

УДК 616.5-001.4—021.4-003.9.02:615.31:547.962.9

МОРФОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОРЕГЕНЕРАТОРНОГО ЭФФЕКТА ОДНОПРОЦЕНТНОГО РАСТВОРА ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В МОДЕЛИ ОСТРОЙ РАНЫ С ЦЕЛЬЮ ОБОСНОВАНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В ЛЕЧЕНИИ ОСТРЫХ ДЕФЕКТОВ КОЖИ ПРИ РОЖЕ

Климук С. А.¹, Жаворонок И. П.²

¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь;

²Государственное научное учреждение «Институт физиологии НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Для оценки динамики влияния введения гиалуроновой, немодифицированной и модифицированной, в модели экспериментального кожного дефекта (раны) выполнено экспериментальное исследование на 40 крысах линии Wistar, включавшее отработку модели кожной раны и влияние на ее заживление трех типов 1%-й раствор гиалуроновой кислоты с молекулярной массой 300–500 кДА. По данным морфометрического анализа, выполненного в трех временных точках, при ежедневном применении немодифицированной и модифицированной световым потоком гиалуроновой кислоты с экспериментальными ранами было доказано выраженное стимулирующее действие раствора в отношении заживления экспериментальных дефектов, наиболее значимое при применении модифицированной гиалуроновой кислоты. Таким образом, свойства гиалуроновой кислоты как симулятора репарации были подтверждены в экспериментальной модели раны.

Ключевые слова: рожа, модель острой раны, морфометрия, гиалуроновая кислота.

Введение. Кожа является одним из наиболее быстро обновляемых типов ткани в организме человека. Это свойство непосредственно обусловлено барьерной функцией: чем быстрее эпителизируется острый дефект кожи, независимо от причины его появления (инфекционная деструкция, травма, острое нарушение трофики), тем быстрее восстановится здоровье пациента в целом, потому важна разработка средств и методик ускорения эпителизации острой раны, направленная на предотвращение появления хронических дефектов, сокращение сроков пребывания на листе нетрудоспособности и сохранения качества жизни. Одним из многообещающих средств для стимуляции репарации является гиалуроновая кислота (ГК). ГК — основной компонент внеклеточного матрикса, который обеспечивает регуляцию всех фаз восстановления поврежденных тканей, включая миграцию клеток, воспаление, ангиогенез, ремоделирование и образование рубцов [1]. Установлено, что высокомолеку-

лярная ГК (ВМ ГК) обладает противовоспалительным действием, в то время как низкомолекулярная ГК (НМ ГК) обуславливает провоспалительные эффекты [2]. И в то же время НМ ГК, стимулируя генерацию целого комплекса факторов воспаления, одновременно способствует экспрессии гиалуронат-синтазы, что ведет к накоплению в очаге повреждения ВМ ГК [3]. ГК также представляет собой резервуар факторов роста, что связано с ее способностью поглощать воду, тем самым поддерживать влажность раны и ограничивать клеточную адгезию к молекулам внеклеточного матрикса. Кроме того, есть данные о том, что продукты разложения ГК являются проангиогенными [4]. Таким образом, влияние препаратов ГК на заживление острой и хронической раны, в том числе при роже, особенно у пациентов с длительно протекающей и/или осложненной рожой при истощении репаративных способностей организма, биологически обосновано. Тем не менее, в доступной научной

литературе данных о препаратах ГК, которые бы применялись при роже, нет. Нет и информации о возможных модификациях низкомолекулярной ГК, в том числе световым потоком. Проблемой является и сама доступность таких препаратов ГК: их применение ограничено либо высокой стоимостью, либо отсутствием в аптечной сети составов и форм, предназначенных для тканевой терапии, а не для ортопедических показаний (внутрисуставное введение). Появление в Республике Беларусь препарата отечественного производства, лицензированного для применения в мягких тканях, представляется перспективным с точки зрения применения при лечении острых раневых дефектов, в том числе развивающихся в исходе деструктивных форм рожи (ДФР).

Цель работы — оценить динамику влияния наппажного введения среднемолекулярной ГК, стандартной и модифицированной, в модели экспериментального кожного дефекта (раны).

В соответствии с целью исследования в работе поставлены следующие задачи:

1. Создать и отработать модель острой раны на стандартной лабораторной системе (крыса).

2. Изучить динамику изменения состояния раны по ходу времени в условиях применения немодифицированного 1%-го раствора гиалуроновой кислоты.

3. Изучить динамику изменения состояния раны по ходу времени в условиях применения модифицированного по двум методикам 1%-го раствора гиалуроновой кислоты (поисковая задача).

Материалы и методы. Исследование с использованием экспериментальной модели раны выполнено на 40 крысах-самках линии Wistar, одного возраста и массой 200–250 г. в 2019 г. на базе вивария ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси». Все работы с экспериментальными животными выполнены с соблюдением законодательства, принципов биоэтики и в соответствии с международными стандартами качества планирования и проведения исследований на животных (Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей; Страсбург, 1986–1998) [5]. Кожные раны у животных моделировали под наркозом (тио-

пентал натрия). После исчезновения реакции на болевой и сильный звуковой стимулы у экспериментальных животных выбривали участок кожи размером $\sim 3 \times 3$ см на шейно-воротниковой зоне и ниже, на верхней части спины. Рану наносили путем вырезания полнослойного участка кожи (удаляя также подкожную клетчатку). Для обозначения места и формы раны использовали специальный трафарет (пластинка овальной формы площадью ~ 2 см²) [6].

Итоговая модель была разработана и применена впервые.

Целесообразность выбора модели для оценки прорегенераторного эффекта ГК при ДФР обоснована следующими факторами:

- не существует приемлемой модели острой раны, инфицированной стрептококком, ввиду плохой прививаемости клинически выделяемых штаммов стрептококка и их низкой вирулентности для лабораторных животных; применение же библиотечных штаммов не позволяет полноценно моделировать течение деструктивной рожи (буллезной, флегмонозной, некротической, геморрагической);

- применение прорегенераторных средств в ране с активной инфекцией до начала стихания инфекционного процесса биологически нецелесообразно ввиду высокого риска микробной деструкции местно применяемого средства за счет микробных ферментов;

- целевым показателем был прорегенераторный, но не противовоспалительный эффект ГК.

Тестируемые препараты. В ходе экспериментов ранозаживляющее действие оценивали после ежедневных (на следующие сутки после операции и до полного восстановления эпидермиса) внутрикожных инъекций 1%-го раствора гиалуроновой кислоты производства Республики Беларусь. В исследовании применялся нативный (стандартная гиалуроновая кислота, СГК) и модифицированный световым потоком препарат при разной экспозиции модифицирующего фактора (ноу-хау производителя) — по 1-й методике (МГК-1) и 2-й методике (МГК-2). Препараты вводили по периметру поврежденных участков кожи, начиная с первых суток после операции и до полного восстановления эпителия по наппажной методике. Модифи-

пированные по методикам фирмы-производителя препараты ГК предоставлялись в подготовленном виде.

Забор материала для гистологического исследования для оценки особенностей репаративной регенерации в различные фазы раневого процесса осуществляли на 14, 18 и 31-е сутки.

Исследование микропрепаратов и изготовление микрофотографий проводили с помощью светового микроскопа Optec BK 5000 с цифровой камерой (Optec, Китай) с использованием увеличений $\times 40$, $\times 100$. С помощью окраски гематоксилин и эозином определяли общую гистологическую картину и оценивали структурные изменения кожи (состояние эпидермиса и дермы).

Морфометрическое исследование. Для оценки восстановления экспериментальных кожных ран также проводили морфометрический анализ и оценивали толщину грануляционной/рубцовой ткани и толщину регенерирующего эпидермиса с помощью морфометрической программы ImageJ (США) и ее приложения Straight. Среднюю толщину грануляционной ткани/рубца в исследуемых препаратах определяли путем подсчета средней величины толщины новообразованной соединительной ткани, расположенной между краями ран на микрофотографиях, сделанных при увеличении микроскопа $\times 100$. Для характеристики регенерирующего эпидермиса проводили оценку его средней толщины до рогового слоя в областях, расположенных рядом с границами раневого дефекта и над ним на микрофотографиях, сделанных при увеличении микроскопа $\times 100$. Полуколичественно (в баллах) оценивали следующие показатели: альтерацию (дистрофические и некротические изменения клеток; деструкция коллагеновых волокон; незаращение раневой щели); воспаление (микроциркуляторные нарушения; воспалительная инфильтрация; отек; ранние репаративные признаки (полнота эпителизации; пролиферация фибробластов; неоангиогенез); поздние репаративные признаки (дифференцировка эпителия; фиброгенез коллагена; зрелость рубцовой ткани; прямая форма рубца). Выраженность признаков оценивали по пятибалльной шкале: 0 — отсутствие признака; 1 — слабо выраженный признак, 2 — умеренно выраженный признак,

3 — хорошо выраженный признак, 4 — максимально выраженный признак для данной группы опытов [7].

Согласно запланированным задачам научного исследования животные были разделены на 4 группы ($n = 32$, по 8 животных в каждой экспериментальной группе + 8 животных для исследования структуры интактной кожи):

1-я — контрольная группа, формирование асептических ран без обработки ГК (ложно оперированные животные);

2-я — животные, экспериментальные раны которых обрабатывали наппажным методом немодифицированной ГК (стандартная, гиалуроновая кислота, СГК);

3-я — животные, экспериментальные раны которых обрабатывали наппажным методом препаратом ГК, модифицированным по методике фирмы-производителя первым способом (ноу-хау производителя) (МГК-1);

4-я — животные, экспериментальные раны которых обрабатывали наппажным методом препаратом ГК, модифицированным по методике фирмы-производителя вторым способом (ноу-хау производителя) (МГК-2).

Отдельно в качестве эталона для описания морфологических изменений выполнено морфологическое исследование кожи 8 здоровых крыс той же линии, содержащейся в аналогичных описанных выше условиях.

Морфология ран оценивалась на 14, 18 и 31-е сутки. Оценку ранозаживляющего действия проводили путем анализа времени образования и полного отторжения первичного струпа, его состояния и цвета, фиксации к подлежащим тканям, наличия нагноений, наличия или отсутствия вторичного инфицирования, динамики и времени полного заращения краев раны. Мониторинг и оценку репаративных процессов проводили ежедневно до полного заживления ран.

Анализ данных выполняли с использованием стандартных пакетов прикладных программ Microsoft Excel с определением среднего арифметического значения и его стандартной ошибки $M \pm m$. Проверка на нормальность распределения количественных показателей осуществлялась по критерию Шапиро — Уилка. Для сравнительного

анализа количественных переменных применяли t-критерий Стьюдента. В процессе обработки данных вывод о статистической значимости делали при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Заживление ран оперированных животных групп 1–4 происходило первичным натяжением, от краев к центру, за счет заполнения дефекта грануляционной тканью с последующей частичной эпителизацией и рубцеванием. На 1–2-е сутки после операции отмечали отечность краев ран и умеренную болезненность при надавливании. Первичная корка на начальных этапах была тонкой и легко травмируемой. Спустя несколько дней она становилась плотнее, имела красно-коричневую окраску и неровную, шероховатую поверхность. В среднем на 6–8-е сутки происходило отторжение первичного струпа, при этом площадь и периметр ран значительно сокращались.

Установлено, что средняя продолжительность заживления раны в контрольной группе 1 составила $21,3 \pm 1,4$ суток.

Ежедневные аппажные инъекции ГК по периметру раневой поверхности в группе немодифицированной ГК (2-я группа) достоверно сокращали сроки восстановления поврежденных тканей (сред-

няя продолжительность заживления ран $17,1 \pm 0,9$ суток).

Средняя продолжительность заживления раны в группе МГК-1 составила $17,7 \pm 0,9$ суток.

Средняя продолжительность заживления раны в группе МГК-2 составила $15,5 \pm 1,5$ суток.

Динамика заживления ран была нелинейной. Уменьшение размера ран за сутки в первые 6 дней составляло в среднем 8–15 % для всех экспериментальных животных. Затем скорость репарации возрастала до 25–40 % (7–9-е сутки). Начиная с 10 суток (период отторжения струпа у большинства экспериментальных животных) процесс заживления замедлялся до 1,0–2,5 % за сутки. Окончательное заживление (формирование рубца) происходило спустя еще 4–10 суток.

К 31-м суткам во всех экспериментальных группах на месте ран наблюдался шерстяной покров, в группе с самостоятельным заживлением — частично.

Морфометрический сравнительный анализ состояния ран на 14-е и 18-е сутки. Результаты морфометрического исследования и балльной оценки морфологических признаков на 14-е сутки представлены по каждой группе в сводной таблице 1.

Таблица 1 — Сводная оценка морфологических признаков и морфометрических показателей у животных по всем группам на 14-е сутки

Морфологические признаки и морфометрические показатели	Контрольная группа	Группа СГК	Группа МГК-1	Группа МГК-2
Альтерация (сумма баллов)	0	0	0	0
1.1. Дистрофические и некротические изменения клеток	0	0	0	0
1.2. Деструкция коллагеновых волокон	0	0	0	0
1.3. Деструкция мышечных волокон	0	0	0	0
1.4. Незаращение раневой щели	0	0	0	0
Воспаление (сумма баллов)	2	2	0	0
2.1. Микроциркуляторные нарушения	1	1	0	0
2.2. Воспалительная инфильтрация	1	1	0	0
2.3. Отек	0	0	0	0
Ранние репаративные признаки (сумма баллов)	8	8	7	7
3.1. Полнота эпителизации	3	3	3	3
3.2. Проплиферация фибробластов	3	3	3	3
3.3. Неоангиогенез	2	2	1	1

Окончание табл. 1

Морфологические признаки и морфометрические показатели	Контрольная группа	Группа СГК	Группа МГК-1	Группа МГК-2
Поздние репаративные признаки (сумма баллов)	5	8	9	10
4.1. Дифференцировка эпителия	2	3	3	3
4.2. Фиброгенез коллагена	2	2	3	3
4.3. Зрелость рубцовой ткани	1	2	2	2
4.4. Прямая форма рубца	0	1	1	2
Индекс созревания рубца (соотношение суммы пункта 4 к сумме пункта 3)	0,625	1	1,286	1,429
Морфометрические показатели	80,05 ± 3,4	69,0 ± 3,0*	69,9 ± 4,8*	55,3 ± 3,9*
5.1. Толщина эпидермиса				
5.2. Толщина соединительной/ рубцовой ткани	683,33 ± 33,3	552,8 ± 27,7* [#]	521,9 ± 45,1 [#]	634,5 ± 18,1 [#]

* Изменения статистически значимо отличаются по сравнению с контрольной группой.

[#] Значения статистически значимо отличаются в экспериментальных группах (для толщины соединительнотканного компонента составила $p = 0,02$, для эпидермиса изменения статистически незначимы $p = 1,0$; величины представлены как $M \pm m$ — среднее +/- ст. ошибка среднего).

Результаты морфометрического исследования и бальной оценки морфологических признаков на 18-е сутки представлены по каждой группе в сводной таблице 2.

Таблица 2 — Сводная оценка морфологических признаков и морфометрических показателей у животных по всем группам на 18-е сутки

Морфологические признаки и морфометрические показатели	Контрольная группа	Группа СГК	Группа МГК-1	Группа МГК-2
Альтерация (сумма баллов)	0	0	0	0
1.1. Дистрофические и некротические изменения клеток	0	0	0	0
1.2. Деструкция коллагеновых волокон	0	0	0	0
1.3. Деструкция мышечных волокон	0	0	0	0
1.4. Незаращение раневой щели	0	0	0	0
Воспаление (сумма баллов)	3	2	0	0
2.1. Микроциркуляторные нарушения	2	1	0	0
2.2. Воспалительная инфильтрация	1	1	0	0
2.3. Отек	0	0	0	0
Ранние репаративные признаки (сумма баллов)	8	7	6	5
3.1. Полнота эпителизации	4	4	4	4
3.2. Пролиферация фибробластов	3	2	2	1
3.3. Неоангиогенез	1	1	0	0
Поздние репаративные признаки (сумма баллов)	11	12	13	14
4.1. Дифференцировка эпителия	4	4	4	4
4.2. Фиброгенез коллагена	2	3	3	3
4.3. Зрелость рубцовой ткани	2	2	3	3
4.4. Прямая форма рубца	3	3	3	4

Окончание табл. 2

Морфологические признаки и морфометрические показатели	Контрольная группа	Группа SGK	Группа МГК-1	Группа МГК-2
Индекс созревания рубца (соотношение суммы пункта 4 к сумме пункта 3)	1,375	1,714	2,167	2,8
Морфометрические показатели				
5.1. Толщина эпидермиса	86,3 ± 2,3	60,5 ± 2,1*,#	55,0 ± 2,9*,#	40,5 ± 1,6*,#
5.2. Толщина соединительной/рубцовой ткани	790,1 ± 22,3	552,6 ± 10,4*,#	528,4 ± 9,7*,#	398,8 ± 17,4*,#

* Изменения статистически значимо отличаются по сравнению с контрольной группой.

Значения статистически значимо отличаются в экспериментальных группах (величины представлены как $M \pm m$ — среднее +/- ст. ошибка среднего).

На 14-е сутки в контрольной группе эпидермис остается незрелым, с частичной десквамацией. В группе SGK в те же сроки отмечается более полноценное восстановление как структуры, так и функции покровных тканей. В группе МГК-1 эта тенденция еще более выражена и состоит в формировании полноценного недеформированного эпидермиса с некоторой гипертрофией его (по данным морфометрии). В группе МГК-2 при всех тех же признаках более быстрого созревания покровных тканей и наличия полной эпителизации была полностью восстановлена структура эпидермиса с признаками подавления митотической активности (что свидетельствует о завершении активного регенераторного этапа).

На 18-е сутки отмеченные различия между группами углубляются. Так, в контрольной группе еще не выявляется микро-

рельеф эпидермиса. В группе SGK отмечается начало формирования микрорельефа, снижения митотической активности кератиноцитов, уменьшение количества сосудов. В группе МГК-1 уже заканчивается дифференцировка эпидермиса. В группе МГК-2 регенераторный этап, по данным морфологии, завершен.

К 31 суткам в контрольной группе волосяной покров восстановился в зоне раны лишь частично, в группах ГК — полностью. В группе SGK помимо волос в центральной части отмечено формирование дериватов кожи, на периферии сальные и потовые железы уже сформированы. Подобные же изменения отмечены и в группе МГК-1. В группе МГК-2 зрелые дериваты кожи отмечены и в центральной зоне дефекта, микрорельеф эпидермиса приобретает типичный вид (таблица 3).

Таблица 3 — Толщина эпидермиса в подгруппах на 31-е сутки, мкм ($M \pm m$)

Норма (интактная кожа)	Контроль (ложнооперированные животные)	SGK	МГК-1	МГК-2
15,9 ± 0,8	26,3 ± 1,5*	24,6 ± 1,3*,#	21,1 ± 3,3*,#	16,9 ± 0,5#

* Различия с интактной кожей статистически значимы; # различия с контрольной группой статистически значимы.

При сравнительной морфометрии установлено, что в группах SGK, МГК-1 и МГК-2 морфометрические показатели значимо отличаются в обеих временных точках (14-е и 18-е сутки) в пользу более раннего разрешения воспаления при применении как нативной ГК, так и ее модифицированного препарата.

Заключение. Таким образом, в результате динамического контроля за течением раневого процесса и оценки восстановления поврежденной ткани посредством гистологического и морфометрического анализа при ежедневном применении как интактной ГК, так и препаратов модифицированной световым потоком ГК у животных с асепти-

ческими экспериментальными ранами было установлено, что исследуемые препараты оказывают стимулирующее действие на репаративные процессы при асептических раневых дефектах кожи.

Наиболее выраженное и полное восстановление поврежденных кожных покровов

происходит при применении ГК, модифицированной по второй методике.

Выбор в качестве препарата регенераторной направленности гиалуроновой кислоты отвечает требованиям протокола исследования у человека и пригодно для стимуляции репарации в ранах при ДФР.

Список цитированных источников

1. Chen, C. P. Effectiveness of hyaluronic acid for treating diabetic foot: a systematic review and meta-analysis / C. P. Chen, W. Hung, S. H. Lin // *Dermatologic Therapy*. — 2014. — Vol. 27, № 6. — P. 331–336.
2. Малей, М. Эффективность гиалуроновой кислоты в лечении синдрома диабетической стопы / М. Малей // *Практична ангиология*. — 2016. — № 2 (73). — С. 41–43.
3. Hyaluronan reduces inflammation in experimental arthritis by modulating TLR-2 and TLR-4 cartilage expression. *Biochim Biophys Acta (BBA)* / G. M. Campo [et al.] // *Molecular Basis of Disease*. — 2011. — № 1812 (9). — P. 1170–1181.
4. Evaluation of the physical and biological properties of hyaluronan and hyaluronan fragments / E. L. Ferguson [et al.] // *Int J. Pharm.* — 2011, Aug. — № 420 (1). — P. 84–92. — DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.08.031.
5. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. — Strasbourg, 1986. — 52 p.
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А. Н. Мионов [и др.]. — М. : Гриф и К, 2012. — 944 с.
7. Теоретические и практические аспекты заживления ран : монография / М. П. Толстых [и др.] ; под ред. А. М. Свитухина. — М. : Дипак. — 2007. — 96 с.

Morphometric study of the pro-regenerator effect of 1 % hyaluronic acid solution in a model of acute wounds to justify the application of hyaluronic acid in the treatment of acute skin defects in erysipelas

Klimuk S. A.¹, Zhavoronok I. P.²

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;

²Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

To assess the dynamics of the effect of administration of non-modified and modified hyaluronic acid in the model of an experimental skin defect (wound), an experimental study on 40 Wistar rats was performed, including creation of skin wound model, and the effect of three types of 1 % hyaluronic acid with a molecular weight of 300–500 kDa was investigated. According to the morphometric analysis performed at three time points, with daily use of unmodified and light-modified hyaluronic acid in experimental wounds, a pronounced stimulating effect of the solution on the healing of experimental defects was proved, the most significant for modified hyaluronic acid. Thus, the properties of hyaluronic acid as a repair simulator were confirmed in an experimental wound model.

Keywords: erysipelas, acute wound model, morphometry, hyaluronic acid.

Поступила 19.06.2023