

УДК 616.001.4:615.468

## ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ РАН ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ХИТОЗАНА

Гладкова Е.В., Бабушкина И.В., Мамонова И.А., Норкин И.А.,  
Пучиньян Д.М., Щуковский В.В.

*ФГБУ «Саратовский научно-исследовательский институт травматологии  
и ортопедии» Минздрава России, Саратов, e-mail: 10051968@mail.ru*

Проведено исследование раневых покрытий, выполненных на основе хитозана. На примере полнослойной условно асептической раны мягких тканей показана высокая регенерирующая способность раневого покрытия, выполненного в виде пленки и содержащего хитозан, церулоплазмин, L-аспарагиновую кислоту, глицерин. Биodeградируемое раневое покрытие за счет особенностей химического состава и использования буферного компонента оказывает оптимизирующее действие на все фазы раневого процесса, приводит к сокращению сроков заживления раны на 22–28%, анатомическому и функциональному восстановлению поврежденных участков, проявляя антиоксидантное и антибактериальное действие. Высокая абсорбционная способность позволяет использовать его в лечении ран с обильной экссудацией. Гидрогель на основе хитозана обладает менее выраженными регенерирующими, антиоксидантными свойствами и в меньшей степени сокращает сроки репаративной регенерации.

**Ключевые слова:** экспериментальная рана, раневые покрытия, гидрогель, хитозан, церулоплазмин, L-аспарагиновая кислота

## THE PECULIARITIES OF EXPERIMENTAL WOUNDS REPARATIVE REGENERATION WHILE USING CHITOSAN

Gladkova E.V., Babushkina I.V., Mamonova I.A., Norkin I.A.,  
Puchinyan D.M., Schukovskiy V.V.

*Federal Government-Financed Institution «Saratov Research Institute of Traumatology  
and Orthopaedics» of Ministry of Public Health of the Russian Federation,  
Saratov, e-mail: 10051968@mail.ru*

The research of wound covering conducted with chitosan application has showed that there is a high regenerative ability of wound coverings made in a skin form and containing chitosan, ceruloplasmin, L-asparaginic acid and glycerol. These findings were proved on an example of a full thickness wound of soft tissues. Taking into account the peculiarities of its chemical constitution biodegradable wound covering in the presence of using buffered ingredient has an optimizing effect on all stages of wound process and leads to healing terms reduce by 22–28%. It also shows antioxidative and antibacterial effect and improves anatomic and functional recovery of damage sectors. High absorption efficiency allows using it in healing wounds with plethorical exudation. Chitosan-based hydrogel has less frank regenerating and antioxidant properties and helps to reduce reparative regeneration terms to less extent.

**Keywords:** experimental wound, wound coverings, hydrogel, chitosan, ceruloplasmin, L-asparaginic acid

Проблема улучшения регенерации раневых повреждений кожи и мягких тканей различного генеза обусловлена высоким процентом вторичного инфицирования, глубокими метаболическими сдвигами на фоне высокой выраженности воспалительных реакций, активации кислород-независимого фагоцитоза и интенсификации свободно-радикальных реакций [2, 5, 6]. Использование раневых покрытий, выполненных на основе природных биodeградируемых полисахаридных полимеров, в частности хитозана, является перспективным направлением регенеративной медицины [3, 8]. Хитозан в составе различных композиций обладает полифункциональными свойствами, биосовместим, экологически безопасен и находит широкое применение в медицине [1, 4, 7].

**Цель работы** – выявить особенности регенераторного процесса условно-асептической полнослойной кожной раны у крыс

под влиянием различных вариантов раневых покрытий на основе хитозана.

### Материалы и методы исследования

В качестве раневых покрытий в работе использовали гидрогель на основе низкомолекулярного хитозана, а также раневое покрытие, выполненное в виде пленки, содержащей ферментный антиоксидант церулоплазмин, L-аспарагиновую кислоту, пластификатор – глицерин (заявка на изобретение № 2013114222, приор. от 28.03.2013, реш. о выдаче патента на изобретение от 12.03.2014). Исследование проводили на 40 беспородных половозрелых белых крысах-самцах, в возрасте 6–7 мес., массой тела  $180 \pm 30$  г. Проведение эксперимента не противоречило Женевской конвенции 1985 г. «Международные биомедицинские исследования с использованием животных» и «Протоколу исследований», утвержденному комитетом по этике ГОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет Росздрава РФ» (Протокол № 13 от 10.04.2007 г.). Животные содержались в условиях вивария, отвечающих стандартным требованиям, со свободным доступом к пище и воде в индивидуальных послеоперационных клетках.

Формирование полнослойной кожной раны 30 крысам осуществляли путем иссечения полнослойного кожного лоскута в межлопаточной области площадью 400 мм<sup>2</sup> в асептических условиях под общей анестезией (внутримышечно комбинация золетила («Virbac Sante Animale», Франция) в дозе 0,1 мл/кг и ксилазина («Interchemie», Нидерланды) в дозе 1 мг/кг). Всем животным рану тщательно обрабатывали изотоническим раствором хлорида натрия, затем 10 животным первой опытной группы на поврежденную поверхность наносили гидрогель на основе хитозана, 10 крысам второй опытной группы – раневое покрытие в виде пленки. У 10 животных группы сравнения рана заживала самостоятельно. 10 интактных крыс составили группу контроля при проведении биохимического мониторинга.

Скорость заживления ран оценивали каждые сутки (в %) с использованием планиметрических методов. В исследовании использовали планиметрический метод, предложенный Г.М. Ярмольчук (1980), Г.Г. Автандиловым (1990) и основанный на регистрации скорости уменьшения площади раневого дефекта. При контрольных исследованиях визуально оценивали наличие и характер воспалительно-репаративных процессов по состоянию краев и дна раны, срокам появления грануляций и особенностям эпителизации ран.

В динамике производили бактериологические исследования раневой поверхности с использованием стандартных методик. В случае присоединения вторичного инфицирования идентификацию выделенных штаммов проводили с помощью микробиологического анализатора BBL Auto Reader BD (США).

С целью оценки активности процессов липопероксидации определяли уровень малонового диальдегида (МДА) в реакции с тиобарбитуровой кислотой (Коробейникова Э.Н., 1989). Состоятельность системы антиоксидантной защиты оценивали по активности сывороточного ферментного антиоксиданта церулоплазмينا (ЦП) в реакции окисления раствора парафенилендиамина с пересчетом результатов в условные единицы (Колб В.Г., Камышников В.С., 1976).

Цитологическое исследование проводили, изучая мазки-отпечатки, полученные на 3, 5, 7, 10 и 14 сутки с поверхности раневого дефекта после отделения струпа и окрашенные цитологическим красителем «Лейкодиф 200». Производили подсчет количества нейтрофильных лейкоцитов и клеток фибробластического ряда в пересчете на 100 клеток. Изменение количества клеточных элементов относительно нормальных величин рассматривали как критерий активности процесса восстановления.

Морфо-гистохимические исследования выполняли после выведения крыс из эксперимента. Фрагменты тканей, полученные из области раневых дефектов, фиксировали в нейтральном забуференном 10%-ном формалине, в последующем осуществляли проводку в спиртах восходящей плотности и заливку в парафин. Готовили с помощью микротомы срезы тканей толщиной 5 мкм, окрашивали их гематоксилин-эозином для дифференцировки структурных элементов. Гликозаминогликаны выявляли при окрашивании тканей альциановым синим при pH = 1,0 (высокосульфатированные гликозаминогликаны) и при pH = 2,5 (суммарные сульфатированные гликозаминогликаны). Коллагеновые волокна визуализировали в реакции Ван-Гизон трихром и Массон трихром с анилиновым синим. Кроме того, прово-

дили идентификацию коллагеновых и эластических волокон по Вейгерт Ван-Гизон и Маллори трихром.

Статистическую обработку полученных численных результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0.

### Результаты исследования и их обсуждение

При планиметрическом исследовании выявлено, что применение раневого покрытия оказывало выраженное влияние на регенерацию неинфицированной раны по отношению к группе сравнения и к показателям первой опытной группы во все сроки проведения контрольных измерений. К 10-м суткам наблюдения у всех животных второй опытной группы и 70% первой опытной группы наблюдали полное заживление раневой поверхности. На 14-е сутки наблюдения у всех крыс первой опытной группы отмечалась эпителизация раневого дефекта. Несколько иные сроки заживления характеризовали группу сравнения. Так, у 8 крыс этой группы заживление ран происходило только к 21-м суткам опыта, при этом у 2 животных сохранялся незначительный раневой дефект, вызванный его вторичным инфицированием (таблица).

Бактериологические исследования поверхности ран животных обеих опытных групп подтвердили асептическое их состояние. У двух животных группы сравнения на 5 сутки после операции из раны была высеяна *E. coli* (3,8 ± 1,3 КОЕ), что свидетельствовало о присоединении вторичной инфекции, которая сохранялась до завершения исследования, то есть до 21 суток наблюдения, и сопровождалась явлениями отечности и выраженной гиперемии краев раны, гнойным отделяемым, скоплениями некротических масс на дне раны и увеличением сроков ее регенерации.

Цитологически у животных всех групп в 1-е сутки наблюдения доминировали гранулоциты, встречались лишь единичные фибробласты, лимфоциты и макрофаги. Третьи сутки с момента формирования раны, когда формируется картина воспаления, принимают за исходные. В это время у крыс обеих опытных групп в периферических участках повреждения отмечали очаги полиморфно-нуклеарной инфильтрации и единичные скопления гистиоцитов. Дно раны было покрыто значительным количеством миофибробластов, гистиоцитов. Визуально подлежащие ткани характеризовались наличием участков грануляционной ткани, отчетливых признаков краевой эпителизации, выраженного полнокровия кровеносных сосудов. На 5-е сутки произошло снижение ( $p < 0,01$ ) числа доминирующих нейтрофилов по сравнению с исходными

показателями (соответственно  $93,25 \pm 0,63$  и  $98,34 \pm 1,17$  – 1-я опытная группа и  $97,44 \pm 1,45$  и  $84,13 \pm 0,22$  – 2-я опытная группа), а также появились клетки фибробластического ряда. На 5-е сутки полнокровные сосудов уменьшалось у крыс обеих опытных групп. У животных группы сравнения на 5-е сутки в цитограмме преобладали нейтрофильные лейкоциты, отмечалось некоторое их снижение (в 0,89 раза) по сравнению с исходными показателями за

исключением особей с вторичным инфицированием ран. К 7 суткам наблюдения происходило дальнейшее снижение содержания нейтрофилов у крыс 1-й опытной группы (до  $35,18 \pm 1,3$ ) с одновременным повышением содержания фибробластов в 67,4 раза по сравнению с исходными показателями. На 14-е сутки эксперимента наблюдалось снижение числа нейтрофильных лейкоцитов в 2,6 раза (до  $25,70 \pm 0,67$ ) и увеличение количества фибробластов до  $60,3 \pm 1,8$ .

Изменение площади экспериментальных ран (мм<sup>2</sup>) у животных группы сравнения и опытных групп ( $M \pm m$ )

Сроки наблюдения, сутки	Группа сравнения (n = 10)	Первая опытная группа (n = 10)	Вторая опытная группа (n = 10)
1-е	$390,05 \pm 3,25$	$392,00 \pm 0,89$	$389,16 \pm 2,11$
3-и	$334,00 \pm 7,10$	$231,45 \pm 4,29$ $p_1 < 0,001$	$117,41 \pm 1,88$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,001$
5-е	$221,37 \pm 9,79$	$109,08 \pm 2,22$ $p_1 < 0,001$	$56,11 \pm 1,26$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,001$
7-е	$153,40 \pm 7,46$	$34,60 \pm 3,81$ $p_1 < 0,001$	$11,40 \pm 0,73$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,001$
10-е	$87,41 \pm 2,80$	$22,31 \pm 1,16$ $p_1 < 0,001$	0,00
14-е	$19,28 \pm 3,44$	0,00	
21-е	$2,90 \pm 0,21$		

Примечания:  $p_1$  – разница показателей между 1-й опытной группой и группой сравнения;  $p_2$  – разница показателей между 2-й опытной группой и группой сравнения;  $p_3$  – разница показателей между 1-й и 2-й опытными группами.

Биохимический мониторинг показателей перекисно-антиоксидантного баланса в сыворотке крови показал, что уровень МДА у животных первой опытной группы ( $2,83 \pm 0,11$  мкмоль/л) уже на 4-е сутки наблюдения был существенно ниже ( $p < 0,05$ ), чем у крыс группы сравнения ( $3,21 \pm 0,12$  мкмоль/л) и приближался к нормальным значениям ( $2,74 \pm 0,13$  мкмоль/л) уже к 8-м суткам. В группе сравнения данный показатель оставался повышенным на протяжении всего периода наблюдений, особенно у животных с явлениями вторичного инфицирования. На 7-е сутки у крыс первой и второй опытных групп повышается ( $p < 0,001$ ) активность церулоплазмينا (соответственно  $23,46 \pm 0,65$  у.е. и  $31,82 \pm 0,67$  у.е.) в отличие от показателей животных группы сравнения ( $18,36 \pm 0,43$  у.е.). Следует отметить, что активность церулоплазмينا была существен-

но выше у крыс второй опытной группы ( $p < 0,001$ ) по сравнению с таковыми второй.

Гистологически на 3-и сутки в регенерирующей ткани определяли фибробласты, гранулоциты, незначительное количество макрофагов и лимфоцитов. В отличие от группы сравнения в более короткие сроки (в 1,2 раза) происходило уменьшение признаков перифокального отека, освобождение от фибринозно-некротического экссудата.

При выведении животных из эксперимента на 21-е сутки наблюдения у крыс группы сравнения регенерат был представлен плотной рубцовой тканью, химически характеризующейся значительным объемом сульфатированных гликозаминогликанов, отсутствием полноценных структурных компонентов. Коллагеновые волокна дезориентированы, расположены беспорядочно. У крыс обеих опытных групп на 21-е сутки

образовывался полноценный соединительнотканый матрикс с горизонтально ориентированным зрелым коллагеном. Отмечено формирование полноценных кожных структур со сформированными салными железами. У крыс групп сравнения в те же сроки отмечено наличие участков метахромазии, коллагеновые волокна расположены хаотично, реже – вертикально по ходу сосудов.

### Заключение

Использование в отношении условно асептических ран препаратов на основе природного биополимера хитозана сокращает сроки экссудативной фазы воспалительной реакции, оказывает стимулирующее влияние на пролиферативную фазу, способствует синтезу зрелого коллагена и фиброзной трансформации. Кроме того, препараты на основе хитозана оказывают антиоксидантное, антибактериальное и регенерирующее действие, более выраженное у формы, содержащей дополнительные активные компоненты (церулоплазмин, L-аспарагиновую кислоту).

### Список литературы

1. Байкулов А.К. Влияние хитозана на синтез РНК и ДНК при ожогах // Врач – аспирант. – 2012. – Т. 54, № 4. – С. 26–29.
2. Воронин А.С. Применение раневых покрытий в комплексном лечении ран и раневой инфекции кожи и мягких тканей // Аспирантский вестник Поволжья. – 2010. – № 7–8. – С. 158–161.
3. Морфологические особенности процессов регенерации ран при лечении коллаген-хитозановыми и желатин-хитозановыми губками / С.Ф. Антонов, Б.А. Парамонов, Б.А. Никонов [и др.] // Вестник Северо-Западного государственного университета им. И.И. Мечникова. – 2014. – Т. 4, № 2 – С. 59–62.
4. Регенерация тканей преддверия рта при использовании геля хитозана / А.М. Бауэр, И.А. Голубева, В.А. Головнев [и др.] // Медицина и образование в Сибири. – 2011. – № 5. – С. 9.
5. Толстых М.П. Проблема комплексного лечения гнойных ран различного генеза и трофических язв: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2002. – 42 с.
6. Экспериментальное обоснование эффективности раневой адсорбирующей повязки на основе наноструктурированного графита / Н.В. Рязанцева, Г.П. Хандорин,

О.Л. Хасанов [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2009. – № 4. – С. 60–64.

7. Prajapati Bhupendra G., Sawant Krutika K. Poly Electrolyte pf Chitosan Alginate for Local Drug Delivery // Int. J. Chem. Trch. Research. – 2009. – Vol. 1, Issue 3. – P. 643–648.

8. Preparation and Characterization of absorbable hemostat crosslinked gelatin sponges for surgical applications / M. Kabiri, S.H. Emami, M. Rafinina, M. Tahriri // Current Applied Physics. – 2011. – Vol. 11, Issue 3. – P. 457–461.

### References

1. Bajkulov A.K. Vlijanie hitozana na sintez RNK i DNK pri ozhogah // Vrach aspirant. 2012. T. 54, no. 4. pp. 26–29.

2. Voronin A.S. Primenenie ranevyh pokrytij v kompleksnom lechenii ran i ranевой infekcii kozhi i mjagkih tkanej // Aspirantskij vestnik Povolzh'ja. 2010. no. 7–8. pp. 158–161.

3. Morfologicheskie osobennosti processov regeneracii ran pri lechenii kollagen-hitozanovymi i zhelatin-hitozanovymi gubkami / S.F. Antonov, B.A. Paramonov, B.A. Nikonov [i dr.] // Vestnik Severo-Zapadnogo gosudarstvennogo universiteta im. I.I. Mechnikova. 2014. T. 4, no. 2 pp. 59–62.

4. Regeneracija tkanej preddverija rta pri ispol'zovanii gеля hitozana / A.M. Baujer, I.A. Golubeva, V.A. Golovnev [i dr.] // Medicina i obrazovanie v Sibiri. 2011. no. 5. pp. 9.

5. Tolstyh M.P. Problema kompleksnogo lechenija gnojnyh ran razlichnogo geneza i troficheskikh jazv: avtoref. dis. ... dokt. med. nauk. M., 2002. 42 p.

6. Jeksperimental'noe obosnovanie jeffektivnosti ranевой adsorbirujushhej povjazki na osnove nanostrukturirovannogo grafitu / N.V. Rjazanceva, G.P. Handorin, O.L. Hasanov [i dr.] // Bjulleten' sibirskoj mediciny. 2009. no. 4. pp. 60–64.

7. Prajapati Bhupendra G., Sawant Krutika K. Poly Electrolyte pf Chitosan Alginate for Local Drug Delivery // Int. J. Chem. Trch. Research. 2009. Vol. 1, Issue 3. pp. 643–648.

8. Preparation and Characterization of absorbable hemostat crosslinked gelatin sponges for surgical applications / M. Kabiri, S.H. Emami, M. Rafinina, M. Tahriri // Current Applied Physics. 2011. Vol. 11, Issue 3. pp. 457–461.

### Рецензенты:

Волков А.А., д.в.н., профессор, заведующий кафедрой терапии, акушерства и фармакологии ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет им. Н.И. Вавилова», г. Саратов;

Гладилин Г.П., д.м.н., профессор, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ФПК и ППС ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, г. Саратов.

Работа поступила в редакцию 07.05.2014.