

Основные особенности репаративной регенерации кожи в условиях применения хитозана

Категория: [Теоретические основы медицины](#)

О.М. Довгилева, Г.В. Хомулло, М.Б. Петрова

ГБОУ ВПО «Тверская ГМА Минздравсоцразвития РФ», кафедра биологии и кафедра глазных болезней

Библиографическая ссылка на статью:

Довгилева О.М., Хомулло Г.В., Петрова М.Б. Основные особенности репаративной регенерации кожи в условиях применения хитозана //Верхневолжский медицинский журнал.-2011.-Т.9. Вып.3 №11 – С.30-37.

Современный этап изучения репаративных процессов связан с поисками новых стимулирующих факторов, ускоряющих заживление повреждений различных органов и тканей. В связи с этим особое значение приобретает использование в качестве стимуляторов регенерации кожи препаратов природного происхождения, которые, в отличие от синтетических, не приводят к различным побочным эффектам. Среди препаратов естественного генеза особое место занимает хитозан – уникальный природный полимер, получаемый из хитина ракообразных. Цель исследования – изучить микроскопические изменения при заживлении ран кожи у животных на всех этапах регенерации в условиях применения хитозана. Материал и методы Эксперименты выполнены на 83 беспородных белых крысах-самцах средней массой 152 г. Животные содержались в виварии в индивидуальных металлических клетках при одинаковом световом, температурном режимах и получали обычный рацион питания согласно установленным нормам. Все эксперименты выполнены в осенне-зимний период. Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом с соблюдением правил эвтаназии. Экспериментальные полнослойные кожные раны наносились однотипно всем животным. Операция проводилась под эфирным наркозом. На спине в межлопаточной области на участке, превышающем размеры бу дущей раны, вначале выстригался, а затем с помощью безопасной бритвы тщательно выбривался волосяной покров. На операционное поле, обработанное спиртом, прикладывался предварительно смоченный йодом трафарет квадратной формы со стороной, равной 1,5 см. По границе отпечатка ножницами вырезали лоскут кожи вместе с подкожной клетчаткой площадью 225 мм². Заживление ран происходило открытым способом. Все животные делились на 2 серии. 1-я серия (контрольная) – на рану ежедневно наносилось вазелиновое масло. 2-я серия – раневая поверхность смазывалась 1% суспензией хитозана на льняном масле. Для этого 1 г хитозана молекулярной массой 26 000 (производство ЗАО «Биопрогресс») добавляли к 100 мл льняного масла (производство фирмы «Эколен», разрешено для медицинского применения) при помешивании на водяной бане. Полученный масляный раствор хранился в герметичном светонепроницаемом сосуде в сухом закрытом помещении при комнатной температуре. Соблюдение данных условий хранения необходимо потому, что на свету наблюдается потемнение хитозана, снижение его растворимости, а вследствие его гигроскопичности при повышенной влажности он может уплотняться [3, 8, 15]. Приготовленное вещество, предварительно подогретое и тщательно размешанное, наносилось на открытые полнослойные кожные раны с помощью пипетки. Для сравнительного анализа микроскопических изменений при репаративной регенерации кожи у крыс двух серий брались биоптаты краев раны через 5, 10 и 15 дней после повреждения. Для гистологических исследований с краев раны иссекались кусочки с участками неповрежденной кожи. Материал фиксировался в 10% нейтральном растворе формалина, обезживался в спиртовых растворах возрастающей концентрации и ксилоле, заливался в парафиновые блоки. Срезы толщиной 6-7 микрон окрашивались гематоксилин-эозином по методике Ван-Гизона и Маллори. Гистологические препараты изучались под световым микроскопом «ЛОМО МИКМЕД-1». С помощью окуляр-микрометра определялась величина новообразованных структур заживающей раны: высота струпа, лейкоцитарного вала, грануляционной ткани, пограничной зоны эпителия и протяженность эпителиального регенерата. Все количественные результаты экспериментов подвергались статистической обработке с применением стандартного пакета программ на персональном компьютере IBM-Pentium III - 500 по методике Microsoft EXCEL XP (версия 7,0). Статистическую обработку полученных исследований проводили методами вариационной

статистики, достоверность результатов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Суммарная оценка скорости, характера и способа заживления основывалась на измерении площади открытой раневой поверхности и изучении гистологических изменений регенерирующих структур в условиях применения хитозана.

Результаты исследований и их обсуждение При визуальном наблюдении в процессе заживления ран были отмечены некоторые отличия общего состояния и поведения животных сравниваемых серий. Характерной особенностью поведенческих реакций крыс, получавших воздействие хитозана, является усиление двигательной активности, увеличение объема потребляемой пищи и улучшение шерстного покрова животных. Макроскопическое изучение области дефекта и измерение площади ран у животных, получавших хитозан, выявило существенные отличия от крыс контрольной серии (табл. 1). Уменьшение площади раневой поверхности в этих условиях происходит значительно быстрее, а окончательные сроки заживления сокращаются на 3–4 дня. Воспалительная реакция в области повреждения выражена слабо. Серозное отделяемое в небольшом количестве выделяется только в первые часы после повреждения. Через 2–3 дня у животных данной серии отмечается бурное развитие грануляций ярко-розового цвета, заполняющих весь дефект. Через 5 дней от начала заживления по краям раны отмечается полоса молодого эпителия. Через 10 дней у опытных животных эпителизация почти полностью завершается, а через 11–12 дней на месте раневого дефекта образуется нежный рубец, не выступающий над поверхностью раны.

Таблица 1

Площадь ран на последовательных этапах заживления, мм²

День заживления	Площадь ран, М ± m	
	Контроль	Хитозан
1	237,8 ± 20,8	241,2 ± 17,8
2	240,2 ± 27,8	217,1 ± 13,2
3	207,4 ± 25,1	182,9 ± 8,6
4	193,5 ± 23,2	170,1 ± 8,1
5	145,1 ± 20,1	132,3* ± 7,4
6	121,8 ± 16,6	93,3* ± 6,2
7	110,9 ± 16,8	65,5* ± 5,3
8	87,7 ± 10,8	54,6* ± 5,3
9	75,9 ± 5,4	38,6* ± 1,6
10	68,1 ± 3,3	27,2* ± 1,2
11	53,5 ± 6,3	У части животных рубец
12	36,8 ± 6,1	Рубец
13	26,6 ± 8,1	Рубец
14	15,15 ± 2,1 У части животных рубец	Рубец
15	Рубец	

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: * p < 0,05.

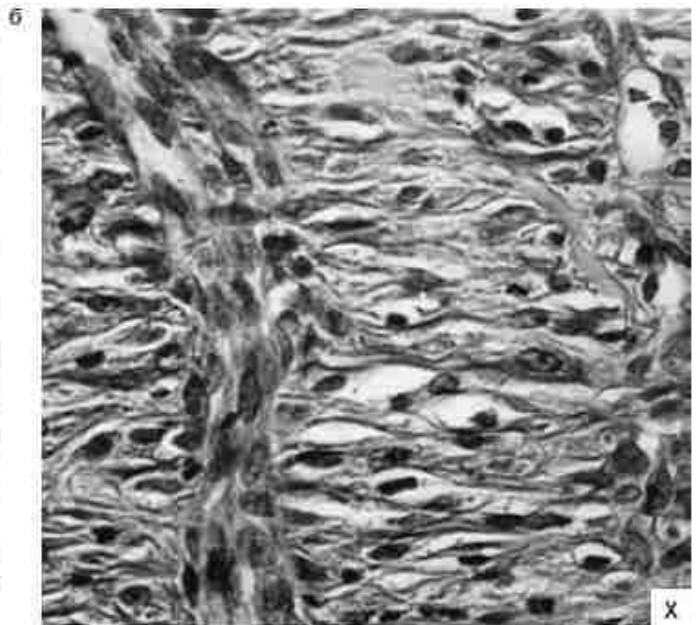
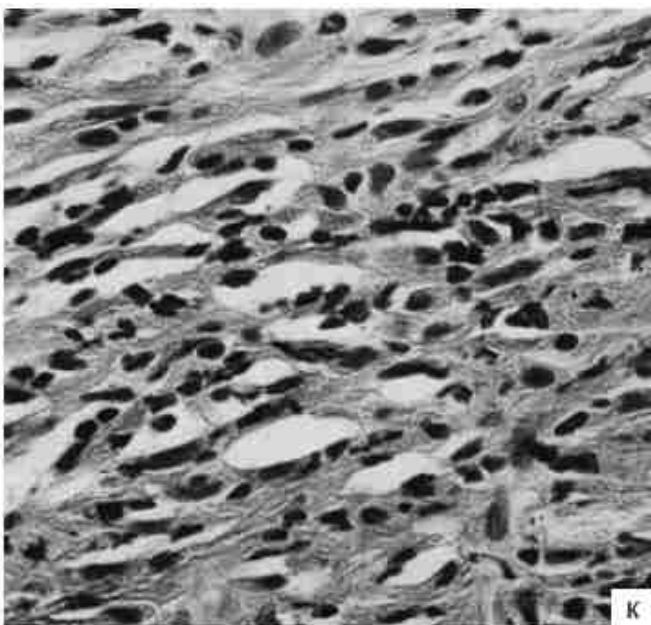
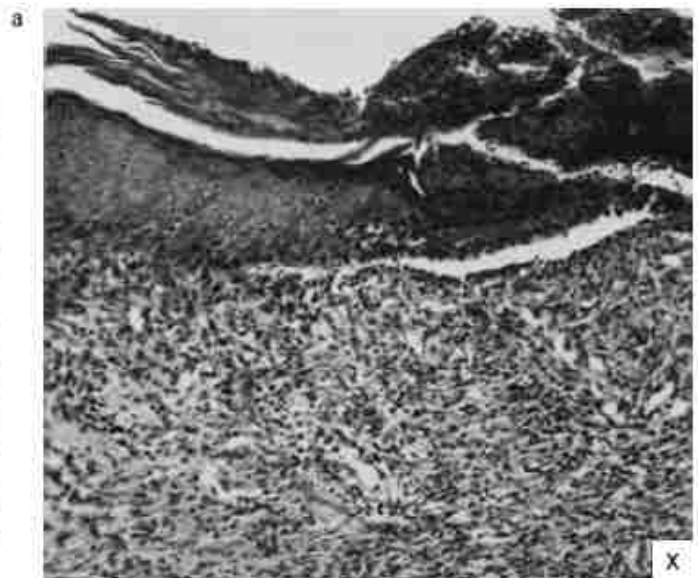
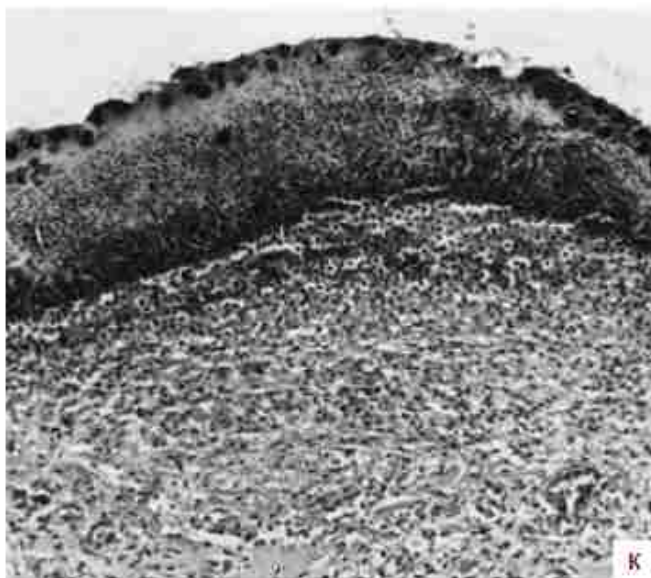
Данные визуальных и планиметрических наблюдений находятся в полном соответствии с микроскопическими изменениями, происходящими в области дефекта. Через 5 дней после нанесения повреждений у животных контрольной серии поверхность раны покрыта широким плотным струпом, в составе которого четко различимы два компонента: выпот плазмы и слой некротизированных клеток (табл. 2, рис. 1, а). Мощный лейкоцитарный вал располагается по всей поверхности раневого дефекта. В его составе выделяются две группы клеток, отличающиеся физиологическими особенностями. У поверхности лейкоцитарного вала клетки различны по форме, их ядра пикнотичны и гиперхромны. Клеточные элементы нижних слоев

имеют типичное нормальное строение без признаков дегенерации. Дефект в центре повреждения чаще всего выполняется жировой клетчаткой, которая поднимается почти к поверхности раны.

Таблица 2

Величина различных структур заживающих ран через 5 дней после операции, мкм

Серия	Струп	Лейкоцитарный вал	Грануляционная ткань	Эпителий на границе	Толщина регенерата	Протяженность регенерата
Контроль	322,3 ± 29,5	96,6 ± 5,5	711,8 ± 30,4	131,4 ± 12,7	71,5 ± 6,7	482,7 ± 29,9
Хитозан	228,9 ± 16,9	69,6 ± 5,1	955,7* ± 37,2	197,4* ± 14,3	103,8 ± 8,3	835,8* ± 55,3



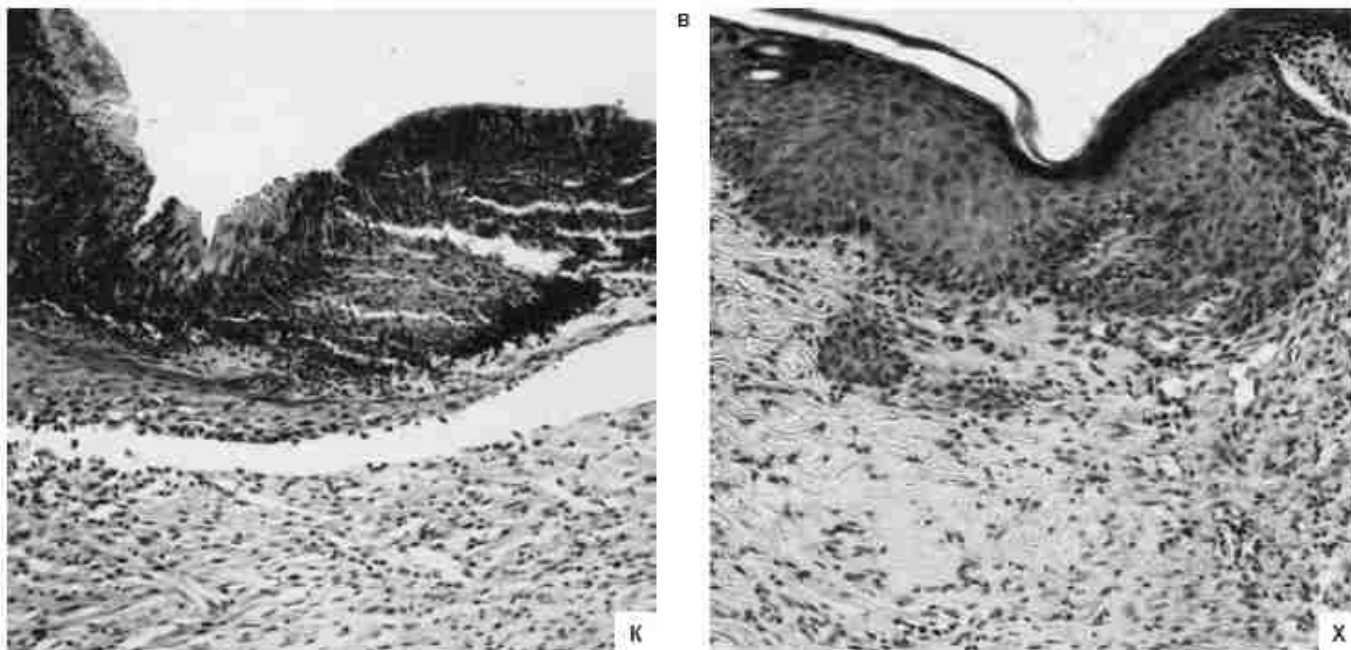


Рис. 1. Микроскопическая картина структур регенерата через 5 дней после операции: а – центральная область повреждения, $\times 120$; б – цитологический состав грануляционной ткани, $\times 450$; в – краевой участок раны с эпителиальным регенератом, $\times 120$. К – контроль; Х – хитозан. Гематоксилин-эозин.

Формирование грануляционной ткани происходит медленно, от краев дефекта к центру раны, поэтому она имеет очаговое расположение и отличается полиморфизмом клеточных элементов, среди которых встречаются нейтрофильные лейкоциты, макрофаги и гистиоциты (рис. 1, б). Основу грануляционной ткани составляют единичные вертикально расположенные капилляры, имеющие различный диаметр, стенка которых состоит из одного ряда эндотелиальных клеток. Встречаются единичные фибробласты, которые в глубоких слоях раны принимают перпендикулярное по отношению к сосудам положение. Малодифференцированные фибробласты имеют типичное строение: веретеновидную форму и крупное ядро с небольшим объемом цитоплазмы. Ориентированы в различных направлениях в грануляционной ткани и не образуют скоплений. Сама ткань выглядит отечной, отчетливо выражена лейкоцитарная инфильтрация не только в поверхностных слоях, но и в области дна. Одновременно с формированием новообразованной ткани начинается эпителизация раны, степень которой тесно связана с ее гранулированием. Регенерация эпителия характеризуется тремя процессами: миграцией клеток, их пролиферацией и последующей дифференцировкой. Растущий эпителий имеет вид клина, истонченного в сторону центра раны, со слабо выраженной гипертрофией на границе с неповрежденной кожей (рис. 1, в). Очаговый характер молодой ткани и ограниченная площадь определяют и незначительную протяженность регенерирующего эпителия. У животных, находившихся в условиях применения хитозана, течение посттравматической регенерации было более благоприятным, что находило отражение в морфологическом строении всех структур полнослойного дефекта. У животных данной серии через 5 дней после травмы рана покрыта струпом, толщина которого была меньше, чем в контроле ($228,9 \pm 16,9$ мкм). Струп был неоднороден, образован только клеточным детритом и не содержал участков, заполненных плазмой. Более узкий, чем у животных контрольной серии, лейкоцитарный вал содержал находящиеся на стадии физиологической дегенерации нейтрофилы (рис. 1, а). Толщина лейкоцитарного вала составила $69,5 \pm 5,1$ мкм (против $96,6 \pm 5,5$ мкм в контроле). Грануляционная ткань животных, которым на рану наносили хитозан, имела очаговый характер, но занимала значительно большую площадь, чем у крыс контрольной серии. Толщина ее составила $955,7 \pm 37,2$ мкм против $711,8 \pm 30,4$ мкм в контроле. Новообразованная ткань характеризовалась мощным развитием кровеносных сосудов и пролиферацией фибробластов. Клеточные элементы фибробластического ряда были представлены крупными вытянутыми многоотростчатými клетками, что свидетельствовало об их высокой функциональной активности. Они были ориентированы параллельно поверхности раны, что особенно было выражено в периферических участках и глубоких слоях раневого дефекта. В составе межклеточного вещества увеличивалось количество коллагеновых волокон, которые агрегировались в пучки. Обращает на себя внимание тот факт, что

в условиях применения хитозана ярко выражена была сосудистая реакция. Многочисленные кровеносные сосуды обнаруживались преимущественно в верхних слоях грануляционной ткани и располагались перпендикулярно поверхности раны (рис. 1, б). Диаметр их был увеличен, а протяженность значительно превышала таковую в контроле. Кровеносные сосуды были полнокровны, в них хорошо различались отдельные эритроциты. Общее состояние тканей характеризуется отсутствием отека и лейкоцитарной инфильтрации. Сформированная достаточно зрелая новообразованная ткань создавала благоприятные условия для развития эпителия, который на границе с неповрежденной кожей сильно гипертрофировался (рис. 1, в). Он покрывал рану на значительном протяжении ($835,8 \pm 55,3$ мкм), причем толщина эпителиального клина почти в 1,6 раза была больше, чем у животных контрольной серии. Различия, отмеченные у животных двух серий через 5 дней, более ярко проявлялись на последующих этапах заживления. Количественные показатели, характеризующие состояние структур регенерата через 10 дней от начала эксперимента, представлены в табл. 3.

Таблица 3

Величина различных структур (в мкм) заживающих ран через 10 дней после операции

Серия	Струп	Лейкоцитарный вал	Грануляционная ткань	Эпителий на границе	Толщина регенерата	Протяженность регенерата
Контроль	$207,6 \pm 18,6$	$59,9 \pm 2,5$	$819,9 \pm 24,3$	$150,8 \pm 19,8$	$78,2 \pm 3,6$	$569,3 \pm 43,2$
Хитозан	$120,3 \pm 13,4$	$24,7^* \pm 8,5$	$1229,9^* \pm 51,4$	$246,2^* \pm 23,4$	$120,2^* \pm 9,9$	$946,5^* \pm 53,4$



а



х

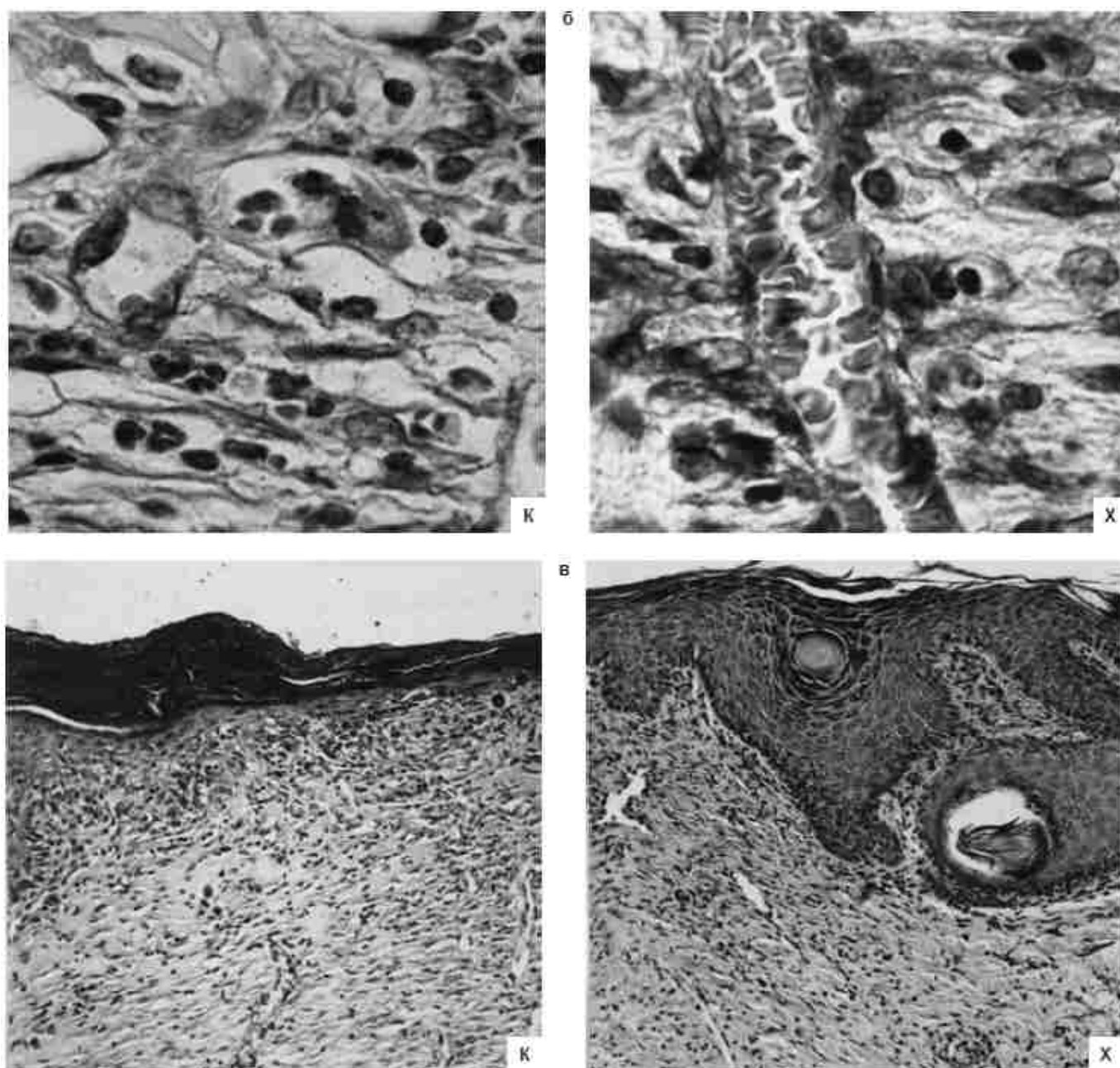


Рис. 2. Микроскопическое строение тканей регенерата через 10 дней после нанесения повреждения: а – эпителиальный регенерат в центре раневого дефекта, $\times 120$; б – слой горизонтально ориентированных фибробластов грануляционной ткани, $\times 1200$; в – гипертрофия эпителия и выросты базальной мембраны в подлежащую ткань на границе с повреждением, $\times 120$. К – контроль; X – хитозан. Гематоксилин-эозин.

В этот период исследования у животных контрольной серии раневая поверхность покрыта струпом в виде тонкого пласта, часто фрагментированным, плотно или рыхло спаянным с подлежащими тканями (рис. 2, а). Под ним еще сохраняется небольшой лейкоцитарный вал ($59,9 \pm 2,5$ мкм). В его составе в нижних слоях встречаются нейтрофильные лейкоциты нормальной структуры с четко различимым сегментированным ядром и небольшим объемом цитоплазмы. Через 10 дней после операции у животных данной серии происходит развитие грануляционной ткани. Она заполняет всю область повреждения, имеет типичную структуру. Среди клеточных элементов развивающейся ткани встречаются клетки гемато-генного и тканевого происхождения, в том числе фибробласты с различной ориентацией вокруг сосудов (рис. 2, б). Зрелая грануляционная ткань служит матрицей, по которой осуществляется рост молодого эпителия. Эпителиальный регенерат нарастает с краев раны двумя пластами навстречу друг другу и покрывает рану на значительном протяжении ($569,3 \pm 43,2$ мкм), а ровная базальная мембрана лишь в краевых участках образует незначительные выросты в подлежащую ткань. На границе с неповрежденной кожей наблюдается гипертрофия молодого эпителия, его толщина составляет $150,8 \pm 19,8$ мкм (рис. 2, в). Выраженное стимулирующее влияние хитозана на заживление ран кожи проявилось и через 10 дней после

нанесения травмы. У животных данной серии рана была покрыта фрагментированными участками струпа только по краям раны, толщина которого значительно меньше, чем в контроле (рис. 2, а). У подавляющего большинства животных в этих участках сохраняется узкий лейкоцитарный вал ($24,7 \pm 8,5$ мкм против $59,9 \pm 2,5$ мкм в контроле). Формирующаяся молодая соединительная ткань имеет значительную толщину ($1229,9 \pm 51,4$ мкм против $819,9 \pm 24,3$ мкм в контроле). В ней наблюдается редукция большей части кровеносных сосудов и развитие слоя горизонтально ориентированных фибробластов (рис. 2, б). Эпителий на границе с неповрежденной кожей сильно гипертрофирован, а базальная мембрана его образует выросты в подлежащую ткань (рис. 2, в). У животных, получивших воздействие хитозана, через 10 дней происходила полная или почти полная эпителизация области раневого дефекта. Изучение регенерирующих тканей в последующий срок, через 15 дней от начала наблюдения, показало, что у контрольных животных на месте бывшей раны происходит полное заживление (рис. 3, а). В отдельных случаях сохраняются фрагменты струпа в центре травмы. Раневой дефект заполнен зрелой соединительной тканью с характерной горизонтальной ориентацией фибробластов, в узких просветах между которыми располагаются многочисленные тонкие коллагеновые волокна. Новообразованный эпителий имеет вид широкого пласта, а в центральной области повреждения на большом протяжении сохраняется ровная базальная мембрана. На границе с неповрежденной кожей эпителий образует небольшие единичные выросты в подлежащую ткань. Через 15 дней после операции у животных, находившихся под влиянием хитозана, область раны была представлена рубцом типичной структуры. Область дефекта замещена зрелой соединительной тканью, которая приобретала вид дермы (рис. 3, а). Эпителиальный регенерат дифференцирован на слои. Базальная мембрана молодого эпителия образовывала многочисленные различной формы и длины выросты в подлежащую соединительную ткань на всем протяжении дефекта. В соединительной ткани формируются волосяные фолликулы и сальные железы. У подавляющего большинства животных данной серии через 15 дней в области бывшего повреждения формировался органоспецифический регенерат, имеющий строение нормальной кожи (рис. 3, б). Таким образом, применение хитозана создает в организме животных благоприятные условия, которые стимулируют все этапы заживления ран кожи. В этих условиях ускоряется течение воспалительной реакции, в результате чего сокращается продолжительность и изменяется ее характер, резко усиливаются лейкоцитарная и макрофагическая фазы воспаления [4, 9–11, 13]. Проведенные гистологические и морфометрические исследования показали, что формирующаяся под влиянием хитозана грануляционная ткань характеризуется особыми изменениями со стороны микро-циркуляторного русла, что выражается усилением процессов ангиогенеза и согласуется с данными других авторов [7, 12]. Показано, что слой вертикально ориентированных капилляров формируется уже на начальных этапах образования грануляций, которые мощным пластом заполняют всю область дефекта. Известно, что процессы ангиогенеза и миграции клеток гематогенного происхождения при использовании хитозана происходят благодаря повышенному выделению интерлейкина-8 из фибробластов [16]. Новообразованная грануляционная ткань является выражением единства воспаления и пролиферации – неразрывных компонентов единой тканевой реакции на повреждение. Установлено, что активное очищение раны от некротизированных масс способствует раннему созреванию фибробластов и повышению их функциональной активности. Молодая ткань в условиях применения хитозана характеризуется полиморфизмом клеточных элементов различного генеза, среди которых преобладающими являются молодые и высокодифференцированные фибробласты [14]. Роль фибробластов в процессе репаративной регенерации реализуется через продукты их специфической секреции: коллаген, эластин, протеогликаны и гликопротеины [2]. Коллагеновые волокна являются опорным каркасом для регенерирующего эпителия. Гликозаминогликоны и гликопротеины играют роль в осуществлении трофической функции формирующейся соединительной ткани, заключающейся в регуляции водно-солевого равновесия, транспорта ими веществ, обмена гормонов, витаминов и других биологически активных веществ. Протеогликаны оказывают существенное влияние на размножение клеток, в том числе и эпителиальных [6]. В результате ускоряется созревание грануляционной ткани, происходит редукция капилляров и формируется слой горизонтально ориентированных фибробластов. Изучение их микроструктуры свидетельствует о высокой функциональной активности клеток. Усиленная по сравнению с контролем продукция и экскреция фибробластами под влиянием хитозана коллагенового белка сопровождается его ускоренной трансформацией в волокна

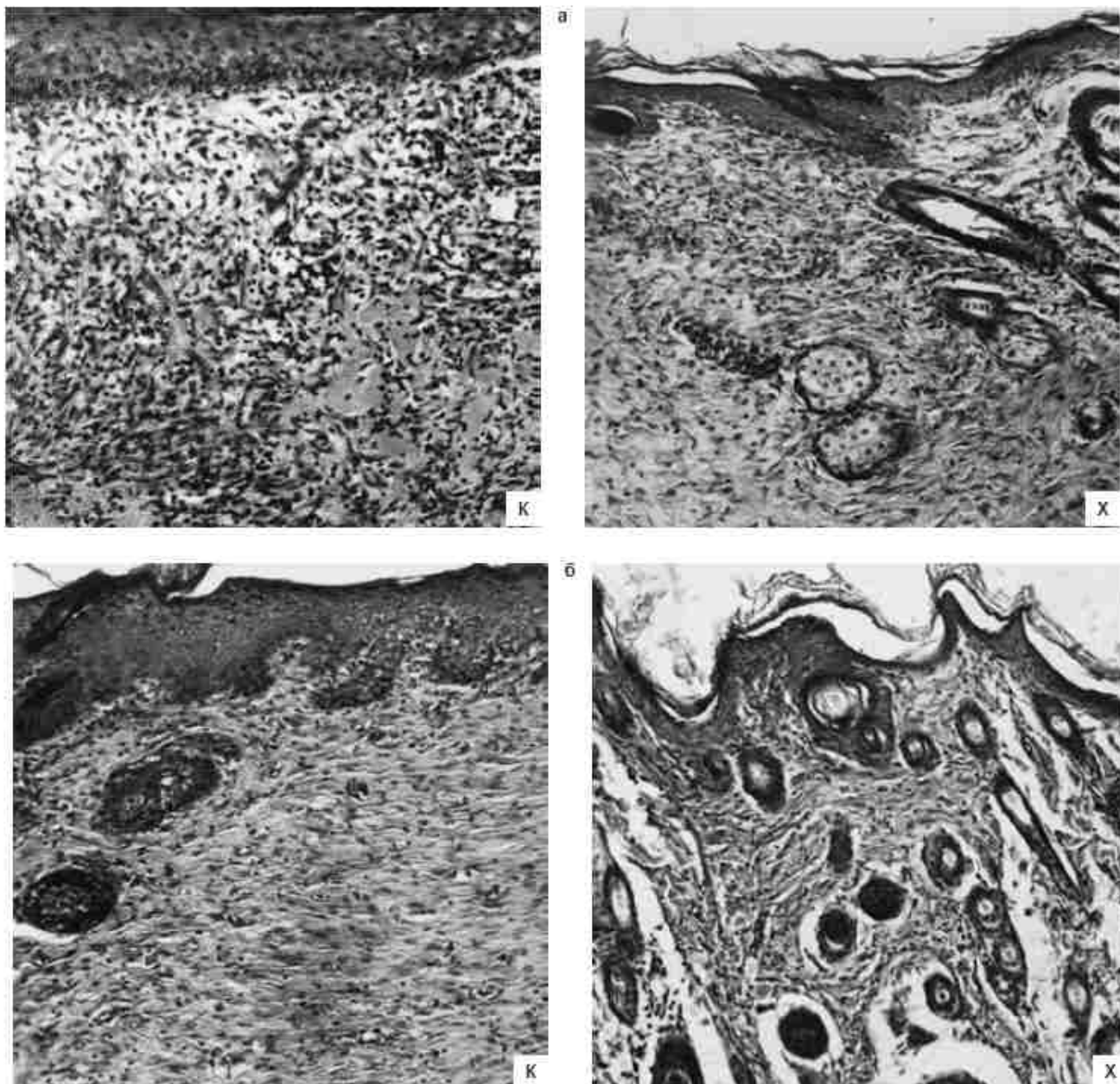


Рис. 3. Центральная область бывшего раневого дефекта через 15 дней после нанесения ран: а – эпителиальный регенерат в центральной области повреждения, $\times 120$; б – формообразовательные процессы в регенерирующем эпителии, $\times 120$. К – контроль; X – хитозан. Гематоксилин-эозин.

Быстрообразование грануляционной ткани и трансформация ее в соединительную под влиянием хито-зана стимулируют в дальнейшем эпителизацию раневого дефекта. На границе с повреждением эпителии сильно гипертрофируется ($197,4 \pm 14,3$ мкм против $131,4 \pm 12,7$ мкм в контроле через 5 дней после операции), а протяженность эпителиального регенерата в этот срок в 1,7 раза превышает соответствующий показатель в контроле. Впервые показано, что при использовании хитозана формируется дифференцированный на слои эпителиальный пласт. Базальная мембрана его неровная, образует различной длины и толщины выросты в подлежащую ткань, в которой формируются волосяные фолликулы и сальные железы, что приводит к развитию органоспецифического регенерата. В условиях применения хитозана изменяются не только скорость и характер осуществления всех этапов заживления, но и способы регенерации. Одновременно с другими способами (вставочный рост, регенерационная гипертрофия, пролиферация и быстрое развитие соединительных компонентов регенерата)

значительно усиливается контракция раны. Она обеспечивается группой фибробластов (миофибробласты), напоминающих по строению и свойствам гладкомышечные клетки. Контракция связана с формированием струпа, синтезом белков и коллагеновых волокон, изменениями краевой зоны эпителия и реорганизацией рубцовой ткани [1, 6].

Литература

1. Букина Т.В. Перестройка кожных рубцов на спине крыс // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1991. – Т. 112. – № 8. – С. 217–219.
2. Бабак В.Г. Коллоидные свойства производных хитина и хитозана / Под ред. Скрябина Г.А. – М.: Наука, 2002. – Гл. 4. – С. 201–204.
3. Варпаховская И.И. Хитин и хитозан // Рос. аптеки. – 2000. – № 8. – С. 26–28.
4. Довгилева О.М. Морфофункциональные аспекты посттравматической регенерации кожи в условиях воздействия хитозаном: Канд. дисс. – Тверь, 2007. – 158 с.
5. Красникова Н.А. Вставочный рост при заживлении кожных ран и его стимуляция хлорофиллином натрия. – М., 1974. – С. 1–27.
6. Ляшенко В.А., Дороженников В.А., Молотковская И.М. Механизмы активации иммунокомпетентных клеток. – М.: Медицина, 1998. – 240 с.
7. Музыкант Л.И. Морфология заживления ожоговых ран при различных методах лечения // Архив патологии. – 1984. – № 3. – С. 52–59.
8. Сернов Л.Н., Гацура В.В. Элементы экспериментальной фармакологии. – М., 2000. – 352 с.
9. Хомулло Г.В. Морфофункциональные аспекты заживления ран кожи в условиях стимуляции // Морфология. – 1996. – Т. 109. – № 2. – С. 101.
10. Хомулло Г.В. Микроскопические и гистохимические изменения в тканях раны у животных при нарушении высшей нервной деятельности // Гистогенез и регенерация тканей. – Калинин, 1970. – 211 с.
11. Хомулло Г.В., Петрова М.Б., Павлова Н.В., Харитонов Е.А. Особенности течения фазы воспаления репаративного процесса в коже на фоне периостита в условиях лазеротерапии // Верхневолжский медицинский журнал. – 2006. – Спец-выпуск. – С. 71-72.
12. Хомулло Г.В. Репаративные процессы у животных при различных изменениях нейроэндокринной регуляции // Современные способы стимуляции репаративных процессов. – Тверь, 2004. – С. 10-26.
13. Чернух А.М., Фролов Е.П. Кожа: строение, функции, общая патология и терапия. – М.: Медицина, 1982. – 336 с.
14. Шехтер А.Б. Некоторые вопросы фибрилогенеза при репаративном росте соединительной ткани у человека // Актуальные проблемы клинической морфологии. – М., 1982. – Гл. 3. – С. 58-61.
15. Bashong W. et al. Activity naturals polymers and bio-organic preparation // SOFW - journal. – 1999. – Vol. 125. – P. 87-96.
16. Nishimura K. et al. Chitin in nature and technology // Plenum press. – Pondon, 1986. – Vol. 34. – № V – P. 477-483.