной группой; в сравнении с первой опытной группой достоверных отличий не отмечается. Среднее значение оптической плотности РНК в пределах базального и шиповатого слоев составляет  $0,27 \pm 0,01$  усл. ед. Среднее значение оптической плотности SH-групп составляет  $0,27 \pm 0,02$  усл. ед. На 7-е сутки после инъекционного введения гидролизата коллагена на фоне полного восстановления кожного дефекта отмечается усиление метаболических процессов с повышением изучаемых характеристик. Среднее значение оптической плотности РНК в клетках базального и шиповатого слоев достоверно превышает аналогичный показатель у животных контрольной группы и составляет  $0,32 \pm 0,01$  усл. ед. Топохимия осадка при данной гистохимической реакции без особенностей. Среднее значение оптической плотности SH-групп также превышает контрольный уровень, но сохраняется уровень первой опытной группы, что подчеркивает синхронность процессов дифференцировки эпидермиса в этих экспериментальных группах ( $0,29 \pm 0,01$  усл. ед.). На 11-е сутки

в восстановленном эпидермисе отмечается стабилизация синтетических процессов, но толщина слоев отличается от интактной кожи, что свидетельствует о незавершении стратификации в пределах эпидермиса. Среднее значение оптической плотности РНК составляет  $0,34 \pm 0,004$  усл. ед. Для данной экспериментальной группы характерно снижение содержания SH-групп в пределах базального и шиповатого слоев, среднее значение оптической плотности составляет  $0,27 \pm 0,01$  усл. ед.

На 1-е сутки после аппликационно-инъекционного введения гидролизата коллагена качественная характеристика гистохимических реакций не отличается от предыдущих экспериментальных групп. Величина среднего значения оптической плотности РНК в пределах функционально активных слоев составляет  $0,26 \pm 0,01$  усл. ед., незначительно превышая контрольный уровень, что создает условия для интенсификации пролиферативных процессов. Среднее значение оптической плотности SH-групп ( $0,28 \pm 0,02$  усл. ед.) также превышает контрольный уровень, что потенцирует восстановительные процессы, так как сульфгидрильные группы играют важную роль в жизнедеятельности эпителиальных клеток. На 3-и сутки начинается восстановление целостности кожных покровов, эпидермис перемещается от периферии к центру, что коррелирует с гистохимическими показателями – среднее значение оптической плотности РНК составляет  $0,29 \pm 0,01$  усл. ед., превышая контрольный уровень. Показатели функционально активных групп белков сохраняют уровень предыдущего экспериментального срока, среднее значение оптической плотности SH-групп –  $0,28 \pm 0,02$  усл. ед. На 7-е сутки отмечается заполнение дефекта сформированным эпидермисом. Выраженность процесса стратификации приближается к уровню интактной кожи. Среднее значение оптической плотности РНК в клетках базального и шиповатого слоев составляет  $0,33 \pm 0,02$  усл. ед., что достоверно превышает значение данного показателя в контрольной группе. Сходная количественная динамика наблюдается при выявлении SH-групп, среднее значение оптической плотности этих групп белков возрастает, достигая максимальных значений в этом эксперименте ( $0,34 \pm 0,02$  усл. ед.). На 11-е сутки стабилизация гистохимических реакций сопровождается процессами преобразований в пределах восстановительного эпидермиса. Среднее значение оптической плотности РНК ( $0,33 \pm 0,02$  усл. ед.) достоверно отличается от контрольной группы, но не изменяется на протяжении

от последнего экспериментального срока. Уровень содержания сульфгидрильных групп превышает контрольные значения и составляет  $0,29 \pm 0,01$  усл. ед., но по срав-

нению с предыдущим сроком наметилась тенденция к снижению, что указывает на стабилизацию процессов стратификации эпидермиса.

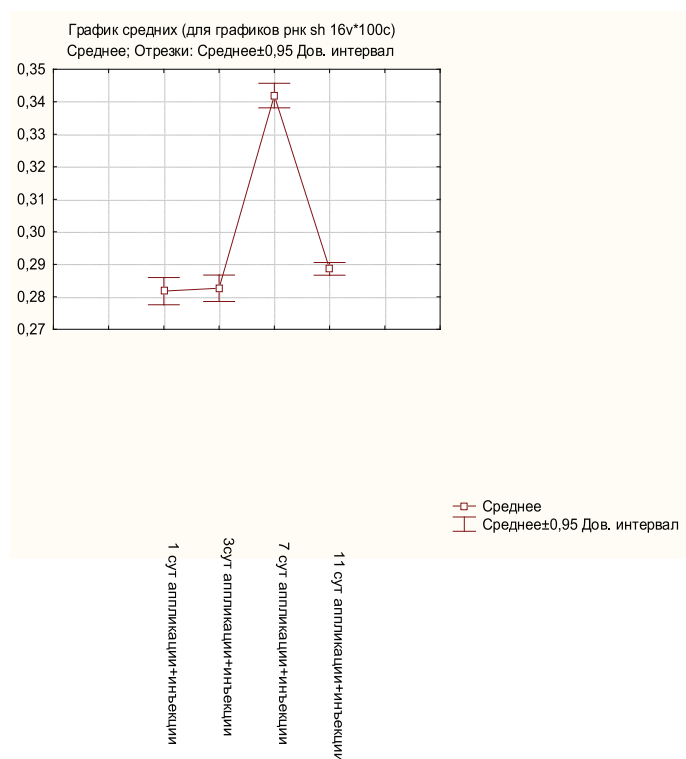


Рис. 3. Значения средней оптической плотности SH-групп в клетках базального и шиповатого слоев в опытной группе после аппликационно-инъекционного введения коллагена

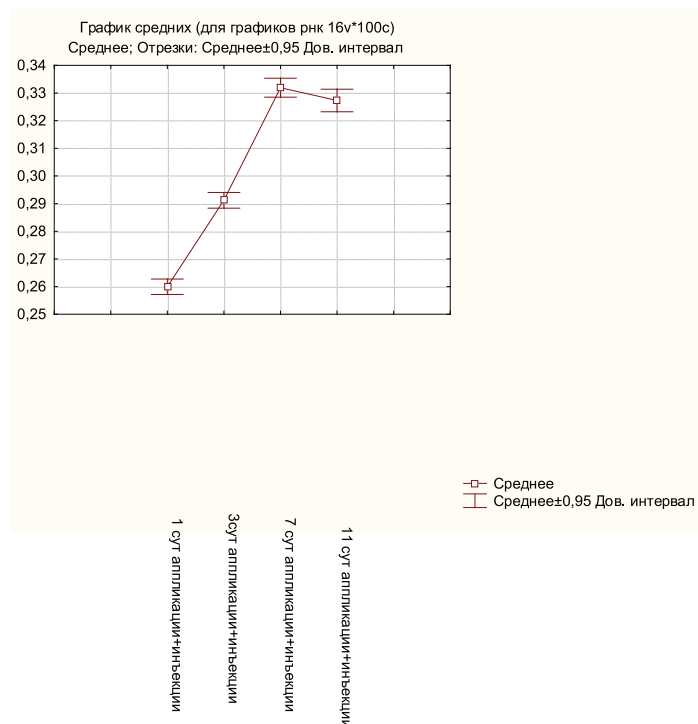


Рис. 4. Значения средней оптической плотности РНК в клетках базального и шиповатого слоев в опытной группе после аппликационно-инъекционного введения коллагена

Анализ результатов гистохимических реакций показал, что в опытных группах после аппликационного и инъекционного введения гидролизата коллагена сохраняется динамика восстановительных процессов, соответствующая направленности преобразований у животных контрольной группы; накопление РНК в процессе эпидермизации раны; повышение содержания SH-групп по мере дифференцировки эпидермиса с последующим снижением, что соответствует завершению процессов стратификации в области раны, но уровень гистохимических реакций достигает наибольших значений в третьей опытной группе после аппликационно-инъекционного метода введения.

### Выводы

1. Использование гистохимических методов позволяет морфологически обосновать улучшение результатов при использовании комбинированного способа введения гидролизата коллагена при лечении ран.

2. Применение аппликационно-инъекционного введения гидролизата коллагена способствует стимулированию репаративных процессов, сокращает сроки лечения с улучшением косметического результата.

3. Наибольшая эффективность лечения асептических ран в третьей опытной группе проявляется степенью восстановительных преобразований, выражающихся в прогрессирующем накоплении РНК в функционально активных слоях эпидермиса на фоне эпидермизации раны; максимальном содержании SH-групп к 7-м суткам с последующим снижением, что соответствует ускорению стратификации эпидермиса, приближающегося по толщине и степени дифференцировки к интактным кожным покровам.

### Список литературы

1. Абдулаева З.Ш. Стимуляция репаративных процессов при лечении гнойных ран с применением наноксигенизированных антибактериальных микст-препаратов / З.Ш. Абдулаева, А.С. Казимагомедов, З.М. Искандеров // Астраханский медицинский журнал. – 2009. – Т. 4, № 4. – С. 21–26.
2. Алексеева Н.Т. Гистохимические изменения в зоне раневого дефекта в динамике после применения гидроимпульсной санации и поляризованной светотерапии / Н.Т. Алексеева // Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – Т. 19, № 2. – С. 82–85.
3. Глухов А.А. Морфологическая оценка эффективности применения светотерапии в лечении ран мягких тканей / А.А. Глухов, Н.Т. Алексеева, А.П. Остроушко // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2012. – № 2. – С. 72–73.
4. Еремин Н.В., Ультроструктурная оценка ангиогенеза и клеточного микроокружения в кожной ране под влиянием низкоинтенсивного лазерного излучения / Н.В. Еремин, М.В. Мнихович. // Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – Т. 14, № 2. – С. 316–319.
5. Изатулин В.Г. Использование пролактина для заживления кожных ран в эксперименте / В.Г. Изатулин, В.Ю. Лебединский, И.М. Кенсовская // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. – 2008. – № 6. – С. 35–36.
6. Намоконов Е.В. Антиоксидантная стимуляция репаративных процессов ране в эксперименте. / Е.В. Намоконов,

М.Н. Лазуткин, А.М. Миromanov // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. – 2012. – № 4–1. – С. 215–217.

7. Паршикова С.А. Прогнозирование послеоперационных осложнений при лечении обширных укушенных ран лица у детей с помощью инфракрасной термографии / С.А. Паршикова, В.В. Паршиков, Ю.П. Потехина // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2012. – Т. 5, № 2. – С. 339–345.

8. Профилактика раневой инфекции и морфологические аспекты заживления асептической раны / А.Б. Ларичев [и др.] // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2011. – Т. 4, № 4. – С. 728–733.

9. Пирс Э. Гистохимия. – М., 1962. – 962 с.

10. Раневая повязка на основе наноструктурированного графита – пример оптимального соотношения сорбционных и адгезивных свойств / А.В. Штейнле // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – Т. 27, № 2. – С. 131–136.

11. Shea S.K. A method for in situ cytophotometric estimation of absolute amount of ribonucleic acid using azure B // J. Histochem. Cytochem. – 1970. – Vol. 18, № 2. – P. 143–152.

### References

1. Abdulaeva Z.Sh. Stimuljacija reparativnyh processov pri lechenii gnojnyh ran s primeneniem nanooksigenizirovannyh antibakterial'nyh mikst- preparatov / Z.Sh. Abdulaeva, A.S. Kazimagomedov, Z.M. Iskanderov // Astrahanskij medicinskij zhurnal. 2009. T. 4, no. 4. pp. 21–26.
2. Alekseeva N.T. Gistohimicheskie izmenenija v zone ranevogo defekta v dinamike posle primenenija gidroimpul'snoj sanacii i poljarizovannoj svetoterapii / N.T. Alekseeva // Vestnik novyh medicinskih tehnologij. 2012. T. 19, no. 2. pp. 82–85.
3. Gluhov A.A. Morfologicheskaja ocenka jeffektivnosti primenenija svetoterapii v lechenii ran mjagkih tkanej / A.A. Gluhov, N.T. Alekseeva, A.P. Ostroushko // Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij. 2012. no. 2. pp. 72–73.
4. Eremin N.V., Ul'trastrukturnaja ocenka angiogeneza i kletocnogo mikrookruzenija v kozhnoj rane pod vlijaniem nizkointensivnogo lazernogo izlucenija / N.V. Eremin, M.V. Mnihovich. // Vestnik novyh medicinskih tehnologij. 2012. T. 14, no. 2. pp. 316–319.
5. Izatulin V.G. Ispol'zovanie prolaktina dlja zazhivlenija kozhnyh ran v jeksperimente / V.G. Izatulin, V.Ju. Lebedinskij, I.M. Kensovskaja // Bjuulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo centra SO RAMN. 2008. no. 6. pp. 35–36.
6. Namokonov E.V. Antioksidantnaja stimuljacija reparativnyh processov rane v jeksperimente. / E.V. Namokonov, M.N. Lazutkin, A.M. Miromanov // Bjuulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo centra SO RAMN. 2012. no. 4–1. pp. 215–217.
7. Parshikova S.A. Prognozirovanie posleoperacionnyh oslozhenij pri lechenii obshirnyh ukushennyh ran lica u detej s pomoshh'ju infrakrasnoj termografii / S.A. Parshikova, V.V. Parshikov, Ju.P. Potehina // Vestnik jeksperimental'noj i klinicheskoj hirurgii. 2012. T. 5, no. 2. pp. 339–345.
8. Profilaktika ranевой infekcii i morfologicheskie aspekty zazhivlenija asepticheckoj rany / A.B. Larichev [i dr.] // Vestnik jeksperimental'noj i klinicheskoj hirurgii. 2011. T. 4, no. 4. pp. 728–733.
9. Pirs Je. Gistohimija / Je. Pirs // M. 1962. 962 p.
10. Ranevaja povjazka na osnove nanostrukturirovanogo grafitu – primer optimal'nogo sootnoshenija sorbcionnyh i adgezivnyh svojstv / A. V. Shtejnle // Sibirskij medicinskij zhurnal 2012. T. 27, no. 2. pp. 131–136.
11. Shea S.K. A method for in situ cytophotometric estimation of absolute amount of ribonucleic acid using azure B / S.K. Shea // J. Histochem. Cytochem. 1970. Vol. 18, no. 2. pp. 143–152.

### Рецензенты:

Корденко А.Н., д.м.н., профессор кафедры анатомии и физиологии, ГБОУ ВПО «Воронежский государственный педагогического университета», г. Воронеж;

Малеев Ю.В., д.м.н., доцент кафедры оперативной хирургии с топографической анатомией, ГБОУ ВПО ВГМА им. Н.Н. Бурденко Минздрава России, г. Воронеж.

Работа поступила в редакцию 16.05.2013.