

На правах рукописи

Казанбаев Ринат Тагирович

**ОПТИМАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СОЕДИНЕНИЙ
ХИТОЗАНА В ЛЕЧЕНИИ КОНТАКТНОГО АЛЛЕРГИЧЕСКОГО
ДЕРМАТИТА, ВЫЗВАННОГО ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ).**

14.01.10 – кожные и венерические болезни

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук.

Красноярск – 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Карачева Юлия Викторовна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Зуев Андрей Викторович

(Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, медицинский институт, профессор кафедры терапии, г. Калининград)

доктор медицинских наук, доцент

Дмитрук Вадим Степанович

(Сибирский государственный медицинский университет, профессор дерматовенерологии и косметологии, г. Томск)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Барнаул

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2019 г. в «_____» часов на заседании диссертационного совета Д 208.062.06 на базе Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52 тел.: (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52; <http://ngmu.ru/dissertation/471>)

Автореферат разослан «_____» _____ 2019 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

Т. Б. Решетникова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы. Во всем мире контактный аллергический дерматит (КАД) – одно из распространенных заболеваний в дерматологической практике. По данным разных авторов, этот вид патологии встречается у 2–2,5 % населения Земного шара (Опарин А. Б., 2010; Duarte I., Rotter A., Lazzarini R. 2010; Mohamoud A. A., 2017). На территории Красноярского края за период 2011 по 2017 гг. в структуре дерматологической заболеваемости контактный аллергический дерматит составил 14,7 % от всей кожной патологии. Общая заболеваемость контактным аллергическим дерматитом за исследуемый период увеличилась на 20,2 %, что связано с большим количеством химических веществ, используемых в быту и на производстве [Веселова Л. В. и соавт., 2007; Crowson A., Margo C., 1999; Schafer T. et al., 2001]. У 18 % больных КАД клинические проявления трансформируются в истинную экзему. Наиболее часто встречающиеся этиологические факторы контактного аллергического дерматита и контактной экземы являются: никеля сульфат (41,4 %), кобальта хлорид (20,3 %), калия дихромат (10,0 %), смесь ароматизирующих веществ и тиомерсал (6,8 %), ланолин (5,6 %), производные тиурама (5,2 %), смесь карбоматов (4,4 %) [Лусс Л. В. и соавт., 2008; Степанова Е. В., 2009; Мокроносова М. А., 2010].

Исследования проницаемости кожи для химических соединений, особенно содержащих металлы, пути проникновения веществ через эпидермальный и дермальный слои, особенности распределения в этих слоях, пути и механизмы эвакуации металлов являются предметом первоочередных задач в дерматологии. Большинство авторов указывает на недостаточность разработок этих задач, несмотря на публикации обобщающих работ [Ахметов Л. И. и соавт., 2010; Дзугкоева Ф. С. и соавт., 2009; Выштакалюк А. Б. и соавт., 2006].

Время кумулирования и полувыведения металлов играет важную роль в развитии реакции гиперчувствительности замедленного типа, прижизненный контроль этих характеристик в коже дает в руки исследователей возможности регуляции этих процессов и сокращения времени выведения [Гущин И. С., 2007; Schwarz T., 2003]. На данный момент уже достоверно установлено, что скорость эвакуации металлов из кожи различна и зависит, главным образом, не от атомной массы и радиуса электронной оболочки, величины потенциала

электроотрицательности, а от способности вступать в связь с белковыми коллоидами [Divkovic M., 2003; Бондаренко Д. А., 2010].

Степень разработанности темы диссертации. В последнее время широко стали изучаться свойства и перспективы применения природных биополимеров хитина и хитозана [Погарская Н. В., 2010; Плевака А. В., 2009; Masuoka K., 2005].

Хитозан, хитин и их производные образуют прочные хелатные связи с металлами, вследствие чего селективно извлекают ионы ртути, кобальта, хрома, никеля, золота, серебра, иридия, палладия, свинца, кадмия, железа и других металлов из сточных вод, солевых растворов и морской воды [Герасименко Д. В., 2005; Енгибарян Л. Г., 2004; Wan Ngah W. S., 2002]. Низкая токсичность хитина и хитозана позволяет использовать их в медицине для получения различных медицинских препаратов с пролонгированным действием [Tamer T. M., 2017; Ahsan S. M., Thomas M., 2018].

Дальнейшее изучение свойств хитозана представляет значительный интерес и является перспективным в разработке эффективных методов лечения контактного аллергического дерматита путем применения соединений хитозана.

Цель исследования. Установить влияние соединений хитозана на элиминацию никеля, кобальта и хрома из кожи лабораторных животных на экспериментальной модели аллергического дерматита при воздействии аппаратного инфракрасного излучения и ультразвука.

Задачи исследования

1. Исследовать формирование контактной гиперчувствительности у экспериментальных животных при моделировании контактного аллергического дерматита, вызванного солями никеля, кобальта и хрома. Провести сравнительную оценку клинических и патоморфологических изменений кожи у лабораторных животных.

2. Установить кинетику водорастворимого хитозана в коже экспериментальных животных методом люминесцентной микроскопии.

3. Определить методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии концентрацию тяжелых металлов в коже лабораторных животных при использовании различных методик применения соединений хитозана.

4. Оценить абсорбционные свойства водорастворимого хитозана под

воздействием аппаратного инфракрасного излучения и ультразвука у лабораторных животных. Провести сравнительную характеристику элиминации соединений никеля, кобальта и хрома из кожи экспериментальных животных при использовании фонофореза и фотофореза хитозана на фоне контактного аллергического дерматита.

Научная новизна. Впервые на экспериментальных животных смоделирован контактный аллергический дерматит, вызванный соединениями никеля, кобальта и хрома. Проведен сравнительный анализ клинических и патоморфологических изменений дермы у экспериментальных животных.

Впервые исследованы абсорбционные свойства водорастворимого хитозана под воздействием аппаратного инфракрасного излучения, ультразвука у лабораторных животных.

Впервые проведена сравнительная оценка элиминации соединений никеля, кобальта и хрома из кожи экспериментальных животных при использовании фонофореза и фотофореза хитозана на фоне контактного аллергического дерматита.

Впервые предложено патогенетическое обоснование применения фонофореза и фотофореза хитозана при экспериментальных аллергических дерматитах, вызванных соединениями никеля, кобальта и хрома.

Теоретическая и практическая значимость работы. В результате работы проведена сравнительная оценка клинических и патоморфологических изменений кожи у лабораторных животных при моделировании контактного аллергического дерматита, вызванного солями никеля, кобальта и хрома. Получены данные кинетики водорастворимого хитозана в коже экспериментальных животных методом люминесцентной микроскопии. Методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии определена концентрация тяжелых металлов в коже лабораторных животных при использовании различных методик применения соединений хитозана.

Проведенные исследования показали особенности абсорбционных свойств водорастворимого хитозана под воздействием аппаратного ИК-излучения, ультразвука у лабораторных животных и подтвердили эффективность применения фонофореза и фотофореза хитозана при экспериментальных аллергических дерматитах, вызванных солями никеля, кобальта и хрома.

Данные исследования могут служить предпосылкой для проведения клинических исследований по изучению эффективности фонофореза и фотофореза

хитозана в лечении контактных аллергических дерматитов, вызванных тяжелыми металлами.

Методология и методы диссертационного исследования. Настоящая работа выполнена согласно принципам доказательной медицины в дизайне динамического клинического наблюдения и лабораторно-инструментальных исследований. Основой методологии диссертационного исследования явилось последовательное применение методов научного познания, а также данные ранее проведенных исследований в России и за рубежом по этиопатогенезу и эффективности терапии КАД. В исследовании использованы клинические, инструментальные, лабораторные и статистические методы. Объектом исследования явились экспериментальные животные, на которых был смоделирован КАД на никель, кобальт и хром; предметом исследования – эффективность лечения и элиминация соединений тяжелых металлов из дермы экспериментальных животных под действием 1 % водорастворимого хитозана, нанесенного различными методиками.

Положения, выносимые на защиту

1. Сравнительная оценка клинических и патоморфологических изменений кожи у лабораторных животных при моделировании контактного аллергического дерматита, вызванного солями никеля, кобальта и хрома, свидетельствует о выраженном раздражающем и сенсибилизирующем действии двуххромовокислого калия на кожу экспериментальных животных.

2. Результаты исследования проницаемости хитозана в кожу экспериментальных животных методом люминесцентной микроскопии показали, что водорастворимый хитозан свободно проникает через неповрежденную кожу преимущественно трансфолликулярно, трансгландулярно впервые 1-2 часа после его нанесения, через 24 часа определяется проникновение и равномерное распределение хитозана во всех слоях кожи.

3. Показана высокая диагностическая ценность метода атомно-абсорбционной спектрофотометрии при проведении сравнительной оценки элиминации соединений никеля, кобальта и хрома из кожи лабораторных животных при экспериментальном аллергическом дерматите.

4. Применение фонофореза и фотофореза 1 % раствора водорастворимого хитозана при экспериментальных аллергических дерматитах ускоряет элиминацию

соединений никеля, кобальта и хрома из кожи и устраняет проявления патологического процесса.

Степень достоверности. Для решения поставленных задач проводились экспериментальные исследования на крысах: 128 половозрелых самца в возрасте от 2 до 2,5 месяцев. Количество животных было минимальным, но достаточным для решения поставленных задач. Оценка динамических изменений клеточных структур дермы и концентрация соединений тяжелых металлов в дерме экспериментальных животных подтверждена статистическим анализом. Проверка подчинения закону нормального распределения количественных данных осуществлялась с применением критерия Шапиро – Уилка. В связи с тем, что все количественные данные не подчинялись закону нормального распределения, то их описание осуществлялось с помощью медианы, первого и третьего квартилей ($Me [Q_1; Q_3]$). Для оценки статистической значимости различий между группами использовался критерий Манна – Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены на заседании проблемной комиссии «Инфекционные болезни и дерматовенерология», на Красноярском краевом обществе дерматовенерологов (Красноярск, 2013, 2016), на 24-й научно-практической конференции «Актуальные вопросы дерматовенерологии и косметологии» (Красноярск, 2014), на 3-й Ежегодной научно-практической конференции по антивозрастной и эстетической медицине (Красноярск, 2018).

Диссертационная работа апробирована на заседании проблемной комиссии «Инфекционные болезни, дерматовенерология, туберкулез» ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России (Красноярск, 2019).

Диссертационная работа выполнена в соответствии с утвержденным направлением научно-исследовательской работы ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, номер государственной регистрации 01201258925.

Внедрение результатов исследования. Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, внедрены в учебный процесс кафедры дерматовенерологии с курсом косметологии и ПО им. проф. В. И. Прохоренкова и в

научно-исследовательскую работу Центральной научно-исследовательской лаборатории Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 4 статьи в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 117 страницах машинописного текста и состоит из введения, 3 глав, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и списка иллюстративного материала. Список литературы представлен 190 источниками, из которых 129 в зарубежных изданиях. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью 11 таблиц и 22 рисунков.

Личный вклад автора. Весь материал, представленный в диссертации, получен, обработан и проанализирован лично автором. Исследование одобрено комитетом по этике Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого (протокол №30/2011 от 25 февраля 2011 г.).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на кафедре дерматовенерологии с курсом косметологии и ПО им. проф. В. И. Прохоренкова (заведующий – д-р мед. наук, проф. Ю. В. Карачева) Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого, КГБУЗ «Краевой кожно-венерологический диспансер № 1» и КГКУ «Краевая ветеринарная лаборатория».

Исследования проводились с соблюдением требований Приказа МЗ СССР №775 от 12 августа 1977 г. и правил Европейской конвенции по защите животных (Страсбург, 1986) и были одобрены комитетом по этике Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого (протокол №30/2011 от 25 февраля 2011 г.). Содержание животных было организовано в соответствии с санитарными требованиями № 1045-73 от 06.04.73.

Для решения поставленных задач проводились экспериментальные исследования на крысах: 128 половозрелых самца в возрасте от 2 до 2,5 месяцев и

массой от 200 до 250 граммов. Количество животных было минимальным, но достаточным для решения поставленных задач. Животные были распределены на 16 экспериментальных групп. Исследование влияния соединений хитозана на концентрацию металлов в коже экспериментальных животных в условиях экспериментального дерматита, вызванного солями никеля, кобальта и хрома, проводилось на 9 группах экспериментальных животных по 8 животных в каждой группе.

Для изучения кинетики 1 % водорастворимого хитозана в коже использовался метод люминесцентной микроскопии препаратами хитозана, меченного флюорохромом – флюоресцеином изотиоцианатом (ФИТЦ). Исследовался раствор 1 % водорастворимого хитозана с молекулярной массой 20 кДа, степенью деацетилирования 87 %, с ковалентной меткой – ФИТЦ в каждом десятом звене линейного полимера (ВХз-ФИТЦ). Для исключения влияния флюоресцеина изотиоцианата на кинетику хитозана проводилось изучение кинетики раствора ФИТЦ в концентрации $5 \times 10^{-4} \text{M}$.

Исследования проводились на 4 группах лабораторных крыс серии Вистар по 8 животных в каждой. Распределение в группах соответствовало времени экспозиции препаратов на коже (1, 2, 24 часа и контроль). Через определенный интервал времени проводилась биопсия кожи в соответствующих группах. Изучение естественной флюоресценции проводилось на коже животных контрольной группы. Биоптаты фиксировались в нейтральном 10 % растворе формалина. Для приготовления срезов из биоптатов использовался микротом-криостат «МК-25». Микроскопия и микрофотографирование проводились с помощью люминесцентного микроскопа марки «ЛЮМАМ И-3» и устройства «ФМН-11А» непосредственно после приготовления препарата.

Содержание тяжелых металлов в образцах кожи определялось на атомно-абсорбционной спектрофотометре SOLAAR серии S (ThermoElectron, США).

Метод атомно-сорбционной хроматографии включал подготовку проб и непосредственное определение количественного содержания металла в пробе. Пробу минерализовали в течение 10–15 часов до получения серой золы. При приготовлении раствора для анализа в чашку с озоленной пробой добавляли азотную кислоту и нагревали на электроплите с асбестом до растворения золы.

Метод атомно-абсорбционных измерений основан на распылении раствора минерализата испытуемой пробы в воздушно-ацетиленовом пламени. Величина абсорбции света с длиной волны с соответствующей резонансной линией пропорциональна значению концентрации металла в испытуемой пробе. Для хрома длина волны составляла 357,9 нм (или 359,4 нм), для никеля 232,5 нм, а для кобальта 228,8 нм. Определение содержания элементов в испытуемых растворах проводилось методом градуировочных графиков, которые строились по значениям сигналов абсорбции растворов сравнения.

Исследование влияния соединений хитозана на концентрацию металлов в коже экспериментальных животных в условиях экспериментального дерматита, вызванного солями никеля, кобальта и хрома, проводилось на 9 группах экспериментальных животных по 8 животных в каждой группе.

Исследование влияния 1 % водорастворимого хитозана на концентрацию солей никеля, кобальта и хрома в коже лабораторных животных изучалось на модели контактного аллергического дерматита у животных 8-й, 9-й и 10-й групп. Для этой цели на опытную область подготовленной поверхности кожи путем легкого втирания в течение 10 дней 1 раз в сутки наносился 0,1 мл 1 % водорастворимого хитозана (Мм 15-20 кДа, СД 87 %).

Исследование влияния фонофореза 1 % водорастворимого хитозана на концентрацию металлов в коже проводилось на модели контактного аллергического дерматита у экспериментальных животных 11-й, 12-й и 13-й групп в течение 10 дней. Для этой цели использовался аппарат для ультразвуковой терапии SoleoSonoStim с возможностью подключения вакуумного модуля фирмы Zimmer (MedizinSysteme) в непрерывном режиме, частота 0,5 МГц, интенсивность 0,6 Вт/см², время воздействия 10 минут. Для приготовления контактного вещества использовался 1 мл вазелинового масла, который перемешивался с 1 % водорастворимым хитозаном (ВХз) в соотношении 1 : 1. Ультразвуковой излучатель перемещался по поверхности кожи медленными круговыми движениями со скоростью 1–1,5 см/сек.

На экспериментальных животных 14-й, 15-й и 16-й групп на фоне полученного контактного аллергического дерматита в течение 10 дней проводилось исследование влияния соединений хитозана на элиминацию металлов из кожи путем применения аппаратного ИК-излучения. Использовался аппарат УЛФ–01 по контактной,

лабильной методике, λ – 630нм, время воздействия 10 минут, мощность 10 Вт.

Сравнительная оценка клинических и патоморфологических изменений кожи лабораторных животных проводилась ежедневно. На 20-е сутки эксперимента все лабораторные животные выводились из эксперимента и методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии определялась концентрация тяжелых металлов в биоптатах кожи экспериментальных животных. Материал из опытных участков кожи для патоморфологических и спектрального методов исследования проводился путем фиксации биоптатов в 10 % растворе нейтрального формалина, затем приготавливались срезы кожи. Оценка гистологических препаратов выполнялась с помощью светового микроскопа OlympusBX 45 (объектив 10,40) с использованием телевизионной установки DP 25 Olympus. Морфологический анализ проводился на гистологических препаратах, оцифрованных в редакторе AdobePhotoshopCS3.

Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований проводилась с использованием программы Statistica версия 6.0 (StatSoft, 2003). Проверка подчинения закону нормального распределения количественных данных осуществлялась с применением критерия Шапиро – Уилка. В связи с тем, что все количественные данные не подчинялись закону нормального распределения, то их описание осуществлялось с помощью медианы, первого и третьего квартилей ($Me [Q_1; Q_3]$). Для оценки статистической значимости различий между группами использовался критерии Манна – Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Графические иллюстрации построены с помощью компьютерных программ MicrosoftOffice 2007, SPSS 17. Все иллюстрации созданы самостоятельно.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

У всех лабораторных животных, подвергшихся воздействию раствором никеля, кобальта и хрома, на 3-4-й день эксперимента наблюдалась первичная реакция на аллерген. Высыпания были представлены папулами, везикулами на эритематозном фоне. При использовании растворов никеля и кобальта высыпания у экспериментальных животных преимущественно локализовались вокруг сально-волосяных фолликулов. Тогда как при использовании раствора хрома высыпания у лабораторных животных проявлялись вне зависимости от фолликулярного аппарата. В ходе эксперимента у всех лабораторных животных

нарастали клинические проявления КАД. На 10-е сутки у животных, подвергавшихся воздействию солей никеля и кобальта, клинические проявления были схожи и проявлялись воспаленными папулами, везикулами на эритематозно-сквамозном фоне. У лабораторных животных на 10-е сутки эксперимента, подвергавшихся раствором хрома, клиническая картина была представлена эрозиями, папулами эритематозно-сквамозный фон распространялся за границы экспериментального поля на прилегающие участки кожи.

Патоморфологическая картина у животных выявляет значительное утолщение эпидермиса, выраженный акантоз, вакуольную дистрофию в шиповатом и базальном слоях, клетки базального и шиповатого слоев – с пикнотичными ядрами, явления спонгиоза. В сосочковом слое дермы – выраженный интерстициальный отек, диффузные воспалительные инфильтраты представлены преимущественно лимфоцитами, макрофагами и полиморфно-ядерными лейкоцитами. Сосуды сосочкового слоя дермы расширены, стенки сосудов отечны, в сосудах стаз форменных элементов крови.

При нанесении солей металлов на интактные участки кожи у лабораторных животных на 12-е сутки эксперимента наблюдались проявления контактной гиперчувствительности в виде эритемы.

Таким образом, на моделях контактного аллергического дерматита, вызванного солями никеля, кобальта и хрома у лабораторных животных, можно наблюдать все стадии клинических и патоморфологических изменений кожи, свойственных контактному аллергическому дерматиту.

Результаты исследования проницаемости хитозана в кожу экспериментальных животных проводились на 4-й, 5-й, 6-й, 7-й группах и показали, что водорастворимый хитозан свободно проникает через неповрежденную кожу преимущественно трансфолликулярно, трансгландулярно впервые 1-2 часа после его нанесения. Во всех случаях через 24 часа после нанесения 1 % водорастворимого хитозана определялось его проникновение и равномерное распределение во всех слоях кожи.

Распределение раствора флюоресцеина изотиоцианата (ФИТЦ) при нанесении его на интактную область носило равномерный трансэпидермальный характер. Уже в первые часы после аппликации раствор ФИТЦ накапливался в эпидермисе, далее проникая в дерму и распределяясь в ней равномерно. Через 24 часа краситель почти

полностью выводился из дермы, но максимально сохранялся в клетках Лангерганса. В ультрафиолетовых лучах клетки Лангерганса в обработанных ФИТЦ срезах кожи имели слабое зеленовато-желтое свечение. Они были ясно видны на фоне нефлюоресцирующего эпидермиса в виде отростчатых флюоресцирующих клеток. Таким образом, проведенные исследования показали, что водорастворимый хитозан способен проникать в неповрежденную кожу в первые 1-2 часа трансфолликулярно, трансгландулярно, трансэпидермально. Раствор ФИТЦ, применявшийся в качестве метки для хитозана, не влияет на пути, время проникновения биополимеров и характер распределения его в коже.

Изучение влияния хитозана на элиминацию солей никеля, кобальта и хрома у лабораторных животных 8-й, 9-й и 10-й групп проводилось на фоне полученного контактного аллергического дерматита путем нанесения 1 % водорастворимого хитозана на опытную область кожного покрова в течение 10 дней. На 8-й день применения водорастворимого хитозана у лабораторных животных 8-й и 9-й групп патологический кожный процесс перешел в подострую стадию, степень эритемы уменьшилась, очаги мокнутия начали подсыхать, инфильтрация кожи сохранялась. У животных 10-й группы на фоне модели контактного аллергического дерматита, вызванного солями хрома, острые воспалительные явления на коже сохранялись в течение 10 дней. Патоморфологические изменения биоптатов кожи лабораторных животных 8-й и 9-й групп показали наличие менее выраженных признаков контактного аллергического дерматита по сравнению с контрольными группами. В исследуемых биоптатах определялся отек эпидермиса, умеренная, местами скудная макрофагально-лимфоцитарная инфильтрация дермы. Очаговая периваскулярная инфильтрация дермы. Сосуды сосочкового слоя дермы расширены, перифолликулярная инфильтрация, эндотелий набухший, в сосудах стаз крови. Патоморфологические изменения наиболее выражены были у лабораторных животных 10-й группы, подвергшихся воздействию 5 % двуххромовокислого калия и практически не отличалась от животных контрольной группы.

Исследования влияния фонофореза 1 % водорастворимого хитозана на концентрацию металлов в коже проводили на модели КАД у экспериментальных животных 11-й, 12-й и 13-й групп в течение 10 дней. На 6-й день применения фонофореза водорастворимого хитозана у лабораторных животных 11-й и 12-й групп

на коже наблюдалось снижение степени контактного аллергического дерматита. Отмечалась умеренно выраженная эритема, сохранялись единичные папулезные и везикулезные элементы сыпи. У лабораторных животных 13-й группы клинические проявления дерматита сохранялись до 10 дня эксперимента. Наиболее выраженные патоморфологические изменения дермы лабораторных животных были после воздействия 5 % двуххромовокислого калия.

Исследования влияния фотофореза 1% водорастворимого хитозана на концентрацию металлов в коже проводили на модели КАД у экспериментальных животных 14-й, 15-й и 16-й групп в течение 10 дней. У экспериментальных животных 14-й и 15-й групп на 5-й день применения водорастворимого хитозана наблюдалось существенное снижение острых воспалительных явлений на коже, сохранялась эритема и единичные папулезные элементы сыпи. При патоморфологическом исследовании образцов, взятых из опытных участков кожи лабораторных животных 14-й и 15-й групп, отмечалось снижение проявлений КАД в сравнении с контрольными группами. Незначительный отек, разрыхление коллагеновых волокон, скудная макрофагально-лимфоцитарная инфильтрация дермы. Сосуды сосочкового слоя дермы расширены, эндотелий набухший. У лабораторных животных 16-й группы, подвергшихся воздействию 5 % двуххромовокислого калия, сохранялись эритема, единичные папулы, очаги мокнутия разрешались. Патоморфологические изменения кожи в 14-й и 15-й группах животных на 20-й день эксперимента были представлены равномерным незначительно-выраженным акантозом эпидермиса, скудными очаговыми воспалительными инфильтратами в сосочковом слое дермы. У животных 16-й группы на 6-7 день использования 1 % водорастворимого хитозана методом фотофореза отмечалась умеренно выраженная эритема и инфильтрация, бляшки с серозными корочками, незначительное шелушение. На гистологических срезах сохранялись диффузные лимфоцитарные и макрофагальные умеренные воспалительные инфильтраты в сосочковом слое дермы, наличие лимфоцитов, макрофагов и эозинофилов, расширение сосудов дермы.

При использовании 1 % водорастворимого хитозана в условиях КАД, вызванного 5 % раствором хлорида никеля, отмечалось значительное снижение выраженности диффузной макрофагально-лимфоцитарной инфильтрации в дерме (лимфоцитов с 3,0 [2,3; 4,0] до 1,0 [1,0; 1,8], нейтрофилов с 2,0 [1,3; 2,0] до 1,0 [0,0;

1,0] в зависимости от метода использования 1 % водорастворимого хитозана), снижение выраженности отека и стаза форменных элементов крови.

При патоморфологическом исследовании образцов, взятых из опытных участков кожи животных 2-й группы (модель КАД вызванного 5 % раствором хлорида кобальта), выявляется значительное утолщение эпидермиса, выраженный акантоз, вакуольную дистрофию в шиповатом и базальном слоях, клетки базального и шиповатого слоев – с пикнотичными ядрами, явления спонгиоза. В сосочковом слое дермы – выраженный интерстициальный отек, диффузные воспалительные инфильтраты представлены преимущественно лимфоцитами, макрофагами и полиморфно-ядерными лейкоцитами. Сосуды сосочкового слоя дермы расширены, стенки сосудов отечны, в сосудах стаз форменных элементов крови.

При использовании 1 % водорастворимого хитозана в условиях КАД, вызванного 5 % раствором хлорида кобальта, отмечалось снижение выраженности диффузной макрофагально-лимфоцитарной инфильтрации в дерме (лимфоцитов с 3,5 [3,0; 4,0] до 2,0 [1,0; 2,0], нейтрофилов с 2,0 [1,3; 2,0] до 1,0 [0,0; 1,0] в зависимости от метода использования 1 % водорастворимого хитозана), снижение выраженности отека и стаза форменных элементов крови.

При патоморфологическом исследовании образцов, взятых из опытных участков кожи животных 3-й группы (модель КАД, вызванного 5 % раствором двуххромовокислого калия), патоморфологические изменения были наиболее выражены вокруг волосяных фолликулов, в том числе и корневой части волос, выводных протоков сальных и потовых желез, наблюдались равномерный умеренный акантоз, усиленная десквамация рогового слоя, экзоцитоз клеток инфильтрата в роговой слой с формированием корок, чешуе-корок. Воспалительные инфильтраты в сосочковом слое дермы располагались диффузно и были представлены преимущественно лимфоцитами, полиморфно-ядерными лейкоцитами с примесью макрофагов и эозинофилов. Сосуды сосочкового слоя дермы расширены, стенки сосудов отечны, в сосудах стаз.

При использовании 1 % водорастворимого хитозана в условиях КАД, вызванного 5 % раствором двуххромовокислого калия, отмечалось незначительное снижение выраженности диффузной макрофагально-лимфоцитарной инфильтрации в дерме (лимфоцитов с 5,0 [4,0; 5,8] до 2,0 [2,0; 3,0] нейтрофилов с 3,0 [2,3; 3,8] до

1,0 [1,0; 1,8] в зависимости от метода использования 1 % водорастворимого хитозана), сохранялся умеренно-выраженный отек и стаз элементов крови.

Модель контактного аллергического дерматита была смоделирована в 1-й, 2-й и 3-й группах лабораторных животных. Группы подразделялись по раздражающему агенту. На 20-е сутки лабораторные животные выводились из эксперимента. Биопсийный материал подвергался предварительной подготовке с последующим определением концентрации тяжелых металлов. Определение содержания элементов в испытуемых растворах проводилось методом градуировочных графиков, которые строились по значениям сигналов абсорбции растворов сравнения. Содержание тяжелых металлов в образцах кожи определялось на атомно-абсорбционной спектрофотометре SOLAAR серии S (ThermoElectron, США).

По данным атомно-абсорбционной спектрофотометрии у животных 1-й группы концентрация никеля в коже составила в среднем 306,6 [305,9; 308,2] мг/кг, в коже животных 2-й группы концентрация кобальта – 284,1 [283,2; 287,5] мг/кг, у животных 3-й группы концентрация хрома – 352,4 [350,2; 354,2] мг/кг. Полученные результаты свидетельствуют о высокой проникающей способности всех исследуемых солей тяжелых металлов. Из исследуемых растворов 5 % двуххромовокислый калий обладает самой высокой проникающей способностью в кожу экспериментальных животных по сравнению с солями никеля и кобальта.

Исследование влияния 1 % водорастворимого хитозана на концентрацию солей никеля, кобальта и хрома в коже лабораторных животных изучали на модели контактного аллергического дерматита у животных 8-й, 9-й и 10-й групп. Для этой цели на опытную область подготовленной поверхности кожи путем легкого втирания в течение 10 дней с частотой 1 раз в сутки наносился 0,1 мл 1 % водорастворимый хитозан (Мм 15-20 кДа, СД 87 %).

Полученные результаты свидетельствуют о статистически значимом сокращении концентрации металлов в коже экспериментальных животных по сравнению с контрольной группой: никеля в коже с 306,6 [305,9; 308,2] мг/кг до 231,7 [230,3; 234,7] мг/кг, кобальта с 284,1 [283,2; 287,5] мг/кг до 211,9 [210,8; 214,0] мг/кг, хрома с 352,4 [350,2; 354,2] мг/кг до 298,0 [296,5; 299,6] мг/кг, что в процентном выражении составило 24,5 %, 25,5 % и 15,5 % соответственно.

Анализ влияния флюоресценции 1 % водорастворимого хитозана на концентрацию

металлов в коже проводился на модели контактного аллергического дерматита у экспериментальных животных 11-й, 12-й и 13-й групп в течение 10 дней. Для приготовления контактного вещества использовался 1 мл вазелинового масла, который перемешивался с 1 % водорастворимым хитозаном в соотношении 1 : 1. Ультразвуковой излучатель перемещался по поверхности кожи медленными круговыми движениями со скоростью 1–1,5 см/сек.

У животных 11-й, 12-й и 13-й групп при применении фонофореза хитозана концентрация никеля в коже в среднем составила 184,9 [183,0; 186,7] мг/кг (в контрольной группе – 306,6 [305,9; 308,2] мг/кг), кобальта – 173,8 [172,8; 176,5] мг/кг (контрольная группа – 284,1 [283,2; 287,5] мг/кг), хрома – 260,0 [256,9; 261,2] мг/кг (контрольная группа – 352,4 [350,2; 354,2] мг/кг, что статистически значимо показало снижение концентрации металлов в коже по сравнению с контрольной группой на 39,7 %, 38,9 % и 26,3 % соответственно.

На экспериментальных животных 14-й, 15-й и 16-й групп на фоне полученного контактного аллергического дерматита в течение 10 дней проводилось исследование влияния соединений хитозана на элиминацию металлов из кожи путем применения аппаратного ИК-излучения. Использовался аппарат УЛФ-01 по контактной, лабильной методике, λ – 630 нм, время воздействия 10 минут, мощность 10 Вт. На 20-е сутки лабораторные животные выводились из эксперимента с последующим определением концентрации тяжелых металлов.

Концентрация никеля в коже в среднем составила 70,5 [69,6; 72,9] мг/кг, кобальта – 51,4 [49,3; 53,3] мг/кг, хрома – 183,9 [181,8; 185,5] мг/кг, что статистически значимо меньше показателей у лабораторных животных контрольной группы (306,6 [305,9; 308,2] мг/кг (-77,1 %), 284,1 [283,2; 287,5] мг/кг (-82 %), 352,4 [350,2; 354,2] мг/кг (-48 %) соответственно).

Для повышения проникающих свойств 1 % водорастворимого хитозана в дерму и улучшения его сорбционных и элиминирующих свойств использовались методики аппликации, фонофореза и фотофореза. При сравнительной оценке эффективности методик нанесения 1 % водорастворимого хитозана на кожу полученные данные были сформированы в таблице по раздражающему агенту.

На лабораторных животных 1-й, 8-й, 11-й и 14-й групп моделировался КАД 5 % раствором хлористого никеля (таблица 1).

Полученные данные свидетельствуют о высокой абсорбционной способности 1 % водорастворимого хитозана в отношении солей никеля. Повысить сорбирующие свойства 1% водорастворимого хитозана способны методы, улучшающие или ускоряющие проникновение его в дерму. К таким методам относятся наружная аппликация, фонофорез и фотофорез. При сравнительной оценке физических методов выяснилось, что использование ИК-излучения с 1 % водорастворимым хитозаном способно максимально повысить сорбирующие и эвакуирующие свойства последнего. Экспериментальным путем доказано, что концентрация солей никеля в тканях снижается до 77,1 % по сравнению с контрольной группой.

Таблица 1 – Концентрация солей никеля в коже экспериментальных животных после различных методик нанесения 1 % водорастворимого хитозана

Экспериментальные группы КАД моделированный 5 % хлористым никелем	Содержание солей никеля, Me [Q ₁ ;Q ₃], мг/кг
1 группа (контрольная группа)	306,6[305,9; 308,2]
8 группа (наружная аппликация 1 % водорастворимого хитозана)	231,7 [230,3; 234,7]
11 группа (фонофорез 1 % водорастворимого хитозана)	184,9 [183,0; 186,7]
14 группа (фотофорез 1 % водорастворимого хитозана)	70,5 [69,6; 72,9]
Уровень значимости	p<0,001 p ₁₋₈ <0,001 p ₁₋₁₁ <0,001 p ₁₋₁₄ <0,001

На лабораторных животных 2-й, 9-й, 12-й и 15-й групп моделировался КАД 5 % раствором хлористого кобальта (таблица 2).

При моделировании КАД 5 % раствором хлористого кобальта концентрация металлов в коже была приблизительно такой же как и при КАД на 5 % раствор хлористого никеля. При приблизительно равной динамике проникновения солей никеля и кобальта в ткани экспериментальным путем получена и похожая элиминация солей металлов под воздействие физических факторов из дермы экспериментальных животных. Необходимо отметить методику фотофореза 1 % водорастворимого хитозана, которая способна повысить сорбирующие и

элиминирующие свойства хитозана. При использовании данной методики содержание солей кобальта в тканях снижается до 82 % по сравнению с контрольной группой.

Таблица 2 – Концентрация солей кобальта в коже экспериментальных животных после различных методик нанесения 1 % водорастворимого хитозана

Экспериментальные группы КАД моделированный 5 % хлористым кобальтом	Содержание солей кобальта, Me [Q ₁ ;Q ₃],мг/кг
2 группа (контрольная группа)	284,1 [283,2; 287,5]
9 группа (наружная аппликация 1 % водорастворимого хитозана)	211,9 [210,8; 214,0]
12 группа (фонофорез 1 % водорастворимого хитозана)	173,8 [172,8; 176,5]
15 группа (фотофорез 1 % водорастворимого хитозана)	51,4 [49,3; 53,3]
Уровень значимости	p<0,001 p ₂₋₉ <0,001 p ₂₋₁₂ <0,001 p ₂₋₁₅ <0,001

На лабораторных животных 3-й, 10-й, 13-й и 16-й групп моделировался КАД 5 % двуххромовокислым калием (таблица 3).

При обработке полученных данных выяснилось, что самой высокой проникающей способностью обладает 5 % раствор двуххромовокислого калия. Соединения хрома лучше всего проникают через эпидермальный барьер в сравнении с соединениями никеля и кобальта и в меньшей степени выводятся раствором хитозана. Большую эффективность в элиминации соединений хрома из дермы показал метод фотофореза с 1 % раствором водорастворимого хитозана.

Предположительно, фотофорез повышает проникающую и сорбирующую способность 1 % водного раствора хитозана, а также участвует в элиминации полученных соединений из дермы. Использование данной методики позволяет сократить содержание соединений хрома в дерме до 48 % по сравнению с контрольной группой.

Таблица 3 – Концентрация солей хрома в коже экспериментальных животных после различных методик нанесения 1 % водорастворимого хитозана

Экспериментальные группы	Содержание солей хрома, Me [Q ₁ ;Q ₃],мг/кг
3 группа (КАД моделированный 5 % двуххромовокислым калием)	352,4 [350,2; 354,2]
10 группа (КАД моделированный 5 % двуххромовокислым калием)	298,0 [296,5; 299,6]
13 группа (КАД моделированный 5 % двуххромовокислым калием)	260,0 [256,9; 261,2]
16 группа (КАД моделированный 5 % двуххромовокислым калием)	183,9 [181,8; 185,5]
Уровень значимости	$p < 0,001$ $p_{3-10} = 0,001$ $p_{3-13} = 0,001$ $p_{3-16} = 0,001$

Сравнение полученных показателей с показателями при использовании фонофореза хитозана статистически значимо подтверждают эффективность применения фотофореза хитозана (сокращение концентрации никеля с 306,6 [305,9; 308,2] мг/кг до 70,5 [69,6; 72,9] мг/кг, кобальта с 284,1 [283,2; 287,5] мг/кг до 51,4 [49,3; 53,3] мг/кг и хрома с 352,4 [350,2; 354,2] мг/кг до 183,9 [181,8; 185,5] мг/кг соответственно (при $p = 0,001$).

Сравнительная оценка эффективности применения фонофореза и фотофореза соединений хитозана на фоне контактного аллергического дерматита у экспериментальных животных подтверждает высокую сорбционную способность хитозана при условии применения совместно с фотофорезом.

ВЫВОДЫ

1. Исследование экспериментальных животных с моделью контактного аллергического дерматита, вызванного солями никеля, кобальта и хрома, показало, что 5 % хлористый никель и 5 % хлористый кобальт обладают одинаковыми раздражающими и сенсibiliзирующими свойствами, но значительно уступают по своей активности 5 % двуххромовокислому калию. Результаты подтверждаются клиническими и патоморфологическими изменениями кожи у лабораторных животных.

2. Водорастворимый хитозан способен проникать в неповрежденную кожу в

первые 1-2 часа трансfolликулярно, трансгландулярно, трансэпидермально, а также через эпидермальные дефекты. Водорастворимая форма хитозана сохраняется во всех слоях дермы более 24 часов.

3. Методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии определено, что водорастворимый раствор хитозана обладает высокой сорбционной способностью в отношении 5 % хлористого никеля и 5 % хлористого кобальта. Степень абсорбции 5 % двухромоокислого калия значительно ниже по сравнению с солями никеля и кобальта. Водорастворимая форма хитозана способна элиминировать соли тяжелых металлов из кожи в зависимости от методик применения 1 % водорастворимого хитозана.

4. Анализ результатов атомно-сорбционной спектрофотометрии биоптатов кожи экспериментальных животных подтверждает, что абсорбционные свойства водорастворимого хитозана значительно усиливаются под воздействием аппаратных методик. Сравнительный анализ полученных результатов при использовании фонофореза и фотофореза водорастворимого хитозана выявил более высокую эффективность фотофореза при снижении концентрации никеля с 306,6 [305,9; 308,2] мг/кг до 70,5 [69,6; 72,9] мг/кг, кобальта с 284,1 [283,2; 287,5] мг/кг до 51,4 [49,3; 53,3] мг/кг и хрома с 352,4 [350,2; 354,2] мг/кг до 183,9 [181,8; 185,5] мг/кг. 1 % водорастворимый хитозан, нанесенный методом фотофореза, способен абсорбировать на себе до 77,1 % никеля, до 82 % кобальта и до 48 % хрома в сравнении с контрольными группами.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При развитии контактного аллергического дерматита, вызванного солями тяжелых металлов, рекомендуется использовать 1 % водорастворимый хитозан молекулярной массой 20 кДа и степени деацетилирования 87 % методом фотофореза.

2. Рекомендовано использовать универсальный хитозановый гель при лечении контактного аллергического дерматита, вызванного солями тяжелых металлов, в качестве проводниковой среды при проведении аппаратных физиопроцедур.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. **Казанбаев, Р. Т.** Профессиональные заболевания кожи, вызванные тяжелыми металлами / **Р. Т. Казанбаев**, К. П. Потапова, В. С. Иванова / 76-я итоговая

студенческая научно-практическая конференция с Международным участием, посвященная 90-летию со дня рождения профессора Л. Л. Роднянского. – Красноярск, КрасГМУ, 2012. – С. 3.

2. Иммунологические механизмы развития аллергических дерматозов / **Р. Т. Казанбаев** [и др.] / **Сибирское медицинское обозрение**. – Красноярск, 2013. – № 4, –С. 9–13.

3. **Казанбаев, Р. Т.** Моделирование контактного аллергического дерматита соединениями хрома, кобальта и никеля в экспериментальных условиях / **Р. Т. Казанбаев**, А. С. Малышев, А. В. Кирил // 77-я итоговая студенческая научно-практическая конференция с Международным участием. – Красноярск, КрасГМУ, 2013. – С. 449–450.

4. Эффективность применения соединений хитозана при экспериментальном дерматите, вызванном солями никеля и кобальта / **Р. Т. Казанбаев** [и др.] // **Сибирское медицинское обозрение**. – Красноярск. – 2013. – № 5. – С. 27–29.

5. Применение фотофореза соединений хитозана в эксперименте на модели контактного аллергического дерматита / **Р. Т. Казанбаев** [и др.] // **Сибирское медицинское обозрение**. – Красноярск. – 2014. – № 2. – С. 27–29.

6. **Казанбаев, Р. Т.** Абсорбционные свойства водорастворимого хитозана под воздействием аппаратного ИК-излучения и ультразвука у лабораторных животных при экспериментальных аллергических дерматитах / **Р. Т. Казанбаев**, Ю. В. Карачева, Т. А. Яковлева // **Сибирское медицинское обозрение**. – Красноярск. – 2015. – № 3. – С. 48–53.

7. **Казанбаев, Р. Т.** Современные особенности патогенеза контактных аллергических дерматитов / **Р. Т. Казанбаев**, Т. А. Яковлева // Актуальные вопросы дерматовенерологии : сборник статей к 70-летию дерматовенерологической службы Республики Тыва. – Кызыл, 2015. – С. 92–97.

8. **Казанбаев, Р. Т.** Аллергические дерматозы, вызванные тяжелыми металлами / **Р. Т. Казанбаев**, Т. А. Яковлева // Актуальные вопросы дерматовенерологии : сборник статей к 70-летию дерматовенерологической службы Республики Тыва. – Кызыл, 2015. – С. 95–98.

9. **Казанбаев, Р. Т.** Перспективы применения соединений хитозана в лечении аллергических дерматитов / **Р. Т. Казанбаев**, Т. А. Яковлева // Актуальные вопросы дерматовенерологии : сборник статей к 70-летию дерматовенерологической службы Республики Тыва. – Кызыл, 2015. – С. 98–101.