

На правах рукописи

КУРАМАЕВА УЛЬЯНА КУДАЙКУЛОВНА

**ЭТИОПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ
ПРИМЕНЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
ПРИ ТЕРМИЧЕСКИХ ОЖОГАХ КОЖИ**

(экспериментальное исследование)

14.00.16 – Патологическая физиология

14.00.02 – Анатомия человека

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

БИШКЕК – 2009

Работа выполнена на кафедре Нормальной морфологии
медицинского факультета Кыргызско-Российского Славянского
университета

Научные руководители: доктор медицинских наук, профессор
Захаров Геннадий Алексеевич

доктор медицинских наук, профессор
Габитов Валерий Хасанович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Алымкулов Добулбек Алымкулович

кандидат медицинских наук, доцент
Омурбаев Алмаз Сагындыкович

Ведущая организация: Новосибирский Государственный
Медицинский университет

Защита состоится « ___ » _____ 2009 г. в ___ часов
на заседании Диссертационного совета К. 730.001.04 при
Кыргызско-Российском Славянском университете по адресу:
720000, г. Бишкек, ул. Киевская, 44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Кыргызско-Российского Славянского университета

Автореферат разослан « ___ » _____ 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент

Т.Ц. Гурович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Термические поражения представляют серьезную медицинскую, социальную и экономическую проблему, занимая третье место в структуре травматизма мирного времени (Полянина Д.А., Енифанова Н.М., 2005; Фисталь Э.Я., Козинец Г.П., 2006). Увеличивается частота массовых ожоговых поражений, связанных с авариями и стихийными бедствиями (Сидельников В.О., Парамонов Б.Н., 2002; Герасимова Л.И., Назаренко Г.И., 2005).

Ежегодно в России регистрируется более 600 тыс. случаев ожоговой травмы. При этом около 70% больных получают ограниченные по площади и не глубокие ожоги. Помощь им оказывается в основном в амбулаторных условиях (Алексеев А.А., 1998; Логинов Л.П., 2001). Из числа обожженных, госпитализируемых в стационары, в 60-80% имеются поверхностные и пограничные ожоги II-IIIА степени, не требующие оперативного лечения (Спиридонова Т.Г., 2002, 2003; Герасимова Л.И., Назаренко Г.И., 2005). Однако эти ожоги во многом определяют тяжесть травмы и ее прогноз (Фисталь Э.Я., Козинец Г.П., 2006). По данным российских авторов (Азолов В.В. с соавт., 1999), летальность от ожогов в целом по России колеблется от 2,3% до 3,6%.

Анализ результатов местного лечения термических ожоговых ран показывает, что ни одно из применяемых лекарственных средств не является универсальным. Это предрасполагает к поиску новых препаратов, улучшающих регенераторные и обменные процессы. Одним из направлений в этом поиске является изучение биологически активных веществ. К таким средствам относится препарат «Васна», разработанный в Государственном научном центре вирусологии и биохимии «Вектор» (г. Новосибирск) на основе одного из природных биостимуляторов – хитозана. Широкий спектр действия, отсутствие побочных эффектов и токсичности, биологическая совместимость, иммуностимулирующий эффект хитозана позволяют его использовать во многих областях медицины (Жоголев К.Д. с соавт., 1996; Толстикова Т.Г. с соавт., 1996; Корягин А.С. с соавт., 2006 и др.).

В последнее время в медицине все большее применение находит и гиалуроновая кислота (ГК). Она является составной частью препаратов с дезинфицирующим, противовоспалительным и ранозаживляющим действием (Волков В.Г. с соавт., 2000; Матчин Е.Н. с соавт., 2002; Азнабаев М.Т., Имаева А.Р., 2003; Marcacci M. et al., 2005; Sato K. et al., 2006).

Вместе с тем, сведения о механизмах влияния хитозанового биогеля и геля гиалуроновой кислоты на течение регенераторных процессов соединительной и эпителиальной тканей, их противовоспалительный эффект при термических ожогах недостаточны и требуют дальнейшего изучения.

Вышеизложенное предопределило цели и задачи исследования.

Цель и задачи исследования

Целью работы явилось дать патогенетическое обоснование применения хитозанового биогеля и геля гиалуроновой кислоты при термических ожогах кожи и изучить их влияние на регенерацию дермы в эксперименте.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Создать адекватную клинике экспериментальную модель термического ожога кожи и дать морфологический анализ ее спонтанного заживления в динамике.
2. Изучить течение регенераторных процессов при традиционном методе лечения термического ожога кожи.
3. Выявить морфофункциональные особенности регенерации кожи при лечении термических ожоговых ран с использованием хитозанового биогеля.
4. Выявить морфофункциональные особенности регенерации кожи при лечении термических ожоговых ран с использованием геля гиалуроновой кислоты.
5. Определить особенности регенераторных процессов кожи при комплексном лечении термических ожоговых ран с применением хитозанового биогеля и геля гиалуроновой кислоты.

Научная новизна

Принципиальной новизной диссертационной работы является исследование динамики течения термического ожога кожи при использовании природных биостимуляторов и определение морфологических критериев для оценки течения ожогового процесса.

Получены новые данные о механизмах благоприятного характера морфофункциональных изменений тканевых и клеточных структур при лечении термических ожогов кожи хитозановым биогелем и гелем гиалуроновой кислоты.

Впервые проведен сравнительный анализ влияния хитозанового биогеля и геля гиалуроновой кислоты на разные фазы течения термического ожога кожи по сравнению с традиционным методом

лечения. Выявлена различная направленность эффективного действия этих препаратов на фазы патогенеза термического ожога кожи

Впервые дано патогенетическое обоснование положительного эффекта при сочетанном действии хитозанового биогеля с гиалуроновой кислотой на ускорение процессов восстановления эпидермиса и дермы при термических ожогах кожи.

Практическая значимость

Экспериментальное изучение влияния хитозанового биогеля и геля гиалуроновой кислоты на регенераторные процессы позволяет рекомендовать включить эти препараты и их комплекс в схему патогенетического лечения термических ожогов кожи. Доказана возможность коррекции регенераторных процессов кожи при их использовании, наряду с традиционными методами лечения.

Применение аппликационного метода при лечении термических послеожоговых ран хитозановым биогелем и гелем гиалуроновой кислоты позволит снизить или предотвратить явление общей и местной интоксикации, генерализацию инфекции, ускорить репаративные процессы в мягких тканях, сократить сроки лечения.

Результаты исследований внедрены в клиническую практику Медицинского центра «Имаго», в клинику и учебный процесс кафедры Челюстно-лицевой, пластической и стоматологии с имплантологией КГМА. На кафедрах Патологической физиологии КГМА и Нормальной морфологии КРСУ при чтении лекций и при проведении практических занятий.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Использование хитозанового геля в комплексе традиционных средств лечения термических ожогов кожи позволяет быстрее купировать явления воспаления, стимулирует и ускоряет репаративные процессы и ангиогенез, снижает гипоксическую нагрузку на ткани, дает быстрое и нежное рубцевание травмированных тканей, улучшая результаты лечения.
2. Использование геля гиалуроновой кислоты в комплексе традиционных средств лечения термических ожогов кожи в альтернативную фазу воспаления стимулирует фибриогенез, который в дальнейшем проявляется усилением пролиферативной активности клеточных элементов, ускоренным развитием грануляционной ткани.

3. Комплексное применение хитозанового биогеля и геля гиалуроновой кислоты, воздействуя на местные защитные клеточные механизмы и процессы регенерации эпидермиса и дермы, значительно ускоряет процессы заживления термических ожоговых ран.

Апробация диссертации

Основные положения работы доложены и обсуждены на: II съезде оториноларингологов Кыргызской Республики (Бишкек, 2004); ежегодных научных конференциях медицинского факультета КРСУ (Бишкек, 2004, 2007 и 2008 гг.); II Конгрессе Стоматологической ассоциации Кыргызской Республики (г. Чолпон-Ата, 2005), межфакультетном заседании мед. факультета КРСУ (Бишкек, 2008).

Публикации

По материалам диссертационного исследования опубликовано 11 статей, получено удостоверение на рационализаторское предложение (№36/07 от 13.09.07 КГМА).

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 170 страницах и состоит из введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результатов собственных исследований», «Обсуждение полученных результатов», выводов, практических рекомендаций. Список литературы включает 256 источника, в том числе 128 стран СНГ и 129 иностранных авторов. Работа иллюстрирована 27 таблицами и 26 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

1. Характеристика групп животных

Эксперименты были проведены на 115 лабораторных беспородных крысах обоего пола, массой 150-200 гр. Животные содержались в стандартных условиях при температуре 20-22°C и обычном световом режиме. Крысы получали сбалансированный по белкам и углеводам витаминизированный рацион. Доступ к воде и пище был свободным.

В качестве модели термического поражения IIIA степени был использован контактный способ нанесения ожога металлической насадкой к электропаяльнику размером 2x2 см, разогретой до 232⁰C

(Заозерский И.Н., 1963). Контроль температуры нагревания паяльника устанавливали по плавлению олова помещенного на насадку (232°C). После 4 секундной экспозиции паяльника на коже возникал термический ожог (рац. предложение №36/07 от 13.09.07 КГМА). Предварительно под эфирным наркозом удаляли шерсть с правого бедра крысы путем выбривания безопасной бритвой.

Опыты поставлены на следующих группах животных:

1-я группа – интактные животные; 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, где использовалось сочетание мази «Левомеколь» с хитозановым биогелем; 5-я группа - с ожогом IIIА степени, где использовалось сочетание мази «Левомеколь» с гелем гиалуроновой кислоты; 6-я группа - с ожогом IIIА степени, где использовалось комбинированное применение мази «Левомеколь», хитозанового биогеля и геля гиалуроновой кислоты.

Оценка состояния ожоговой раны проводилась на 1, 3, 7, 15 и 25 сутки после нанесения травмы и проведения курса лечения с помощью морфологических и морфометрических методов.

2. Морфологические и морфометрические методы исследования

Для забора кожи для морфологического исследования животных выводили из эксперимента декапитацией под эфирным ингаляционным наркозом по 4 крысы в каждой группе на каждый срок исследования.

Для светооптического исследования образцы кожи, взятые в эпицентре ожога и краевой зоне, помещали в 10% раствор нейтрального формалина и фиксировали не менее 48 часов. После промывания проточной водой материал подвергался обычной обработке (обезжизнялся в спиртах возрастающей концентрации и заливался в парафин). Затем готовили срезы (5–7 мкм), которые окрашивали гематоксилином и эозином – для обзорных целей и пикрофуксином (по методу Ван-Гизон) для оценки состояния соединительной ткани.

Характеристика морфофункционального состояния кожи при ожоге складывалась из суммарной оценки признаков, наблюдаемых при визуальном изучении гистологических препаратов.

При морфометрическом исследовании в каждой группе животных определяли следующие показатели:

- толщину эпидермиса, сосочкового и сетчатого слоев дермы (в мкм);
- количество (на 1 мм^2) и диаметр (в мкм) сосудов микроциркуляторного русла.

Оценку клеточного состава проводили путем подсчета общего количества клеток и популяции тучных клеток (гранулированных и дегранулированных), нейтрофилов, лимфоцитов, макрофагов, плазмоцитов, фибробластов, фиброцитов и их процентное содержание в пересчете на 1 мм² площади препарата.

Морфометрию исследовали на световом микроскопе Ломо АУ–12 при увеличении х8, х20, х40 с помощью стандартной линейки в соответствии с общепринятыми требованиями (Автандилов Г. Г., 1990).

3. Характеристика хитозанового биогеля

В Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Россия) разработана технология получения модифицированного хитозанового биогеля из натурального полисахарида хитина, вырабатываемого из панцирей камчатских крабов, который мы и использовали в опытах.

Благодаря структурным особенностям (поликатион с высокой плотностью заряда) хитозан обладает сродством ко многим веществам белкового происхождения, полисахаридам и микроорганизмам и является эффективным агглютинирующим агентом (Симонова Л.В., Пашук Л.К., 1998; Boucard N. et al., 2005; Dallan P.R. et al., 2007).

Показано, что выраженный общеклинический эффект хитозана обусловлен активизацией фагоцитарной активности макрофагов. (Жоголев К.Д. с соавт., 1992; Nishimura K. et al., 1984). В связи с этим, хитозан используют в качестве адьюванта для иммуностимулирующих веществ с целью активации выработки антител организмом (Жоголев К.Д., Никитин В.Ю., 1998; Габитов В.Х. с соавт., 2003; Szymonowicz M. et al., 1997).

Под воздействием ферментов часть хитозана расщепляется, всасывается в кровь и усваивается организмом в виде низкомолекулярных соединений. Главным из них является гиалуриновая кислота, входящая в состав межклеточного вещества, мембран клеток. Другая часть, не расщепленная ферментами, не всосавшаяся в кровь, соединяясь с влагой, превращается в гелеобразную массу и действует как мощный адсорбент, выводя токсические вещества (Жоголев К.Д., Никитин В.Ю., 2001; Ермак И.Н. с соавт., 2004; Корягин А.С. с соавт., 2006).

Хитозановый биогель не токсичен, не дает аллергических реакций, легко наносится на кожу и слизистые оболочки.

4. Характеристика гиалуроновой кислоты

Гиалуроновая кислота (ГК) является гомополимером дисахаридов N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкуроновой кислоты, соединенных β -(1a3) связью, высокомолекулярным полиэлектролитом, растворимым в воде и нерастворимым в органических растворителях. В водных растворах ГК связывается с большим количеством молекул воды с образованием плотного молекулярного сита (Костина Г.А., Радаева И.Н., 1999; Матчин Е.Н. с соавт., 2002; Scott J.E., 1989; Tan S.W. et al., 1990). Этим объясняется участие ГК в транспорте и распределении воды в тканях организма.

В тканях ГК продуцируется молодыми фибробластами и тучными клетками. Обмен ГК в организме происходит с относительно высокой скоростью («полупериод жизни» ГК составляет около 2 суток) (Костина Г.А., Радаева И.Н., 1999; Молохова Е.И., Сафонова Т.М., 2002).

ГК противодействует лизирующему воздействию гиалуронидазы бактерий и их дальнейшему распространению вследствие увеличения синтеза кислоты в очаге воспаления, в результате чего образуется вязкая зона с кислотными свойствами. Накопление ГК в участках воспаления приводит к гидратации ткани, увеличенно сосудистой и тканевой проницаемости.

ГК также применяется в качестве пролонгатора действия других биологически активных веществ. Высокомолекулярная ГК способна обволакивать молекулы или частицы биологически-активных веществ с образованием мягкой эластичной матрицы, из которой препарат высвобождается в течение длительного времени (Симонова Л.В., Пашук Л.К., 1998; Ulrich D. et al., 2004; Pinto K.J. et al., 2006). Она хорошо совместима с тканями и безвредна даже в очень высоких дозах.

Статистическая обработка материала проводилась методом вариационной статистики на персональном компьютере IBM PC/AT с использованием вариационных методов Фишера-Стьюдента с помощью статистической программы Microstat Quatro Pro и программ обработки электронных таблиц EXCEL. Вычислялась среднее значение (M), ошибки средней величины (m). Разницу средних величин оценивали по критерию Стьюдента и вероятности P , которую признавали статистически значимой при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальные исследования показали, что выбранная нами модель приводит к развитию ожогов преимущественно IIIA степени. При этом происходит некротизация и гибель эпидермиса, разрушение соединительно-тканевого каркаса сосочкового и сетчатого слоев дермы

с вовлечением в воспалительный процесс рядом и нижележащих тканей, формирование плотного струпа.

В процессе послеожогового восстановления эпидермальный слой в зоне повреждения отсутствует на 1-7 сутки, а на 15-е и 25-е сутки превышает значение контроля в 3,7 и 4,2 раза соответственно (рис. 1), отличается от нормы формой клеток, количеством слоев и их толщиной.

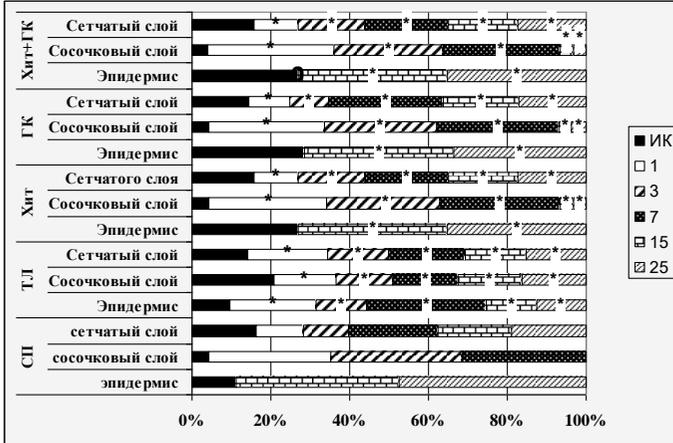


Рис. 1 Показатели кожи в зоне травмы в различных условиях заживления экспериментальной ожоговой раны

Примечание: (*) - достоверное отличие показателя от значения группы с спонтанным заживлением ($P < 0,05$).

Развитие отека приводит к увеличению толщины дермы по сравнению с контролем в зоне травмы на 20% в 1-3-е сутки наблюдения, в 1,8 раза – на 7-е сутки (рис. 2.a), с дальнейшей тенденцией к нормализации, хотя на 25-е сутки толщина дермы остается на 16% больше значения в контроле. Сосочковый слой в зоне повреждения отсутствует в начальные сроки и в регенеративную стадию не восстанавливается. Толщина сетчатого слоя составляет 74% от показателя контроля на 1-3 сутки наблюдения, резко (в 1,4 раза) возрастает на 7-е сутки, и к 25 суткам уменьшается, однако остается на 17% выше показателя нормы (рис. 1).

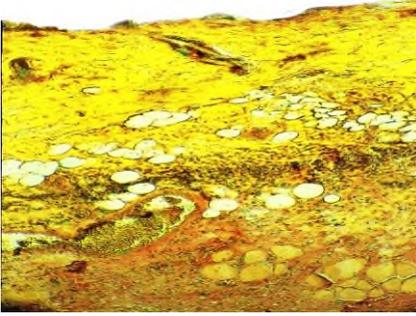


Рис. 2.а. Состояние ожоговой раны на 7-е сутки спонтанного заживления. Окраска пикрофуксином по ван-Гизон. Об. 10х, Ок. 16х.

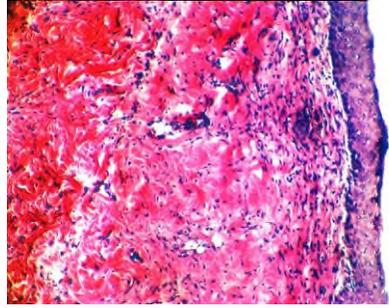


Рис. 2.б. Состояние после ожога на 25-е сутки спонтанного заживления. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 10х, Ок. 16х.

При визуальном изучении интенсивности воспалительной реакции начало формирования демаркационного вала отмечается только на 7-е сутки. Клетки инфильтрируют весь очаг поражения, при этом значительное количество лейкоцитов регистрируется вплоть до конца наблюдения и свидетельствует о сохранении деструктивных процессов (рис. 3). Выраженная пролиферативная активность клеточных элементов сохраняется до конца наблюдения, когда общее количество клеток остается в 4,2 раза выше показателя контроля (рис. 3). Максимальное количество клеточных элементов наблюдается на 15-е сутки и представлено в основном фибробластами (45,9% от общего количества клеток). Дальнейшая пролиферация фибробластов и усиление их синтетической активности является одной из причин образования грубого послеожогового рубца (рис. 2.б).

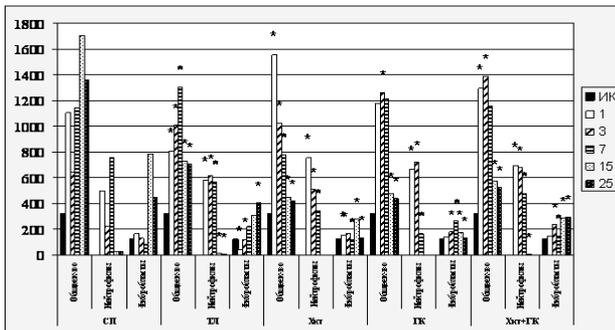


Рис. 3 Изменения клеточного состава дермы в различных условиях заживления экспериментальной ожоговой раны.

Примечание: (*) - достоверное отличие показателя от значения группы с спонтанным заживлением ($P < 0,05$).

При исследовании микроциркуляторного русла, наблюдается резкое увеличение просветов сосудов в ранние сроки наблюдения и к 7-м суткам превышает значение контроля в 2,6 раза (рис. 2.а, рис. 4), имеет тенденцию к нормализации к 15-м суткам, а к концу наблюдения был на 11,4% меньше, чем в контроле. Плотность сосудов на 1-3-е сутки опыта достоверных отличий от контроля не имела (рис. 4). К 7-м суткам наблюдения развивались обширные участки ишемии дермы, в которой просматривались лишь единичные сосуды, что приводило к снижению этого показателя на 17,1% ($P < 0,05$). К 15-м суткам за счет процессов активного новообразования наблюдается увеличение количества сосудов на 21,8% по сравнению с контролем. К 25-м суткам отмечается облитерация некоторых сосудов, а их количество приближено к норме.

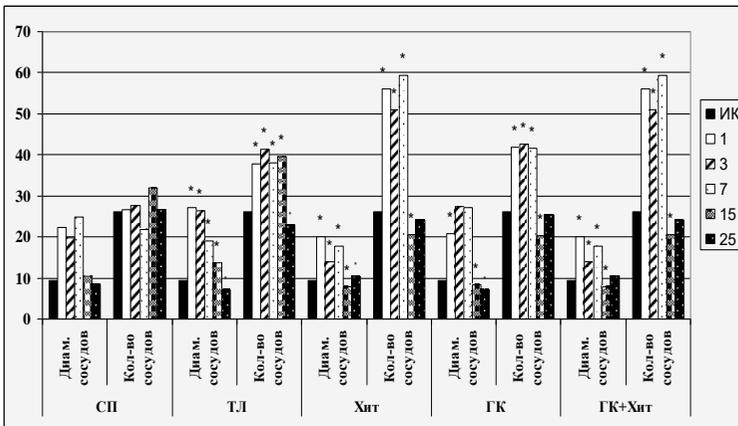


Рис. 4 Изменение сосудистого русла дермы в различных условиях заживления экспериментальной ожоговой раны.

Примечание: (*) - достоверное отличие показателя от значения группы с спонтанным заживлением ($P < 0,05$).

Таким образом, полученные результаты позволили выявить объективные показатели степени тяжести термического ожога кожи, что необходимо для правильного выбора комплекса лечебных мероприятий.

Применение нами комплекса традиционно используемых методов лечения приводит к ускорению процессов заживления ожоговой травмы, снижению воспалительных изменений.

В отличие от группы нелеченных животных, уже в ранние сроки в строении дермы отмечается тенденция к снижению воспалительной реакции и отека (рис. 5.а). Если на 3-е сутки после ожога толщина дермы на 23,6% превышает этот показатель в группе нелеченных

животных, то к 15-м суткам наблюдения структура дермы восстанавливается в большей степени (рис. 5.б), что особенно выражено в переходной зоне.

В данной группе, в отличие от нелеченного контроля, происходит интенсивное разрастание клеток эпидермиса переходной зоны и его утолщение. Эпителиальные клетки уже на 7-е сутки наблюдения интенсивно нарастают на формирующуюся грануляционную ткань и к концу наблюдения полностью покрывают зону травмы, образуя тонкослойный эпителий, отличающийся от нормального размером слоев и структурой клеток (рис. 5.б). Тем не менее, достоверных отличий от группы нелеченного контроля толщина эпителиального слоя не имеет.

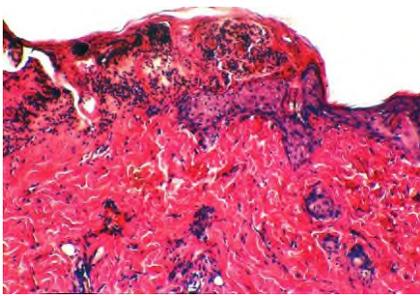


Рис. 5.а. Состояние ожоговой раны на 7-е сутки в группе традиционного лечения. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 10х, Ок. 16х.

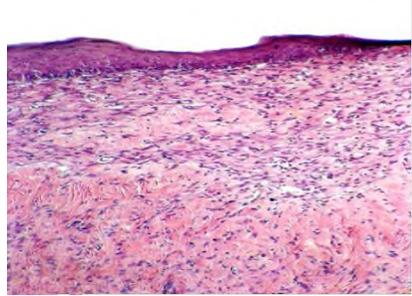


Рис. 5.б. Состояние кожи после ожога на 15-е сутки в группе традиционного лечения. Окраска гематокси-лином и эозином. Об. 10х, Ок. 16х.

Заметно различается состав и численность клеточного компонента дермы. Так, уже на 3-и сутки наблюдения общее количество клеток дермы на площади 1 мм^2 на 11,4% меньше чем в группе нелеченного контроля. В дальнейшем численность клеток прогрессивно уменьшается и к концу наблюдения составляет 44,2% от показателя группы сравнения (рис. 3.). При этом интенсификация процессов очищения раны наблюдается уже с 1-х суток эксперимента, когда число нейтрофильных лейкоцитов на 15,5% превышает показатель контроля, а к 3-м суткам возрастает в 2,8 раза. Начиная с 7-х суток отмечается стихание деструктивных процессов, подтверждаемое прогрессивным снижением числа нейтрофилов, которые на 25-е сутки в 5,5 раза меньше, чем в группе сравнения (рис. 3).

Более ранний переход в пролиферативную стадию воспаления наблюдается и по динамике фибробластов, количество которых начинает прогрессивно возрастать и на 7-е сутки наблюдения в 2,8 раза превышает этот показатель в группе сравнения. К концу наблюдения количество фибробластов в 3,3 раза превышает показатель контроля и достоверного отличия от группы сравнения не имеет (рис. 3).

Анализ состояния кровоснабжения дермы, показал, что аналогично изменениям в группе со спонтанным заживлением, в начальные сроки развивается расширение микрососудов, приводящее к увеличению их диаметра. Начиная с 7-х суток наблюдается тенденция к нормализации. 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 (рис. 4).

Альтерация сосудов приводит к развитию зон ишемии на 3-и сутки наблюдения, тем не менее, количество сосудов в 1,5 раза превышает показатель в группе со спонтанным заживлением. Наблюдающиеся с 7-х суток процессы новообразования сосудов в глубоких слоях дермы, из которой происходит их прорастание в более поверхностные слои приводит к возрастанию данного показателя к 15-м суткам на 24,2% по сравнению с группой нелеченного контроля. Прогрессирование процессов перестройки и созревания грануляционной ткани сопровождается снижением численной плотности сосудов на 25-е сутки наблюдения на 12,5% и 13,6% соответственно по сравнению с контролем и группой спонтанного заживления ($P < 0,05$) (рис. 4).

Таким образом, проведенное нами исследование подтверждает факт недостаточной эффективности традиционной фармакотерапии, которая не всегда может обеспечить адекватный эффект при лечении термических повреждений кожи.

При добавлении в комплекс традиционно используемых при лечении ожогов препаратов хитозанового биогеля получен выраженный терапевтический эффект. В дерме происходит снижение воспалительной реакции, ускорение процессов эпителизации, нормализация кровоснабжения. Так, толщина дермы в этой группе максимальна на 7-е сутки наблюдения и в 1,8 раза превышает показатель контроля, в то же время ее толщины достоверно ниже, чем в группах сравнения, что свидетельствует о стихании экссудативной фазы воспаления.

Активизация пролиферативных и анаболических процессов при лечении хитозановым комплексом приводит к нарастанию в эпицентре ожога 1-2 рядного эпителия уже на 3-и сутки (рис. 6.а). Этому способствуют активные пролиферативные процессы в периферической зоне, где максимальная толщина эпителия отмечена на 7-е сутки,

с дальнейшей нормализацией как количественных данных (рис. 1), так и структуры. К 15-м суткам наблюдается формирование многослойного плоского эпителия (рис. 6.б.). К моменту окончания лечения дерма покрыта многослойным плоским эпителием с типичными слоями стратификации, толщина которого отличается от толщины здоровой ткани. Базальная мембрана и сосочковый слой четко выражены, что, по данным Е.А. Ефимова (1995) и В.Г. Волкова с соавт. (2000), свидетельствует о формировании прочной связи эпителия с подлежащей дермой.

Начало пролиферативной стадии приходится на 3-и сутки наблюдения, когда наряду с распадающимися клеточными элементами выявляются молодые фиброциты. В это время плотность клеток в строме дермы максимальна с дальнейшей нормализацией показателя (рис. 3). Уже на 7-е сутки количество клеток в 1,7 раза меньше, чем в группе с традиционным лечением.

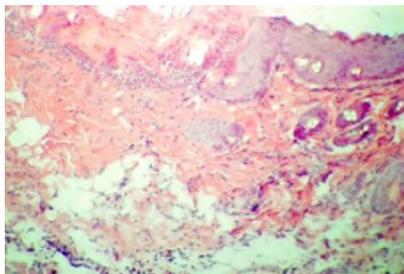


Рис. 6.а. Состояние ожоговой раны на 3-и сутки лечения хитозановым биогелем. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 10х, Ок. 16х.

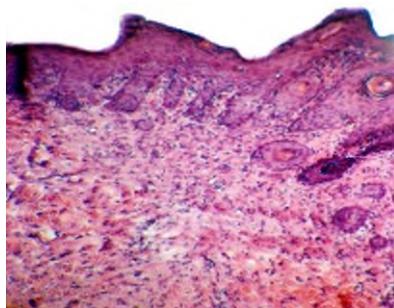


Рис. 6.б. Состояние ожоговой раны на 15-е сутки лечения хитозановым биогелем. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 10х, Ок. 16х.

На 15-е сутки в составе инфильтрата преобладают фиброциты, тогда как нейтрофилы встречаются в единичных случаях. Результатом является меньшая, чем в контрольных группах, толщина новообразованной рубцовой ткани. Признаком благоприятного воздействия препарата на структуру рубца является преобладание волокнистого компонента над клеточным пролифератом и более правильное расположение коллагеновых волокон (рис. 6.б).

С активизирующим влиянием хитозана на тканевые макрофаги может быть также связан выраженный ангиогенез и ускорение эпителизации, выявленные в наших исследованиях. Раневые макрофаги, являясь клетками-регуляторами репаративного процесса, стимулируют

сосудообразование, секретирюя митогенный фактор для эндотелия и фибробластов. Хитозан способствует пролиферации и активизации моноцитов, лимфоцитов и фибробластов, которые участвуют в продукции цитокинов, играющих важную роль в регуляции воспалительных процессов. Сбалансированное количество нейтрофилов и макрофагов способствует быстрейшему очищению области повреждения от некротизированных тканей. Кроме вышеперечисленных факторов, благоприятное течение раневого процесса может быть обусловлено тем, что хитозан расщепляется, всасывается в кровь и усваивается организмом в виде низкомолекулярных соединений, главным из которых является гиалуроновая кислота, входящая в состав межклеточного вещества, мембран и т.д. Не расщепленная ферментами часть хитозана превращается в гелеобразную массу, сорбирующую токсические вещества и улучшающую дренажные свойства лимфатической системы, по современным взглядам являющейся основным местом скопления токсических веществ и наиболее трудно поддающейся детоксикации.

Отличительной чертой течения послеожогового восстановления в коже при использовании хитозана является раннее (на 3-и сутки) стихание гиперемических проявлений (рис. 6.а). Диаметр сосудов в этот срок наблюдения в 1,9 раза меньше, чем в группе с традиционным лечением, имеет в последующем тенденцию к нормализации и к 25-м суткам достоверного отличия от контроля не имеет (рис. 4).

Применение хитозанового биогеля демонстрирует выраженный ангиогенный эффект уже на 3-и сутки, когда отмечается появление единичных сосудов в строме дермы. Уже в этот срок численная плотность сосудов в 1,9 раза превышает значения контроля и группы спонтанного заживления, и на 23,3% выше показателя группы с традиционным лечением (рис 4). Полная репарация эпидермиса и отсутствие повреждений в дерме приводит к заметной редукции сосудистой сети к 15-му дню наблюдения.

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 периферической зоны, о чем свидетельствует увеличение толщины сетчатого слоя на 7-е сутки наблюдения в 2 раза по сравнению с контролем и в 1,5 раза по сравнению с группами традиционного лечения и лечения хитозаном (рис. 1). Данный феномен можно объяснить тем, что вследствие своей высокой гидрофильности гиалуроновая кислота связывает и удерживает интерстициальную воду в межклеточных пространствах (Lapitsky Y. et

al, 2008). Это приводит к гидратации ткани, увеличивает сосудистую и тканевую проницаемость и, в конечном итоге, ведет к удлинению эксудативной фазы воспаления, развитию отечности в формирующейся грануляционной ткани, сохраняющей вплоть до конца наблюдения.

Еще одним отличительным моментом является торможение процессов эпителизации. Хотя утолщение эпидермиса переходной зоны отмечается уже с 1-х суток наблюдения, формирование эпителиальных слоев в зоне травмы происходит только к 15-м суткам, при этом толщина и структура новообразованного эпителия отличается от групп сравнения (рис. 7.6).

Формирование демаркационного вала определяется на 3-и сутки (рис. 7.а), при этом численная плотность клеточного инфильтрата в несколько раз превышает эти показатели в других группах. В ранние сроки наблюдения преобладающими клетками инфильтрата являются нейтрофилы, количество которых остается достоверно выше аналогичных показателей групп сравнения и в более поздние сроки (рис. 3). К окончанию наблюдения в дерме преобладают фибробласты и фиброциты, причем количество зрелых фиброцитов на 25-е сутки в 1,2 и 1,4 раза превышает их число в группах с традиционным лечением и лечением хитозаном, а на месте грануляционной ткани определяется формирование плотного рубца.

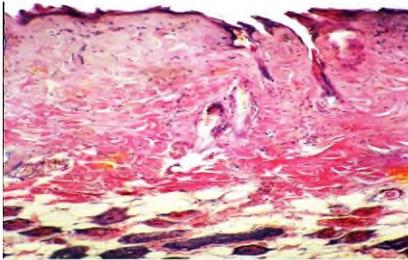


Рис. 7.а. Состояние ожоговой раны на 3-е сутки лечения гелем гиалуроновой кислоты. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 10х, Ок. 16х.

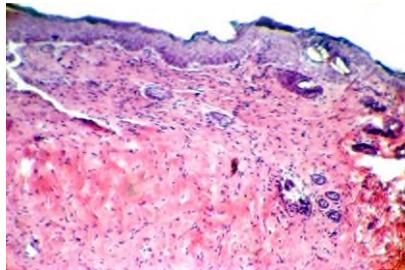


Рис. 7.б. Состояние ожоговой раны на 15-е сутки лечения гелем гиалуроновой кислоты. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 10х, Ок. 16х.

Выраженные отличия имеет и процесс перестройки сосудистого русла. Так, начиная с 3-х суток диаметр сосудов в 2 раза больше чем в контроле и в группе с применением хитозана. Дилатация сохраняется вплоть до 15-х суток, когда просветы сосудов достоверных отличий от групп сравнения не имеют (рис. 7.6). К 25-м суткам наблюдения этот

показатель не имеет достоверных отличий от группы с традиционным лечением и ниже значений в других экспериментальных группах. Численная плотность сосудов на 1-е, 3-е и 7-е сутки наблюдения достоверно выше показателей контроля и группы со спонтанным заживлением, практически не отличается от группы с традиционным лечением и достоверно ниже чем в группе, леченной хитозаном (рис. 4). К 15-м суткам количество сосудов меньше, чем в группах со спонтанным заживлением и традиционным лечением и отличия от группы леченой хитозаном не имеет, что совпадает с процессом созревания грануляционной ткани. К концу наблюдения количество сосудов не отличается от других групп (рис. 4).

Таким образом, установлено, что применение геля гиалуроновой кислоты в альтернативную фазу воспаления приводит к существенному подавлению ангиогенеза, ингибированию клеточной миграции и пролиферации. По данным В.Г. Волкова с соавт. (2000) и Builles N. et al. (2007) это связано с наличием фракции высокомолекулярной ГК (массой более 500000).

В фазе пролиферации, в результате распада ГК на низкомолекулярные фракции, прослеживается стимулирующее действие ГК на систему макрофагов. Наблюдается резкое возрастание числа всех клеточных элементов соединительной ткани, превышающее таковое в группах сравнения, что также наблюдали Е.Н. Матчин с соавт. (2002) и М.Т. Азнабаев с соавт. (2003). ГК в определенной степени тормозит процессы фиброобразования зрелых компонентов грануляционной ткани. Примечательно, что образование межтучного вещества преобладает над синтезом коллагеновых волокон, что, по мнению Г.А. Костиной (1999) и В.В. Строителява (2000), предотвращает избыточное образование грануляционной ткани и формирование грубых рубцов.

При комплексном лечении с добавлением хитозанового биогеля и геля гиалуроновой кислоты структурные изменения и динамика морфометрических показателей были во многом сходны с данными «хитозановой» группы.

Так, в ранние сроки наблюдения поверхность раны покрыта струпом, в строме дермы, а особенно в гиподерме, определяется выраженный отек. На 3-и сутки в краевой зоне отмечается активизация пролиферативных процессов как со стороны эпидермиса, так и эпителия волосяных луковиц, образующих сосочковые разрастания в сторону раны, формируется демаркационный вал (рис. 8.а). На 7-е сутки наблюдается прорастание тонкого пласта эпителия под струп и начало его отторжения. Определяется стихание отечных проявлений, активное новообразование грануляционной ткани. На 15-е сутки отмечается

восстановление эпидермиса, созревание грануляционной ткани, формирование сосочкового слоя (рис. 8.б). К концу эксперимента в области ожоговой травмы определяется регенерат дермального типа. Структура эпидермиса приближена к норме, слегка утолщена, местами еще отсутствует роговый слой.

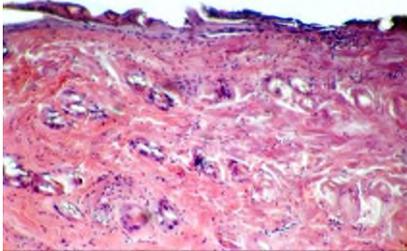


Рис. 8.а. Состояние ожоговой раны на 3-и сутки лечения хитозановым гелем и гелем ГК. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 10х, Ок. 16х.

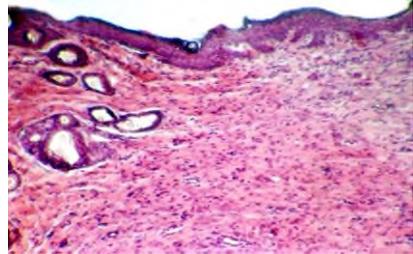


Рис. 8.б. Состояние ожоговой раны на 15-е сутки лечения хитозановым гелем и гелем ГК. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 10х, Ок. 16х.

Сосочковый и сетчатый слои хорошо различимы, тем не менее, в них еще содержится повышенное количество микрососудов и клеточных форм. При этом морфометрические показатели дермы практически не отличаются от значений группы, леченой хитозаном и имеют сходную динамику с показателями сравниваемых групп (рис. 1).

Резкое увеличение количества клеточных элементов отмечается уже на 1-е сутки наблюдения (рис. 3). При этом их общее количество в 4 и 1,6 раза превышает показатели контроля и группы с традиционным лечением и на 17,2% и 10,5% выше показателей в группах со спонтанным заживлением и лечением гиалуроновой кислотой, но на 16,7% меньше, чем в группе леченой хитозаном ($P < 0,05$). К 7-м суткам еще сохраняются активные процессы расплавления тканей, вследствие чего содержание нейтрофилов в 3,1 и 1,3 раза выше показателей группы со спонтанным заживлением и леченой хитозаном, на 10,5% больше, чем в группе с традиционным лечением и незначительны при лечении ГК ($P > 0,05$). Параллельно резко увеличивается содержание фибробластов, превышая значения сравниваемых групп в 1,3-2 раза (рис. 3). Активная репаративная трансформация клеточных и тканевых компонентов раны сохраняется до конца наблюдения, о чем свидетельствует повышенное содержание клеток в зоне травмы, по сравнению с группой контроля, леченых хитозаном и гиалуроновой кислотой (рис. 3).

Структура и динамика изменений морфометрических показателей сосудов микроциркуляторного русла наиболее сходна с группой, леченной хитозаном (рис. 4). 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 фибриллообразования, созревания коллагеновых волокон в ране, и, в конечном счете, формирование мягкого, эластичного рубца.

Таким образом, при включении в лечение ожоговых ран хитозана и гиалуроновой кислоты, отмечена благоприятная динамика репаративных процессов с несомненным их доминированием над альтеративно-экссудативными. Наблюдалось быстрое увеличение числа функционально активных фибробластов, более раннее формирование грануляционной ткани, что сокращало сроки заживления. Темп стихания воспалительного и начала репаративного процесса был несколько выше, чем в группах сравнения. Вероятно, это связано с тем, что хитозан и гиалуроновая кислота, во-первых защищают рану от высыхания, создавая оптимальные условия для роста грануляций, во-вторых, оказывают стимулирующий эффект посредством выделения биологически активных веществ и факторов роста.

Из вышеизложенного можно заключить, что препарат хитозанового биогеля и геля гиалуроновой кислоты являются активными стимуляторами репаративных процессов в обожженной коже. Это происходит благодаря их способности быстро проникать в глубинные слои дермы, активируя местную защитную реакцию, что приводит к ускорению процессов заживления, улучшению кровоснабжения и обмена веществ. Хитозан и гиалуроновая кислота стимулируют физиологические репарационные процессы и ангиогенез, направляют фиброгенез по органотипическому пути. Они служат основой, на которой организуется нормальная тканевая архитектура, что делает эти препараты необходимым компонентом ранней терапии термических повреждений кожи.

ВЫВОДЫ

1. Результаты исследования различных слоев кожи показали, что использованная нами модель термического поражения адекватна клиническому проявлению ожога IIIА степени.

2. При традиционном лечении термического ожога кожи определяется недостаточность этого метода для полноценного восстановления структурно-функциональных её свойств. Об этом свидетельствует формирование неполноценного эпидермиса и поздние сроки заживления.
3. Включение хитозанового геля в комплекс традиционного лечения термического ожога кожи способствует быстрейшему очищению раны от некротизированных тканей, ускорению репаративных процессов за счет пролиферации фибробластов и активизации фибриллообразования, что приводит к формированию мягкого, эластичного рубца.
4. Применение геля гиалуроновой кислоты в фазе экссудации вызывает увеличение отечности ткани, а в фазе пролиферации прослеживается его стимулирующее действие на клеточные элементы соединительной ткани, наблюдается торможение процессов фиброобразования, что предотвращает формирование грубых рубцов.
5. Комбинированное использование хитозанового биогеля и геля гиалуроновой кислоты в комплексном лечении ожогов кожи выявило выраженное снижение процессов деструкции и ускорение регенераторных процессов, стимуляцию ангиогенеза, что ускоряет эпителизацию и способствует более быстрому восстановлению архитектоники кожи.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При термических ожогах кожи IIIA степени рекомендуется, наряду с традиционным методом, использовать хитозановый биогель, что способствует более полноценному восстановлению кожи.
2. Гель гиалуроновой кислоты целесообразно применять в экссудативную фазу воспаления вследствие выраженного усиления им отечных процессов.
3. Следует рекомендовать комплексное применение хитозанового биогеля и геля гиалуроновой кислоты при лечении ожогов, так как это более эффективно ускоряет регенерацию кожи при меньшей выраженности воспалительного процесса.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Курамаева У.К. Перспективы применение БАД в комплексном лечении ожоговой раны // Матер. V межд. научного симпозиума. – Чолпон-Ата, 2001. – Том II. – С. 160-163.
2. Курамаева У.К. Морфология регенераторных процессов при лечении хитозаном термических ожогов // Хирургия, морфология, лимфология: Мат. межд. практ. конференции. – Бишкек, 2003. – С. 161 – 167.
3. Курамаева У.К. Экспериментальное обоснование возможности применения гиалуроновой кислоты в комплексном лечении термических ожогов / Казенов Д.В. // Там же. – С. 167 – 173.
4. Курамаева У.К. Морфологические изменения в ожоговой ране под влиянием комплексного применения биологически активных веществ // Пробл. лимфол. и интерстициального массопереноса: Матер. науч. конф. – Новосибирск, 2004. – Том 10. – Часть 1. – С. 222-228.
5. Курамаева У.К. Структурная организация кожи на фоне воздействия термического агента / Чолпонбаев Н.Э. // Физ., морф. и пат. человека и животных в условиях Кыргызстана: Мат. ежегодной конф. – Бишкек, 2004. – Вып. 4. – С. 97-101.
6. Курамаева У.К. Влияние хитозана и гиалуроновой кислоты на течение регенераторных процессов в коже при экспериментальном термическом ожоге // Там же. – С. 104-109.
7. Курамаева У.К. Регенерация раны под воздействием хитозанового геля «Васна» / Бакиев Б.А., Бакиев А.Б. // Медицинские кадры XXI века. – 2005. – №2. – С. 92-96.
8. Курамаева У.К. Способ нанесения термического ожога кожи на экспериментальных животных. Рац. предл. №36/07 от 13.09.2007 г.
9. Курамаева У.К. Морфологическое изучение динамики течения ожоговой раны при лечении гелем гиалуроновой кислоты // Физ., морф. и пат. человека и животных в условиях Кыргызстана: Мат. ежегодной конф. – Бишкек, 2007. – Вып. 7. – С. 293-299.
10. Курамаева У.К. Особенности морфологической организации кожи при различных подходах к лечению ожоговой раны // Физ., морф. и пат. человека и животных в условиях Кыргызстана: Мат. ежегодной конф. – Бишкек, 2008. – Вып. 8. – С. 90-94.
11. Курамаева У.К. Морфологическое изучение регенерационных процессов в коже после воздействия термического агента // Медицина Кыргызстана.– 2008. - №1. – С. 55-59.
12. Курамаева У.К. Динамика изменений микроциркуляторного русла кожи при ожогах // Вестник Кыргызско-Российского Славянского университета. – 2008. – Том 8. - №4. – С. 6-8.

Объем 1,4 п.л.
Тираж 100 экз. Заказ _____

Типография ОсОО «Алтын тамга»
720000, г. Бишкек, ул. Орозбекова, 44
Тел.: (+996 312) 62-13-10
e-mail: romass@front.ru