

Copyright © 2014 by Academic Publishing House *Researcher*

Published in the Russian Federation  
European Journal of Medicine  
Has been issued since 2013.  
ISSN: 2308-6513  
E-ISSN: 2310-3434  
Vol. 5, No. 3, pp. 183-196, 2014

DOI: 10.13187/ejm.2014.5.183  
[www.ejournal5.com](http://www.ejournal5.com)



UDC 616

## Chitosan Membrane as a New Wound Healing Agent on Chemical Wound Model

Yuliya A. Tkachenko

Sumy State University, Ukraine  
40007, Sumy, R-Korsakova St., 2  
E-mail: pogorelov\_max@mail.ru

### Abstract

Healing of skin defect of any etiology goes through several stages, which are completed or complete restoration of the lost cover, or the formation of scar tissue that covers the injury. Regeneration of the skin is depending on the type of injury, collateral damage, existing diseases such as diabetes, obesity, immune deficiency, including AIDS. At present, in the arsenal of physicians, there are a range of materials – from human skin to materials using tissue engineering technology. However, there is no universal bandage that meets the physician and patient efficacy and pharmaco-economic indicators. Therefore, the development of new materials for local treatment of skin lesions is relevant biomedical problem.

The purpose of the work. Identify the characteristics of the regeneration process of the skin after a chemical burn when using chitosan membranes.

We have conducted an experiment on 180 male laboratory rats of three age groups. All animals were simulated chemical burn in the interscapular region. The control animals received standard treatment of a series of chemical burns with sterile gauze bandages, which are changed daily. Experimental series of animals for the treatment of skin lesions using chitosan hydrogel, which was applied to the damaged areas with the replacement of film 1 per day.

As a result, the application of chitosan dressings observed accelerated cleansing the wound necrosis in animals of young and adult ages and full wound epithelialization till 21 day of observation. Cytological examination showed decreased number of inflammatory cells at the wound surface and increase in the number of macrophages and fibroblasts. These changes had expressed age-related and more pronounced effect in animals of young and adult ages.

**Keywords:** Chitosan membrane; new wound healing agent; chemical wound model.

### Введение

Заживление дефекта кожи любой этиологии проходит несколько стадий, которые завершаются или полным восстановлением утраченного покрова, или формированием рубцовой ткани, которая покрывает место травмы. Стадийность течения регенерации кожи имеет зависимости от вида травмы, сопутствующих повреждений, имеющихся болезней, таких как сахарный диабет, ожирение, иммунодефицитные состояния, в том числе и СПИД [14]. Возраст пациента на момент травмы также может влиять на процессы заживления дефекта через особенности кровоснабжения кожи, наличия резервных клеток и их функциональной активности. Поэтому, при ведении больных с дефектами кожи необходимо

учитывать указанные факторы для ускорения заживления раны без образования рубцовой ткани.

Одним из основных методов лечения поверхностных ран является применение местных средств [14]. Традиционно, с начала XX века, применяются разновидности марлевых повязок, которые выполняют защитную и сорбирующую функцию, однако не способствуют процессу заживления дефекта [17]. Поэтому с середины XX века ведутся поиски новых материалов для пластики дефектов кожи. Идеальная повязка должна защищать поверхность раны, быть проницаемой для кислорода и других газов, иметь удовлетворительные сорбирующие свойства и не вызывать побочных эффектов [7]. На сегодня в арсенале врачей имеется целый спектр материалов – от ксенокожи до материалов, созданных по технологии тканевой инженерии. Однако отсутствует универсальная повязка, которая удовлетворяет врача и пациента по эффективности и фармако-экономическим показателями [14]. Поэтому разработка новых средств местного лечения повреждений кожи является актуальной медико-биологической проблемой.

В последние годы возросло количество публикаций по использованию хитозана для создания биологически активных материалов [15]. Хитозан является деацетилированным производным хитина и имеет уникальные биологические свойства, такие как биосовместимость, биodeградацию, отсутствие токсичности и антигенных свойств, антибактериальное и антифунгальное действие. В литературе имеются данные по использованию материалов из хитозана для лечения ожогов термического характера, как в чистом виде, так и в сочетании с серебром, мирамистином, йодидами т.д. [1, 2] Указанные материалы продемонстрировали способность к стимуляции регенераторных процессов, уменьшения бактериальной нагрузки и профилактики образования рубцовой ткани. Однако в литературе отсутствуют данные о морфо-функциональных особенностях регенерации кожи после химической травмы при применении производных хитозана в возрастном аспекте.

**Цель работы.** Выявить особенности течения процесса регенерации кожи после химического ожога при применении хитозановых мембран

### **Материалы и методы**

Нами проведен эксперимент на 180 лабораторных крысах самцах трех возрастных групп – молодого (3 месяца), зрелого (9 месяцев) и старческого (22 месяца) возраста, которые были разделены на контрольную и экспериментальную серии. Всем животным моделировали химический ожог IIIa степени в межлопаточной области. Животным контрольной серии проводили стандартное лечение химических ожогов с применением стерильных марлевых повязок, которые меняли ежедневно. Экспериментальной серии животных для лечения повреждений кожи использовали гидрогель хитозана, который накладывали на поврежденные участки с заменой пленки 1 раз в день.

Животных обеих серий выводили из эксперимента путем передозировки наркоза (70 мг / кг) через 1, 3, 5, 7, 14 и 21 день после травмы и проводили исследования процессов регенерации кожи с использованием методов планиметрии и цитологии.

### **Результаты исследования и обсуждение**

Через сутки после травмы на поверхности кожи образуется некротическая корка, которая выполняет защитную функцию и предупреждает распространение химического ожога на здоровые ткани. Несмотря на унифицированную методику нанесения травмы, площадь некроза у животных разного возраста отличается, что возможно является следствием большей способности кожи животных молодого возраста к контракции при наличии высоких эластичных свойств с одной стороны, и значительная коагуляция белковых молекул у животных старческого возраста – с другой. Так, относительная площадь некроза у животных старческого возраста превышает указанный показатель у молодых крыс на 10,05 % ( $p \leq 0,05$ ), разница с животными зрелого возраста составляет 6,91 % ( $p \leq 0,05$ ). Следует отметить, что площадь некротически-измененных тканей у животных молодого и зрелого возраста отличается недостоверно.

Через 3 суток после травмы площадь раны у животных молодого и зрелого возраста уменьшается соответственно до  $31,22 \pm 0,12$  % и  $43,56 \pm 0,17$  %. При этом, у животных

старческого возраста данный показатель меняется недостоверно. Таким образом, уже через 3 суток после травмы отмечается очищения раны от некротических масс у животных молодого и зрелого возраста и задержка данных процессов у крыс старческого возраста, что возможно является следствием низкой активности макрофагов.

Через 7 и 14 дней после травмы сохраняется тенденция, выявленная в ранние сроки наблюдения и на 14 сутки площадь некроза у животных старческого возраста превышает данный показатель у крыс молодого и зрелого возраста на 59,05 % ( $p \leq 0,05$ ) и 114,29 % ( $p \leq 0,05$ ) соответственно. На 21 сутки наблюдения во всех возрастных группах происходит полная эпителизация раны с отсутствием очагов некротически измененных тканей.

Общая площадь дефекта с 7 суток наблюдения уменьшается во все возрастные периоды, что связано с контракцией раны и ее постепенной эпителизацией. При этом у животных молодого и зрелого возраста процесс уменьшения площади дефекта имеет более быструю динамику по сравнению с животными старческого возраста. За счет контракции раны и ее эпителизации на 21 сутки наблюдения площадь раны эпителизованного дефекта составляет соответственно  $1,54 \pm 0,01$  см<sup>2</sup>,  $1,72 \pm 0,05$  см<sup>2</sup> и  $2,36 \pm 0,03$  см<sup>2</sup>. Использование хитозановой мембраны приводит к уменьшению площади дефекта во всех возрастных группах, начиная с 14 суток наблюдения, что возможно является следствием образования полноценной соединительной ткани в условиях применения искусственного покрытия. Исследования некоторых авторов свидетельствуют о формировании полноценного коллагена и улучшения ориентации его волокон при применении хитозана [3]. Через 21 сутки наблюдения применения хитозана приводит к уменьшению площади дефекта у животных молодого возраста на 26,23 % ( $p \leq 0,05$ ), зрелого возраста – на 21,13 % ( $p \leq 0,05$ ) и у крыс старческого возраста – на 11,32 % ( $p \leq 0,05$ ) (рис. 1).

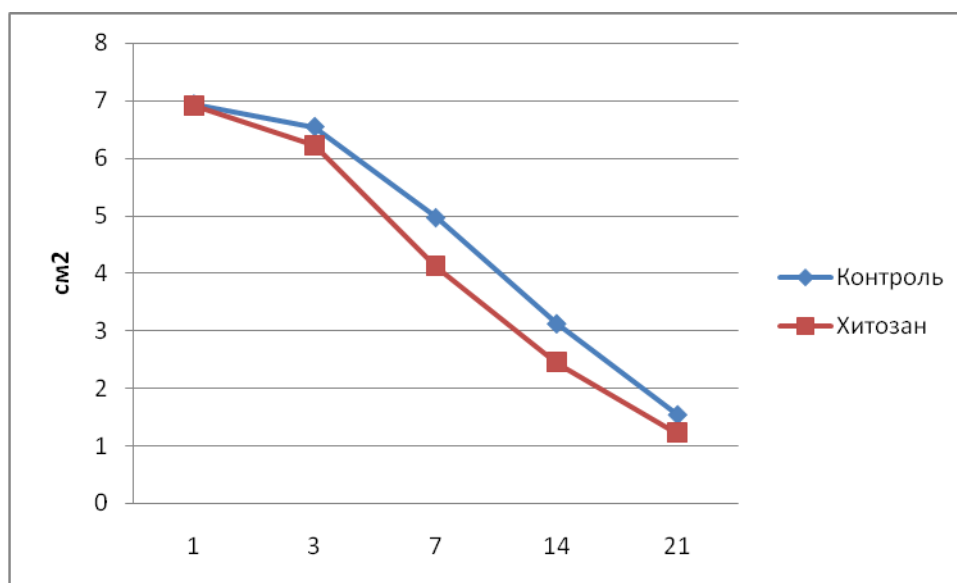


Рис. 1. Динамика изменения площади дефекта у животных молодого возраста при применении стандартного лечения и использовании хитозановой мембраны

Относительная площадь некротизированных тканей при использовании хитозановой мембраны начинает уменьшаться у животных молодого и зрелого возраста через 3 суток после травмы по сравнению с контрольной группой крыс. Ускорение динамики очищения раны от некротизированных тканей может быть следствием активизации макрофагов олигомерами хитозана. Есть доказательства стимуляции миграции клеток макрофагального ряда и рост их фагоцитарной активности вследствие взаимодействия с хитозаном [6]. Отсутствие динамики у животных старческого возраста может быть свидетельством уменьшения чувствительности макрофагов к внешним факторам, а также нарушением местного кровообращения, что ухудшает процессы миграции клеток. Через 3 суток после травмы относительная площадь некроза у животных молодого возраста при применении хитозановой мембраны меньше по сравнению с контролем на 15,65 % ( $p \leq 0,05$ ), у крыс зрелого возраста – на 20,44 % ( $p \leq 0,05$ ).

В дальнейшем отмечается снижение относительной площади некроза во всех возрастных группах по сравнению с контролем, однако наблюдается возрастная зависимость (рис. 2). Так, у животных молодого возраста через 14 дней после травмы площадь некроза меньше контроля на 45,44 % ( $p \leq 0,05$ ), в зрелых – на 32,81 % ( $p \leq 0,05$ ) и у крыс старческого возраста – на 24,13 % ( $p \leq 0,05$ ).

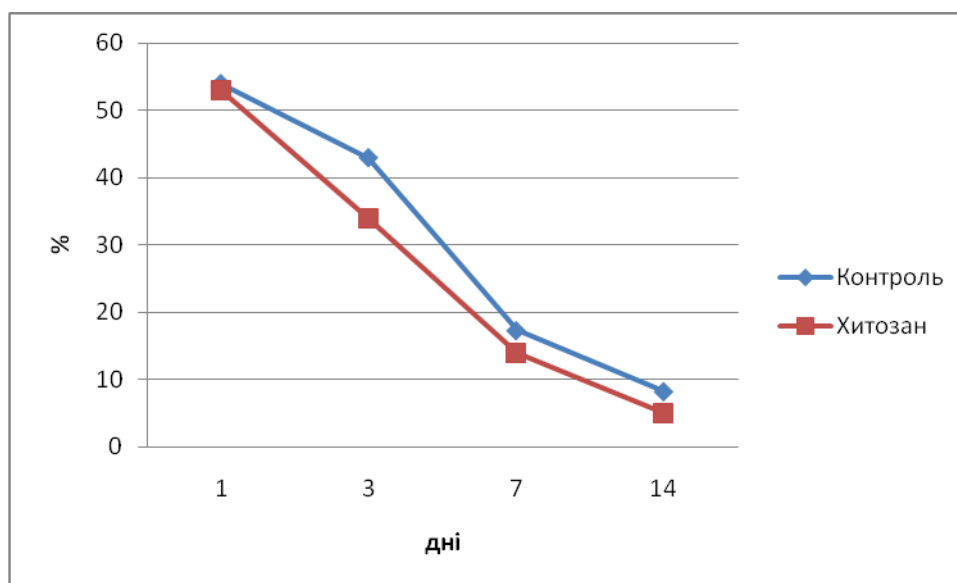


Рис. 2. Динамика изменения относительной площади некроза у животных зрелого возраста при применении стандартного лечения и использовании хитозановой мембраны

Грануляционная ткань появляется на поверхности раны в ее краевых участках через 3 суток после травмы. Появление данной ткани является следствием миграции фибробластов с неповрежденных участков кожи и синтеза ими соединительнотканного каркаса, в который вырастают многочисленные капилляры. Сравнивая динамику роста грануляций на поверхности раны, мы подтвердили данные многих авторов о замедлении ее формирования у особей старческого возраста, что связано с уменьшением активности клеток фибробластического ряда и угнетением процессов ангиогенеза с возрастом [8]. Площадь грануляций через 3 суток у животных старческого возраста меньше, чем у крыс молодого возраста почти в четыре раза.

Количество грануляций возрастает к 7 суткам у животных молодого и зрелого возраста и значительно уменьшается к концу срока наблюдения. При этом у животных старческого возраста уменьшение площади грануляционной ткани отмечается лишь через 21 дня наблюдения.

Уменьшение площади грануляций является следствием эпителизации поверхности раны, которая начинается через 7 дней у животных молодого и зрелого возраста и через 2 недели – у крыс старческого возраста. Появление эпителиоцитов является следствием их миграции и пролиферации с неповрежденных участков кожи и имеет зависимость от интенсивности кровоснабжения. Последний фактор может быть причиной замедления образования эпителиального покрова у животных старческого возраста.

Применение хитозановой мембраны для закрытия дефекта приводит к росту количества грануляций во всех возрастных группах животных, однако интенсивность увеличения площади различна. Так, через 3 суток после травмы площади грануляционной ткани возрастает у животных молодого возраста по сравнению с контролем на 52,14 % ( $p \leq 0,05$ ), зрелого возраста – на 56,08 % ( $p \leq 0,05$ ) и старческого – лишь на 17,89 % ( $p \leq 0,05$ ). При этом у животных последней возрастной группы через 7 дней после травмы не отмечается достоверного роста площади грануляций. Активный рост грануляционной ткани и процессов эпителизации приводит к отсутствию грануляций в последний срок наблюдения при использовании хитозановой мембраны у животных молодого и зрелого возраста. У животных старческого возраста площадь грануляционной ткани через 21 сутки

после травмы равна  $3,25 \pm 0,03$  см<sup>2</sup>, что почти втрое меньше аналогичного показателя в контрольной группе (рис. 3).

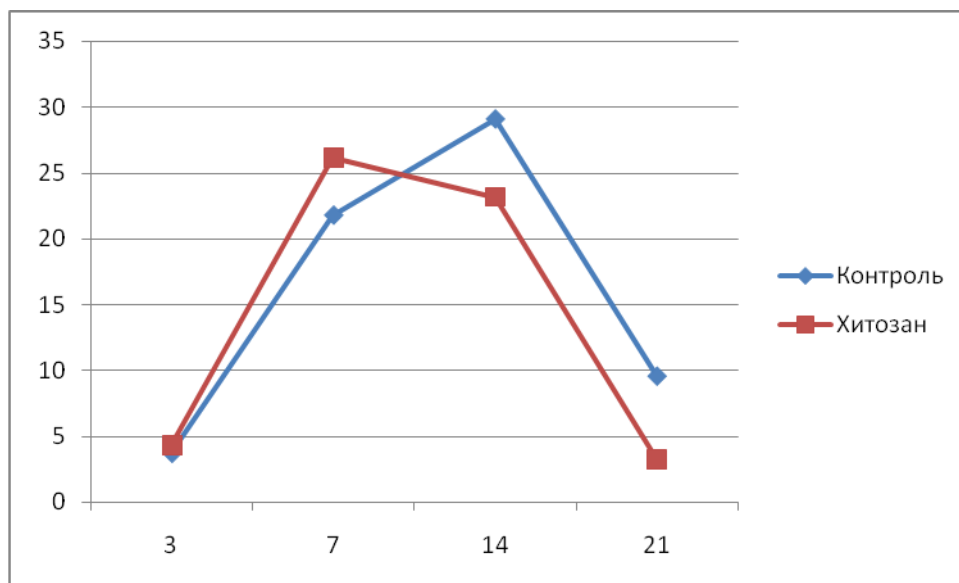


Рис. 3. Динамика изменения относительной площади грануляционной ткани у животных старческого возраста при применении стандартного лечения и использовании хитозановой мембраны

Использование хитозановой мембраны приводит к ускорению эпителизации поверхности раны у животных всех возрастных групп, а у крыс старческого возраста смещает срок появления эпителизованных участков на 7 сутки наблюдения. На 21 сутки после травмы происходит почти полная эпителизация дефекта без образования рубцовой ткани у животных молодого и зрелого возраста. У крыс старческого возраста происходит увеличение процента эпителизованных участков во все сроки наблюдения, однако на 21 день он составляет  $75,12 \pm 0,47$  %, но этот показатель на  $9,76$  % ( $p \leq 0,05$ ) превышает контроль (рис. 4).

Ускоренное развитие грануляций и увеличения площади эпителизованных участков при использовании хитозановой мембраны имеет несколько механизмов. Во-первых, олигомеры хитозана, которые высвобождаются при его деградации имеют хемотаксические свойства по отношению к фибробластам, синтезирующих межклеточный матрикс [12]. Во-вторых, хитозан может выступать в качестве материала для формирования сетки гликозаминогликанов, как структурного слоя связующего вещества [13]. Также есть доказательства повышения пролиферативной активности фибробластов и эпителиоцитов в культуре при добавлении продуктов деградации хитозана. Олигомеры хитозана, по данным некоторых авторов, могут также активизировать процессы ангиогенеза [4].

В общем, использование хитозановой мембраны приводит к более раннему началу эпителизации у животных всех возрастных групп и уменьшению срока полной эпителизации поверхности раны и скорости ее заживления у крыс молодого и зрелого возраста.

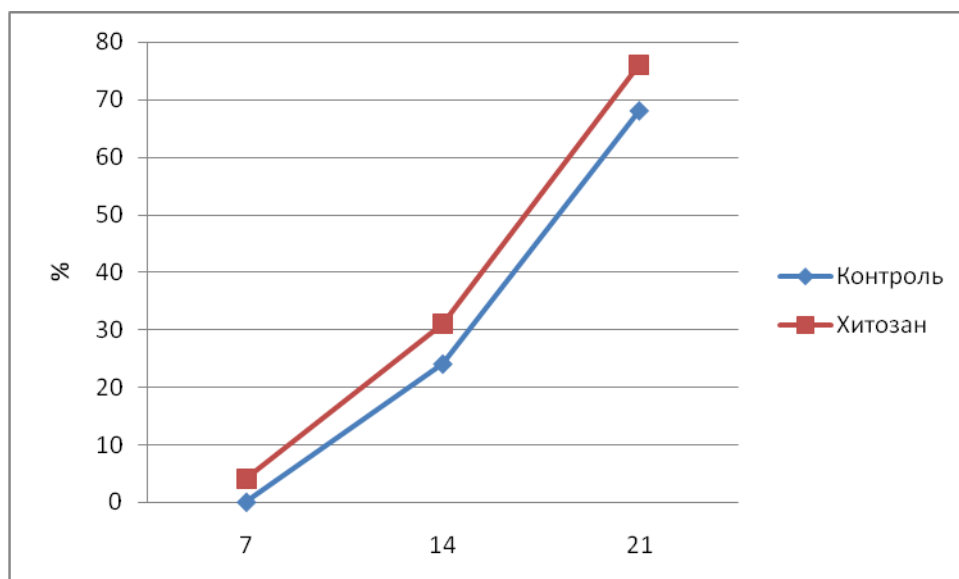


Рис. 4. Динамика изменения относительной площади эпителизации у животных старческого возраста при применении стандартного лечения и использовании хитозановой мембраны

Анализируя показатели цитологического исследования мазков с поверхности раны у животных разного возраста, обращает на себя внимание уменьшенное количество лейкоцитов в 1 и 3 сутки у животных старческого возраста. Так, в первые сутки после травмы количество клеток составляет  $98 \pm 0,67$  в поле зрения у крыс молодого возраста, уменьшаясь до  $86,98 \pm 0,39$  – у зрелых и до  $65,03 \pm 0,19$  – у особей старческого возраста. Данный показатель свидетельствует об уменьшении воспалительных процессов в ране. Однако, воспалительная реакция в первые дни после нанесения химического ожога выполняет защитную реакцию и направлена на защиту здоровых тканей от повреждения [7]. Вместе с этим, через 7, 14 и 15 дней после травмы отмечается значительное уменьшение количества лейкоцитов у животных молодого и зрелого возраста, что свидетельствует об уменьшении воспалительной реакции. На 21 сутки после травмы количество лейкоцитов в поле зрения у животных молодого возраста составляет  $11,8 \pm 0,03$ , в зрелых –  $10,2 \pm 0,04$ , что является нормальным показателем для кожи крыс. У животных старческого возраста динамика уменьшения количества лейкоцитов является медленной, что свидетельствует о пролонгации воспалительного процесса. Известно, что в условиях хронизации воспаления нарушаются процессы синтеза межклеточного вещества, что может приводить к незавершенной регенерации и формирования рубцовой ткани [9]. Даже через 21 сутки после травмы количество лейкоцитов у животных старческого возраста в ране превышает показатель предыдущих возрастных групп почти вдвое (рис. 5). Как видно из графика, кривая количества лейкоцитов у животных старческого возраста является более пологой и сроки между 3 и 7 сутками наблюдения почти не меняется в отличие от животных молодого и зрелого возраста, у которых происходит резкое уменьшение количества клеток в данный промежуток времени.

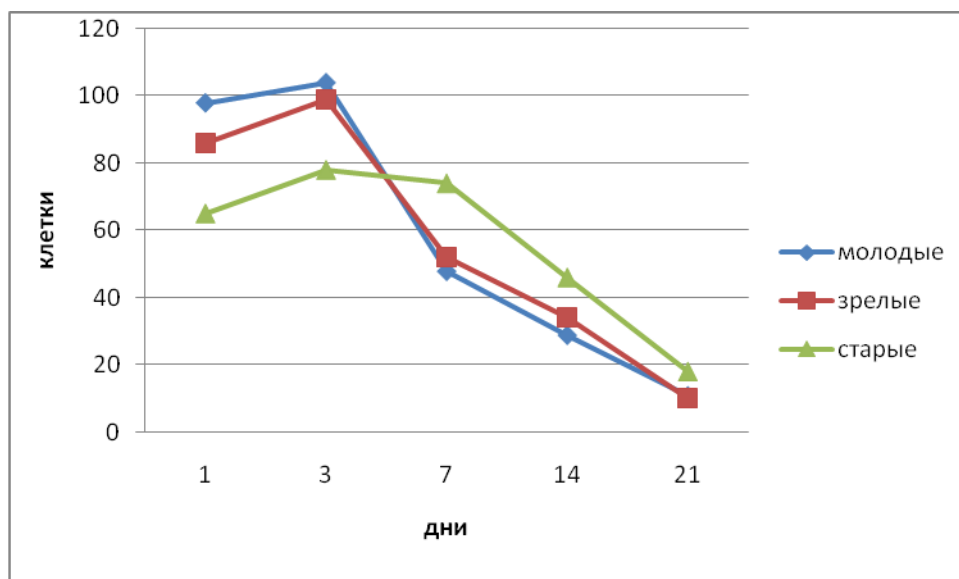


Рис. 5. Динамика изменения количества лейкоцитов на поверхности раны у животных разного возраста при применении стандартного лечения

При применении хитозановой мембраны для лечения химического ожога кожи отмечается уменьшение выраженности воспалительных процессов, о чем свидетельствует уменьшение количества лейкоцитов у животных молодого и зрелого возраста. Уменьшение количества лейкоцитов может быть следствием антибактериальных свойств хитозана и уменьшение вследствие этого бактериальной нагрузки на рану [16]. При этом у животных старческого возраста происходит рост количества воспалительных клеток на 3 сутки наблюдения, достигая уровня животных молодого и зрелого возраста (рис. 6). Это, возможно, связано с активизацией клеток лейкоцитарного ряда олигомерами хитозана, о чем свидетельствуют ряд исследований [5].

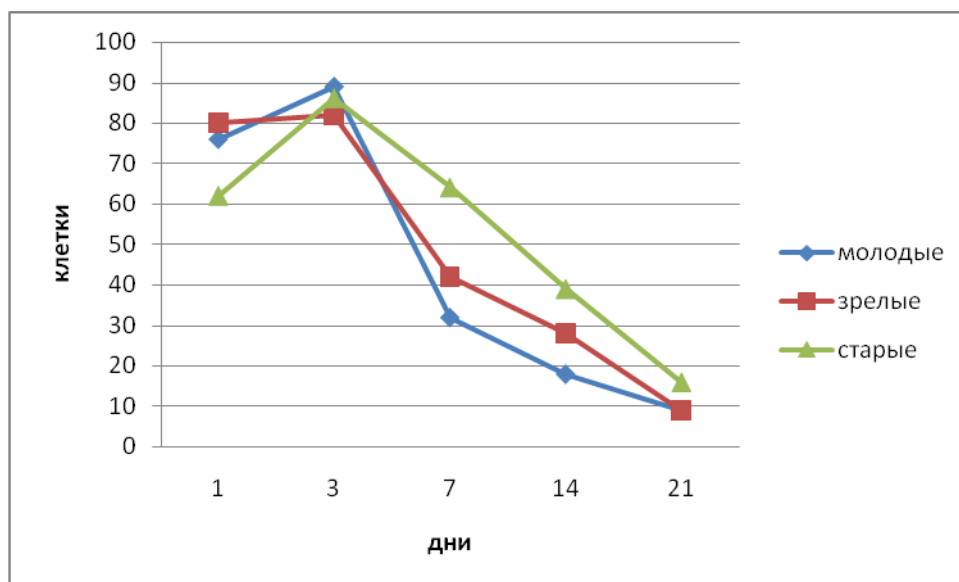


Рис. 6. Динамика изменения количества лейкоцитов на поверхности раны у животных разного возраста при применении хитозановой мембраны

Особенностью цитологической картины при применении хитозановой мембраны является стремительное уменьшение количества клеток в сроки от 3 до 7 суток во все возрастные периоды. Именно в данный термин происходит переход от воспалительной стадии в фазу образования грануляций и уменьшение воспалительной реакции должно быть

положительным фактором образования соединительнотканного каркаса и роста сосудов грануляционной ткани. Как видно из графика, наиболее значительное уменьшение количества лейкоцитов происходит у животных молодого возраста, что возможно связано с высокой чувствительностью клеток к воздействию внешних стимулов, в частности молекул хитозана.

Анализируя содержание лейкоцитов, обращает на себя внимание преобладание нейтрофилов, как маркеров септического воспаления в первые сроки наблюдения. Как видно из графика (рис. 7), у животных молодого и зрелого возраста происходит рост содержания данных клеток с 1 до 3 суток наблюдения, что отражает развитие воспаления как реакцию на некроз тканей в ране. У животных молодого возраста уровень нейтрофилов достигает  $91,1 \pm 0,28$  % на 3 сутки наблюдения. При этом, начиная с 7 суток, их содержание резко уменьшается и составляет  $11,5 \pm 0,04$  % и  $13,4 \pm 0,03$  % на 21 день наблюдения в соответствии с возрастом. Уменьшение количества нейтрофилов отражает снижение интенсивности воспаления и формирования грануляционной ткани и процессы эпителизации раневой поверхности.

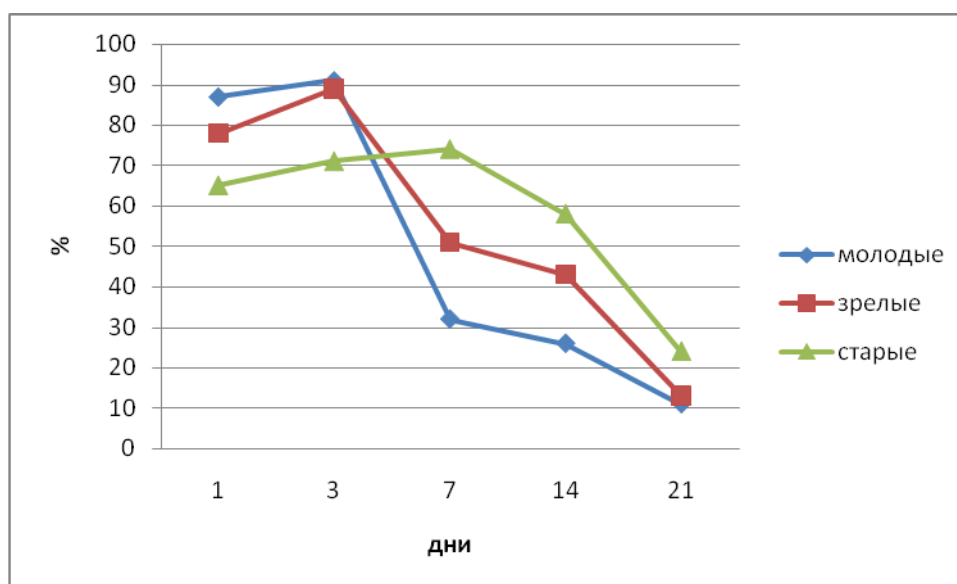


Рис. 7. Динамика изменения процента нейтрофилов на поверхности раны у животных разного возраста при применении стандартного лечения

У крыс старческого возраста отмечается более медленная динамика уменьшения процента нейтрофилов по сравнению с животными предыдущих возрастных групп. Так, рост их количества наблюдается до 7 суток, достигая уровня  $74,8 \pm 0,37$  %. Даже через 14 и 21 сутки после травмы процент данных клеток превышает показатели животных молодого возраста более чем вдвое. Таким образом, наличие высокого уровня нейтрофилов может свидетельствовать о персистирующем воспалении на поверхности раны у животных старческого возраста, что может привести замедлению процессов регенерации.

При применении хитозановой мембраны для лечения кислотной травмы кожи не происходит уменьшение процента нейтрофилов в первые сроки наблюдения по сравнению с контролем. При этом наблюдается изменение динамики их уменьшения в соответствии со сроками наблюдения. Так, у крыс молодого и зрелого возраста не происходит достоверного роста содержания данных клеток на 3 сутки после травмы и более быстрое их уменьшение в другие сроки наблюдения (рис. 8). На 21 сутки после травмы процент нейтрофилов составляет  $8,2 \pm 0,07$  % и  $10,8 \pm 0,09$  %, что достоверно меньше, чем при использовании стандартного лечения.



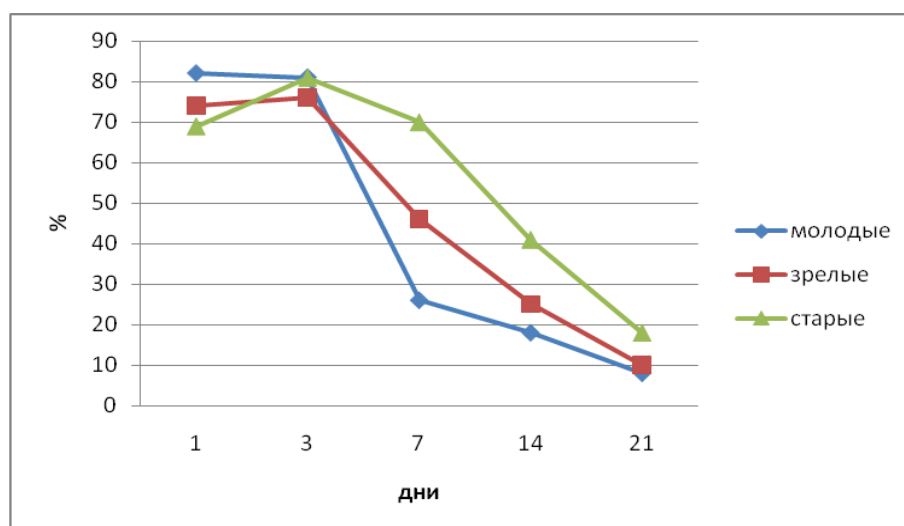


Рис. 8. Динамика изменения процента нейтрофилов на поверхности раны у животных разного возраста при применении хитозановой мембраны

У крыс старческого возраста наблюдается рост процента нейтрофилов только до 3 суток наблюдения с постепенным их уменьшением в другие сроки после травмы. На 21 сутки процент нейтрофилов составляет лишь  $18,2 \pm 0,28$  %, что на  $26,02$  % ( $p \leq 0,05$ ) меньше контроля. В общем, уменьшение процента нейтрофилов при применении хитозановой материала может быть следствием уменьшения микробной нагрузки на рану и активизацией звеньев местного иммунитета.

Содержание лимфоцитов и моноцитов у животных контрольной и экспериментальной серии имеют подобную к нейтрофилам динамику, что свидетельствует об их привлечении в воспалительный процесс в ране. Использование хитозановой мембраны, таким образом уменьшает выраженность воспаления и оказывает стимулирующее влияние на процессы регенерации.

Макрофаги играют основную роль в очистке раны от гнойно-некротической корки и принимают участие в элиминации микроорганизмов и механизмах местной иммунной защиты [11]. Такую же роль играют и полибласты, динамика содержания которых, полностью совпадает с макрофагами. Данные клетки появляются в ране на 3 сутки наблюдения в небольшом количестве во все возрастные периоды, однако их процент у животных старческого возраста почти вдвое меньше (рис. 9).

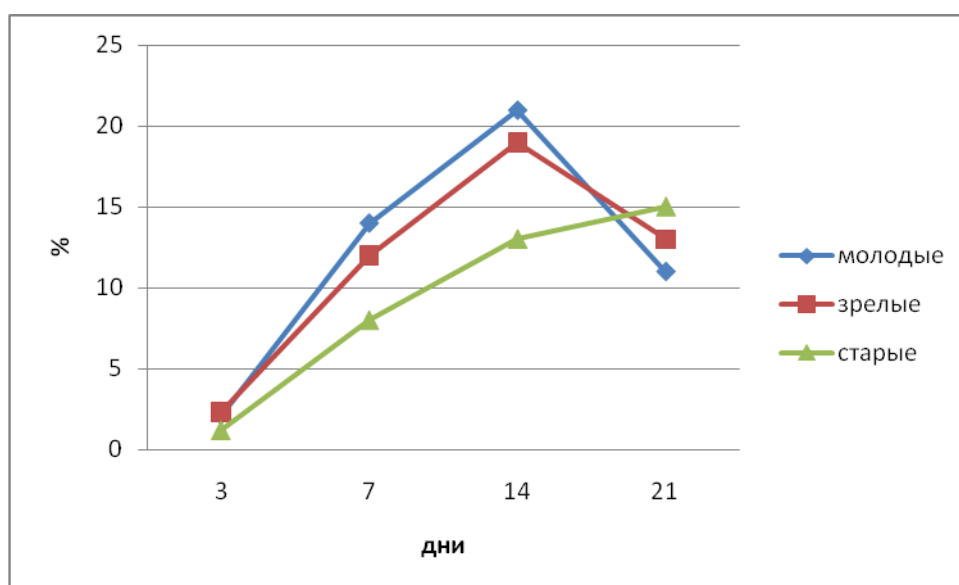


Рис. 9. Динамика изменения процента макрофагов на поверхности раны у животных разного возраста при применении стандартного лечения

С 7 до 14 суток процент фагоцитирующих клеток у животных молодого и зрелого возраста возрастает соответственно до  $21,9 \pm 0,11$  % и  $19,7 \pm 0,17$  % и уменьшается до 2 суток почти вдвое. У животных старческого возраста количество данных клеток постоянно растет, хотя уровень прироста есть незначительный. Рост содержания макрофагов до 21 суток свидетельствует о наличии очагов воспаления и некроза.

Использование хитозана для местного лечения химической травмы приводит к росту содержания макрофагов на поверхности раны. Есть доказательства хемотаксического воздействия продуктов деградации хитозана и хитина в отношении макрофагов в ожоговой ране [10]. Однако, в эксперименте мы получили различную чувствительность данных клеток соответственно возрасту. Как видно из графика, количество макрофагов у животных молодого и зрелого возраста возрастает почти втрое, в то время, как у крыс старческого возраста процент клеток незначительно (рис. 10). В дальнейшем, к 7 дню эксперимента происходит достоверное увеличение процента макрофагов во всех возрастных группах, но прирост клеток в старческих крыс все еще незначителен.

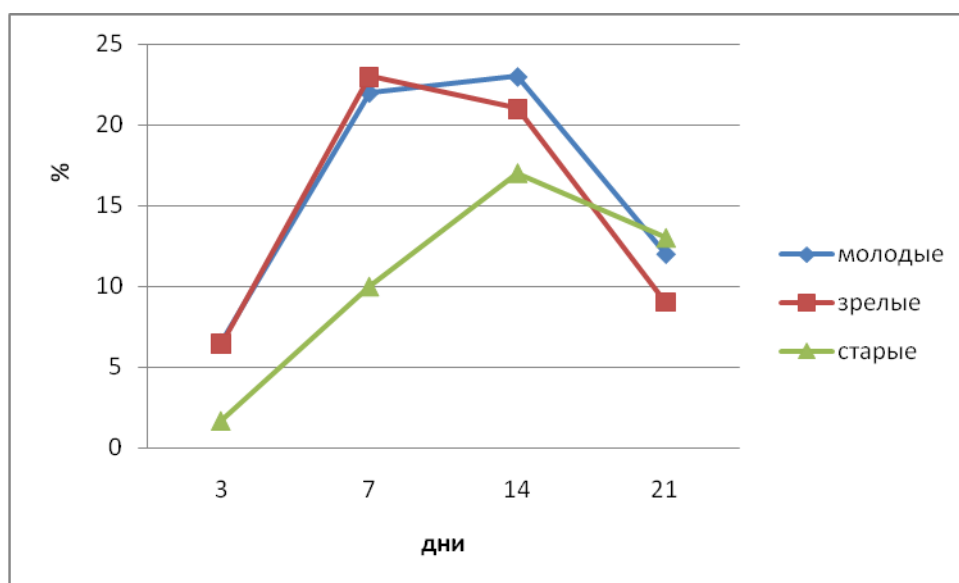


Рис. 10. Динамика изменения процента макрофагов на поверхности раны у животных разного возраста при применении хитозановой мембраны

У животных первых возрастов достоверно происходит рост активности макрофагов и более быстрое очищение раны от некротических масс и микроорганизмов, что проявляется в уменьшении количества фагоцитирующих клеток к 14 дню после травмы с последующим уменьшением их процента соответственно до  $12,6 \pm 0,03$  % и  $9,3 \pm 0,11$  %. У крыс старческого возраста уровень макрофагов уменьшается на 21 сутки, что не наблюдалось в контрольной группе и свидетельствует о росте активности клеток и очищения раны от остатков некротически измененных тканей.

Фибробласты относятся к клеткам, которые способны синтезировать соединительнотканый матрикс, а именно коллагеновые и эластичные волокна. В отпечатках с поверхности ран фибробласты визуализируются с 7 суток наблюдения, хотя развитие грануляционной ткани начинается уже с 3 суток после травмы. Процент фибробластов в ране имеет выраженную зависимость от возраста – наибольшее их количество наблюдается у животных молодого возраста и составляет  $9,2 \pm 0,11$  % от общего количества клеток в мазке. С возрастом происходит уменьшение процента данных клеток в 1,5 раза, достигая  $4,7 \pm 0,10$  % у животных старческого возраста. В дальнейшем наблюдается увеличение процента клеток, уровень которых достигает от  $20,5 \pm 0,29$  % у животных старческого возраста до  $32,9 \pm 0,23$  % – у молодых особей.

При использовании хитозановой мембраны фибробласты проявляются через 3 суток у животных молодого и зрелого возраста, что может свидетельствовать о создании оптимального микроокружения на поверхности раны (рис. 11). Существуют данные о стимуляции миграции фибробластов в культуре при наличии олигомеров хитозана,

образующиеся при его биодegradации [8]. Процент соединительнотканых клеток возрастает у молодых и зрелых животных более чем вдвое через 7 дней после травмы по сравнению с контролем. У животных старческого возраста процент фибробластов возрастает на 54,7 % ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с контролем. Как видно из графика, количество фибробластов возрастает с увеличением срока наблюдения и превышает контроль через 21 сутки соответственно возрасту на 23,76 % ( $p \leq 0,05$ ), 18,54 % ( $p \leq 0,05$ ) и 9,65 % ( $p \leq 0,05$ ).

Количество эндотелиоцитов в мазках с поверхности раны может косвенно свидетельствовать о динамике образования новых сосудов в регенерате кожи. У крыс контрольной группы мы наблюдаем появление данных клеток с 7 суток после травмы. Как и в случае с фибробластами, первые сосуды грануляционной ткани визуализируются на гистологических препаратах, однако эндотелиоциты в мазках обнаруживаются только через неделю. Также наблюдаются возрастные различия, которые заключаются в уменьшении процента клеток с  $2,9 \pm 0,06$  % у молодых животных до  $1,8 \pm 0,06$  % – у крыс старческого возраста. До 21 суток наблюдения количество клеток возрастает незначительно, однако это не может в полной мере свидетельствовать о динамике ангиогенеза, поскольку данный тип клеток не является характерным для раневого содержимого.

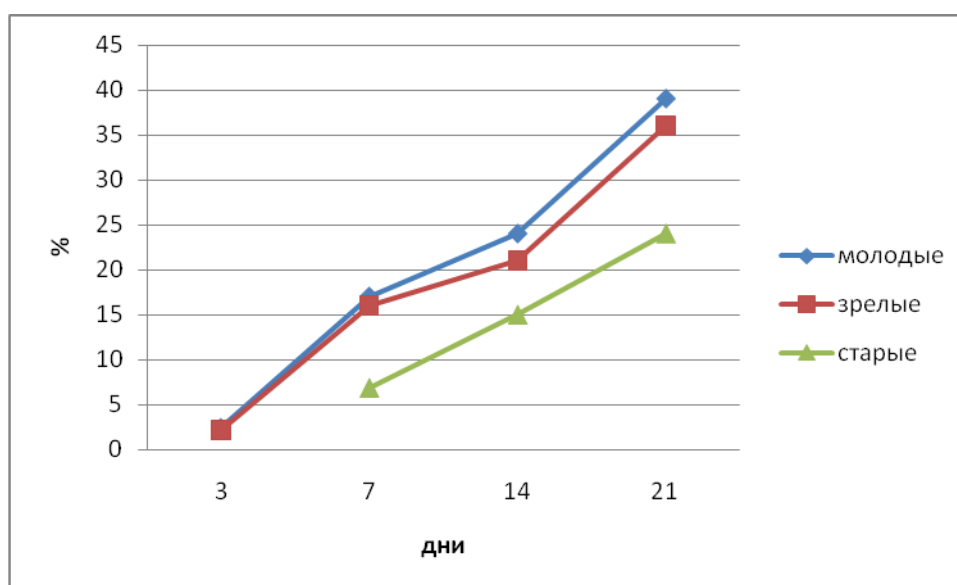


Рис. 11. Динамика изменения процента фибробластов на поверхности раны у животных разного возраста при применении хитозановой мембраны

При использовании хитозана для местного лечения ран мы наблюдаем значительный рост количества эндотелиоцитов в отпечатках с поверхности раны. Более того, клетки данного типа оказываются у животных молодого и зрелого возраста уже на 3 сутки после травмы. Рост количества эндотелиоцитов в мазках может косвенно свидетельствовать о стимулирующие свойства хитозана по отношению к процессам ангиогенеза, что подтверждается данными некоторых исследователей [6]. При этом, как видно из графика (рис. 12), динамика процента клеток у животных старческого возраста значительно отстает от предыдущих возрастных групп, что указывает на уменьшение чувствительности эндотелиоцитов к факторам, которые усиливают ангиогенез. На 21 сутки после травмы процент эндотелиоцитов превышает контроль на 29,73 % ( $p \leq 0,05$ ) у молодых животных, на 27,94 % ( $p \leq 0,05$ ) – в зрелых и на 16,67 % ( $p \leq 0,05$ ) – у крыс старческого возраста.

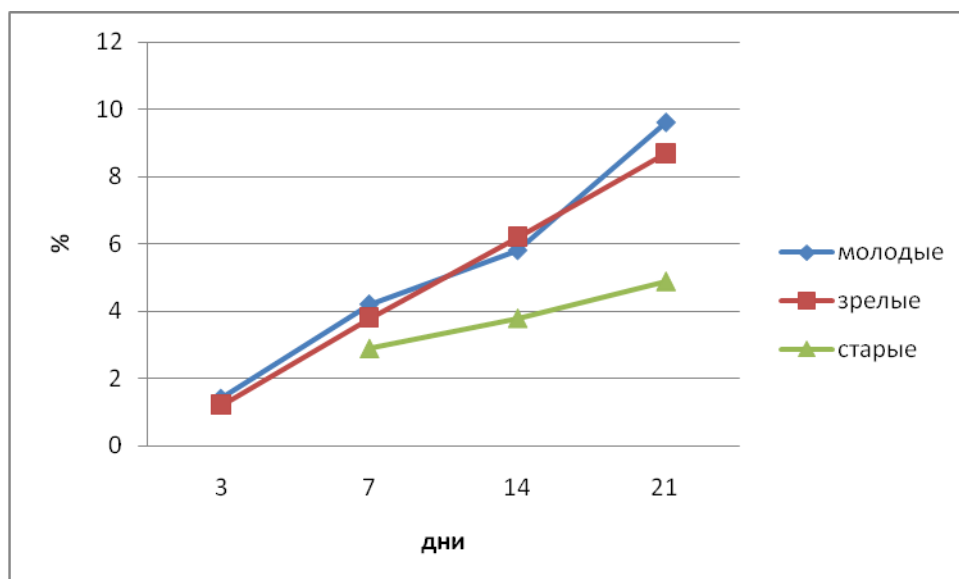


Рис. 12. Динамика изменения процента эндотелиоцитов на поверхности раны у животных разного возраста при применении хитозановой мембраны

К сожалению, объективную оценку количества эпителиоцитов в мазках предоставить трудно, однако у животных молодого и зрелого возраста они начинают формировать пласты уже с 14 дня после травмы, в то время как у крыс старческого возраста - только в последний срок наблюдения. При использовании хитозана мы наблюдаем большее количество клеток в поле зрения и начало формирования групп и пластов эпителиоцитов уже на 14 сутки во все возрастные периоды. Имеются единичные свидетельства стимуляции миграции эпителиоцитов в культуре клеток при наличии хитозана, однако по нашему мнению основной причиной ускорения эпителизации поверхности является комплексное воздействие, которое включает в себя уменьшение воспаления на начальных стадиях регенерации и стимуляция образования межклеточного вещества и сосудов в стадии образования грануляций [3]. Решающим является также факт создания оптимального влажной среды в ране, на что указывают многочисленные исследования [17].

### Выводы

1. Кислотная травма у животных всех возрастных групп приводит к образованию некроза, площадь которого у животных старческого возраста превышает показатель крыс молодого и зрелого возраста на 10,5 % ( $p \leq 0,05$ ) и 6,91 % ( $p \leq 0,05$ ). Происходит формирование лейкоцитарной инфильтрации, морфологическим субстратом которой являются нейтрофилы, изменяющихся лимфоцитами и моноцитами через 7 и 14 дней после травмы. У животных старческого возраста преобладающим компонентом во все сроки наблюдения являются нейтрофилы.

2. С 3-х суток после травмы происходит очищение раны от некроза с участием макрофагов и лейкоцитов, количество и активность которых выше у животных молодого и зрелого возраста. У крыс данных возрастных групп происходит интенсивное образование грануляционной ткани, богатой сосудами и фибробластами, с последующей ее эпителизацией к 21 суткам. У животных старческого возраста в конечный срок наблюдения остаются единичные очаги грануляционной ткани на фоне развития рубцовых изменений.

3. Применение хитозановой мембраны приводит к уменьшению площади дефекта на 21 сутки от 11,32 % ( $p \leq 0,05$ ) у животных старческого возраста до 26,23 % ( $p \leq 0,05$ ) – у молодых крыс. Ускорение заживления кислотного ожога происходит за счет очищения раны от некротических масс и ускорения формирования грануляционной ткани и процессов эпителизации, особенно у животных молодого и зрелого возраста.

4. Использование материала на основе хитозана при кислотном ожоге приводит к уменьшению лейкоцитарной инфильтрации тканей раны, содержание нейтрофилов при этом составляет у животных молодого и зрелого возраста на 21 сутки наблюдения

11,5±0,04 % и 13,4±0,03 % соответственно. У животных всех возрастных групп происходит рост количества макрофагов на ранних этапах заживления дефекта и фибробластов и эпителиоцитов, начиная с 7 суток наблюдения, что является предпосылкой ускорения регенераторных процессов.

### References:

1. Beta-chitin-based wound dressing containing silver sulfurdiazine / Y.M. Lee, S.S. Kim, M.H. Park et al. // *J Mater Sci Mater Med*. 2000. V. 11. P. 817–23.
2. Biological properties of the chitosan-gelatin sponge wound dressing / Chun-Mei Deng, Lan-Zhen He, Ming Zhao et al. // *Carbohydrate Polymers*. 2007.V. 69. P. 583–589.
3. Changes in cellular motility and cytoskeletal actin in fibroblasts from patients with chronic venous insufficiency and in neonatal fibroblasts in the presence of chronic wound fluid // J.D. Raffetto, M.V. Mendez, B.J. Marien et al. // *J. Vasc Surg*. 2001. V. 33. P. 1233–41.
4. Characterization and ornidazole release in vitro of a novel composite film prepared with chitosan/poly(vinyl alcohol)/alginate / H.N. Pei, X.G. Chen, Ю Li et al. // *J Biomed Mater Res*. 2008. V. 85A. P. 566–72.
5. Chitosan membrane as a wound-healing dressing: characterization and clinical application / A.K. Azad, N. Sermsintham, S. Chandkrachang et al. // *J Biomed Mater Res Appl Biomater*. 2004. V. 69B. P. 216–22.
6. Chitosan-hyaluronic acid hybrid film as a novel wound dressing: in vitro and in vivo studies / H. Xu, L. Ma, H. Shi et al. // *Polym Adv Technol*. 2007. V. 18. P. 869–75.
7. Cho Y W. Water-soluble chitin as a wound healing accelerator / Y.W. Cho, Y.N. Cho, S.H. Chung et al. // *Biomaterials*. 1999. V. 20. P. 2139–45.
8. Cultured fibroblasts from chronic diabetic wounds on the lower extremity (non–insulin-dependent diabetes mellitus) show disturbed proliferation / M.A. Loots, E.N. Lamme, J.R. Mekkes et al. // *Arch Dermatol Res*. 1999. V. 291. P. 93–9.
9. Gel characterization and in vivo evaluation of minocycline-loaded wound dressing with enhanced wound healing using polyvinyl alcohol and chitosan / J.H. Sung, M.R. Hwang, J.O. Kim et al. // *Int J Pharm*. 2010. V. 392 P. 232–40.
10. Effect of chitosan film containing basic fibroblast growth factor on wound healing in genetically diabetic mice / K. Mizuno, K. Yamamura, K. Yano et al. // *Biomed Mater Res*. 2003. V. 64A. P. 177–81.
11. Norfloxacin-loaded chitosan sponges as wound dressing material / E.B. Denkbas, E. Ozturk, Nю Ozdem et al. // *J Biomater Appl* 2004. V. 18. P. 291–303.
12. Han S.S. Topical formulations of water-soluble chitin as a wound healing assistant evaluation on open wounds using a rabbit ear model / S.S. Han // *Fibers Polym*. 2005. V. 6. P. 219–23.
13. In vitro degradation behavior of freeze-dried carboxymethyl-chitin sponges processed by vacuum-heating and gamma irradiation / K. Muramatsu, S. Masuda, Y. Yoshihara et al. // *Polym Deg Stab*. 2003. V. 81. P. 327–32.
14. Ovington L.G. Wound care products: how to choose / L.G. Ovington // *Adv Skin Wound Care*. 2001. V. 14. P. 259–64.
15. Preparation of chitosan and its study on medicament / Lai, ling-yan, Suyuan-fen et al. // *Journal of Chinese Biochemical Drug*. 1999. V. 20(4). P. 204–205.
16. Single step electrospinning of chitosan/poly(caprolactone) nanofibers using formic acid/acetone solvent mixture / K.T. Shalumon, K.H. Anulekha, C.M. Girish et al. // *Carbohydr polym*. 2010. V. 80. P. 413–9.
17. Water absorbing and antibacterial properties of N-isopropyl acrylamide grafted and collagen/chitosan immobilized polypropylene nonwoven fabric and its application on wound healing enhancement / C.C. Wang, C.H. Su, C.C. Chen // *Biomed Mater Res*. 2008. V. 84A. P. 1006–17.

УДК 616

### **Использование хитозановой мембраны для лечения ран химической жтиологии**

Юлия Александровна Ткаченко

Сумский государственный университет, Украина  
40007, Сумы, ул. Р.-Корсакова, 2  
E-mail: pogorelov\_max@mail.ru

**Аннотация.** Заживление дефекта кожи любой этиологии проходит несколько стадий, которые завершаются или полным восстановлением утраченного покрова, или формированием рубцовой ткани, которая покрывает место травмы. Стадийность течения регенерации кожи имеет зависимости от вида травмы, сопутствующих повреждений, имеющихся болезней, таких как сахарный диабет, ожирение, иммунодефицитные состояния, в том числе и СПИД. На сегодня в арсенале врачей имеется целый спектр материалов – от ксенокожи до материалов, созданных по технологии тканевой инженерии. Однако отсутствует универсальная повязка, которая удовлетворяет врача и пациента по эффективности и фармако-экономическим показателями [14]. Поэтому разработка новых средств местного лечения повреждений кожи является актуальной медико-биологической проблемой.

**Цель работы.** Выявить особенности течения процесса регенерации кожи после химического ожога при применении хитозановых мембран

Нами проведен эксперимент на 180 лабораторных крысах самцах трех возрастных групп. Всем животным моделировали химический ожог IIIa степени в межлопаточной области. Животным контрольной серии проводили стандартное лечение химических ожогов с применением стерильных марлевых повязок, которые меняли ежедневно. Экспериментальной серии животных для лечения повреждений кожи использовали гидрогель хитозана, который накладывали на поврежденные участки с заменой пленки 1 раз в день.

В результате применения хитозановых повязок наблюдалось ускоренное очищение поверхности раны от некроза у животных молодого и зрелого возраста и полная эпителизация раны к 21 дню наблюдения. Цитологическое исследование показало снижение количество воспалительных клеток на поверхности раны и рост количества макрофагов и фибробластов. Данные изменения имели выраженный возрастной характер и более выраженный эффект у животных молодого и зрелого возраста.

**Ключевые слова:** хитозановая мембрана; рана; химическая жтиология.