

## ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ РАН

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

ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко»  
Минздрава России, г. Воронеж, Россия

В статье приводится комплексное морфогистохимическое обоснование возможности использования коллагена и способов его применения при лечении кожных ран. Установлено, что аппликационно-инъекционный способ введения гидролизата коллагена стимулирует репаративные процессы, сокращает сроки лечения и улучшает косметический эффект.

*Ключевые слова:* гистохимия раневого процесса, гидролизат коллагена, кожные раны.

© A. A. Glukhov, R. N. Frolov, N. T. Alekseeva, A. A. Andreyev, 2013

Histochemical Changes in Wound Healing

The article presents complex morphological and histochemical substantiation of collagen usage possibility and ways of its application in skin wounds healing. It's proved that applicative-injectable way of administration of collagen hydrolyzate stimulates reparative processes, reduces the treatment time and improves the cosmetic effect.

*Keywords:* histochemistry of wound healing, collagen hydrolyzate, skin wounds.

### Введение

Репаративные процессы в лечении ран являются важной проблемой хирургии, значение которой возрастает с увеличением травматизма в современном мире [10, 5, 4, 8]. В настоящее время проводится множество исследований, направленных на изучение гистологических и гистохимических аспектов заживления ран [1, 3, 6, 4, 14]. На фоне многочисленности известных способов лечения, морфологические аспекты заживления ран полностью не выяснены [2, 4, 5, 7, 13, 15].

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

### Материал и методы исследования

Исследования проводились на 96 половозрелых белых крысах-самцах массой  $250 \pm 25$  г. Работа включала 4 группы животных – 1 контрольную и 3 опытные. Всем животным под эфирным наркозом на выбритом от шерсти участке в области передней поверхности средней трети бедра наносили стандартную линейную рану  $1.0 \times 0.5$  см. Лечение проводили сразу после моделирования. Для лечения применялся гидролизат коллагена с содержанием сухого вещества 16%. В первой опытной группе лечение

заключалось в аппликационном нанесении 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  $1 \text{ см}^3$ , что позволило выполнить оптимальное введение вещества по всему объему тканей околораневой зоны без лишней травматизации. 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 сутки от начала лечения. Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, 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 Шевремону и

Фредерику [9, 11]. Визуально оценивалась интенсивность цветной гистохимической реакции и топохимия продукта реакции. 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 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 глубжележащих 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 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 топохимии осадка. Количественная оценка средней оптической плотности SH-групп в клетках базального и шиповатого слоев ( $0.26 \pm 0.01$  усл. ед.) показывает сохранение уровня предыдущего экспериментального срока. На 7 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 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 (рис. 1, 2).

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

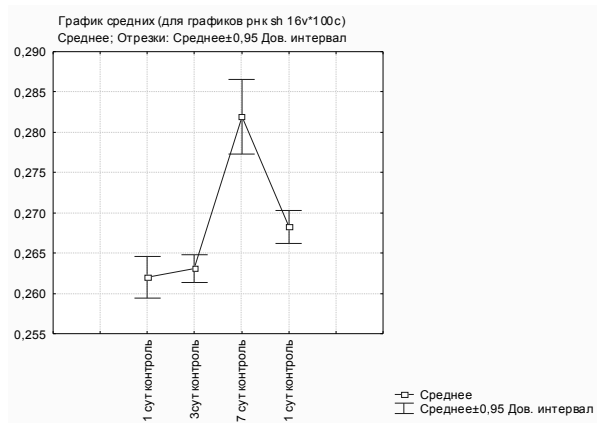


Рис. 1. Значения средней оптической плотности SH-групп в клетках базального и шиповатого слоев контрольной группы.

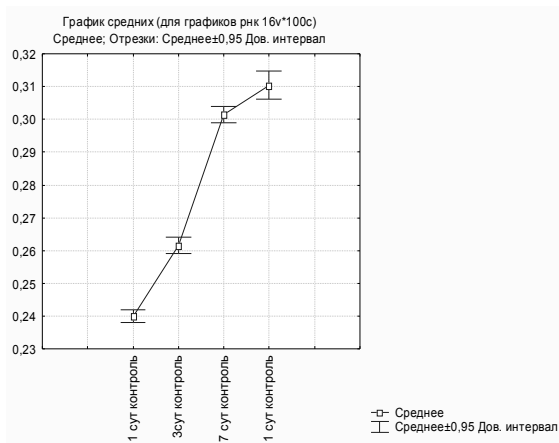


Рис. 2. Значения средней оптической плотности РНК в клетках базального и шиповатого слоев контрольной группы.

условия для пролиферативных превращений, обеспечивающих качественное восстановление кожи.

На 1 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 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.). На 7 суток процесс регенерации усиливаются, 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 сутки в первой опытной группе толщина слоев увеличена по сравнению с эпидермисом интактной кожи в основном за счет глубже лежащих слоев. Среднее значение оптической плотности РНК в клетках базального и шиповатого 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 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 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 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 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 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 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 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 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 сравнению с предыдущим сроком наметилась тенденция к снижению, что указывает на стабилизацию процессов стратификации эпидермиса (рис. 3, 4).

Анализ результатов гистохимических реакций показал, что в опытных группах после аппликационного и

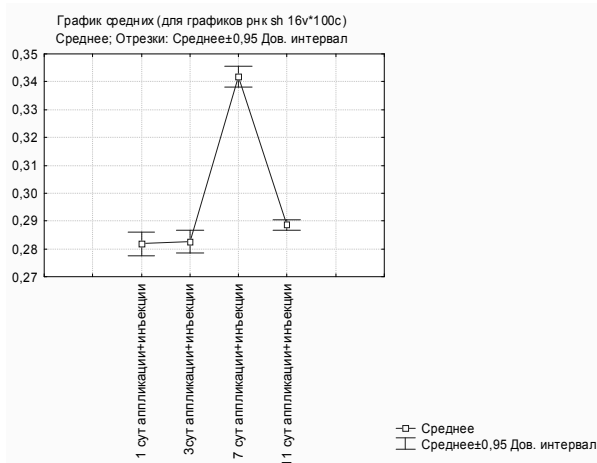


Рис. 3. Значения средней оптической плотности SH-групп в клетках базального и шиповатого слоев в опытной группе после аппликационно-инъекционного введения коллагена.

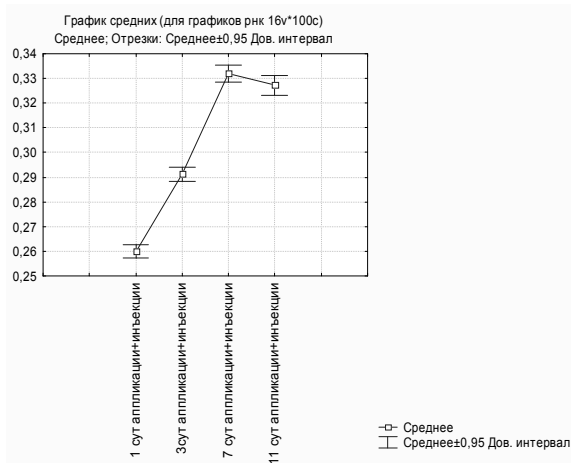


Рис. 4. Значения средней оптической плотности РНК в клетках базального и шиповатого слоев в опытной группе после аппликационно-инъекционного введения коллагена.

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 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., Казимагомедов А. С., Искандеров З. М. Стимуляция репаративных процессов при лечении гнорийных ран с применением нанооксигенизированных антибактериальных микст-препаратов // 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 // Вестник новых медицинских технологий. 2012. Т. 19, № 2. С. 82–85.
3. Глухов А. А., Алексеева Н. Т., Остроушко А. П. Морфологическая оценка эффективности применения светотерапии в лечении ран мягких тканей // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2012. № 2. С. 72–73.
4. Еремин Н. В., Мнихович М. В. Ультроструктурная оценка ангиогенеза и клеточного микроокружения в кожной ране под влиянием низкоинтенсивного лазерного излучения // Вестник новых медицинских технологий. 2012. Т. 14, № 2. С. 316–319.
5. Изатулин В. Г., Лебединский В. Ю., Кенсовская И. М. Использование пролактинина для заживления кожных ран в

- эксперименте // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. 2008. № 6. С. 35–36.
6. *Намоконов Е. В., Лазуткин М. Н., Мирманов А. М.* Антиоксидантная стимуляция репаративных процессов ране в эксперименте. // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. 2012. № 4–1. С. 215–217.
  7. *Паршикова С. А., Паршиков В. В., Потехина Ю. П.* Прогнозирование послеоперационных осложнений при лечении обширных укушенных ран лица у детей с помощью инфракрасной термографии // 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.
  12. *Галимзянов Ф. В., Прудков М. И.* Местное лечение инфицированных ран, гнойно-некротических процессов в брюшной полости и забрюшинном пространстве антимикробным препаратом – диоксидин // Международный журнал экспериментального образования. 2013. № 5. С. 27–28.
  13. *Засорин А. А.* Применение озонотерапии и повязок URGO в лечении вялотекущих ран // Медицинский вестник Башкортостана. 2012. Т 7, № 4. С. 59–62.
  14. *Мохов Е. М., Воробьев С. И., Армасов А. Р.* Применение озонированного перфторана при лечении гнойных ран // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2012. Т 5, № 2. С. 324–329.
  15. *Беляев П. А., Добрейкин Е. А., Урсова А. И.* Оценка сочетанного применения наночастиц меди и низкоинтенсивного лазерного излучения на инфицированную ожоговую рану в эксперименте // Бюллетень медицинских интернет конференций. 2013. Т 3, № 2. С. 285.

### Информация об авторах

**Глухов Александр Анатольевич** – д.м.н., профессор, чл.-корр. РАЕ, зав. кафедрой общей хирургии, директор НИИ хирургической инфекции ГБОУ ВПО “Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко” Минздрава России. 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, д. 10.

**Фролов Роман Николаевич** – ассистент кафедры госпитальной хирургии ГБОУ ВПО “Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко” Минздрава России. 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, д. 10.

**Алексеева Наталия Тимофеевна** – к.м.н., доцент, зав. кафедрой нормальной анатомии человека ГБОУ ВПО “Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко” Минздрава России, 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, д. 10. E-mail: alexeevant@list.ru

**Андреев Александр Алексеевич** – д.м.н., доцент, доцент кафедры общей хирургии, директор НИИ хирургической инфекции ГБОУ ВПО “Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко” Минздрава России. 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, д. 10.

Поступила в редакцию 18.04.2013 г.