

ПЕРСПЕКТИВА ПРИМЕНЕНИЯ АКТИВНОЙ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ТАКТИКИ НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ КОМБИНАЦИИ ОПИОИДНОГО ПЕПТИДА DSLET И СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОГО СРЕДСТВА СЕРОТОНИНА АДИПИНАТА В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ КОНТАКТНОГО ОТМОРОЖЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Лазаренко В.А.¹, Артюшкова Е.Б.¹, Мишустин В.Н.¹, Моновцов И.А.¹, Квачахия Л.Л.¹, Чигунадзе А.Л.¹, Артюшкова Е.В.¹

¹ ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия (305041, г. Курск, ул. К. Маркса, 3), e-mail: kurskmed@mail.ru

Проблема холодовой травмы остается актуальной, несмотря на многолетнее изучение механизмов её патогенеза и появление новых прогрессивных технологий лечения. Активная хирургическая тактика лечения на фоне введения комбинации DSLET (10 мкг/кг) и серотонина адипината (4,5 мг/кг) приводила к уменьшению выраженности и распространенности альтеративных изменений при моделировании контактного отморожения. При микроскопическом исследовании на 3 сутки некротические массы отсутствуют, имеются небольшие воспалительные клеточные инфильтраты. В краях раны формируется грануляционная ткань. К 7-м суткам слой грануляций утолщается, накапливаются плотные соединительнотканые волокна. К концу эксперимента вся зона повреждения выполнена соединительной тканью, в которой обнаруживаются новообразованные плотные коллагеновые волокна, что свидетельствует о созревании соединительной ткани в формирующемся рубце. Эффективность коррекции контактного отморожения на фоне комбинированного применения серотонина адипината и DSLET в сочетании с активной хирургической тактикой подтверждается снижением уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ФНО-α) в 2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой.

Ключевые слова: контактное отморожение, активная хирургическая тактика, морфологическое исследование, провоспалительные цитокины

THE PROSPECT OF ACTIVE SURGICAL APPROACH WITH COMBINED ADMINISTRATION OF OPIOID PEPTIDE DSLET AND SEROTONERGIC AGENT – SEROTONIN ADIPINATE IN COMPLEX THERAPY OF THE EXPERIMENTAL CONTACT FROSTBITE

Lazarenko V.A.¹, Artyushkova E.B.¹, Mishustin V.N.¹, Monovtsov I.A.¹, Kvachakhiya L.L.¹, Chigunadze A.L.¹, Artyushkova E.V.¹

¹ Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation (305041, Kursk, K. Marx str, 3), e-mail: kurskmed@mail.ru

Nowadays the cold injury remains the actual surgical problem despite of the long-term studies of the mechanisms of its pathogenesis and the emergence of new advanced treatment technologies. The active surgical approach of frostbite's treatment in conjunction with the combined administration of DSLET (10 mcg/kg a day) and Serotonin adipinate (4,5 mg/kg a day) resulted in a decrease in the severity and prevalence of alterations due to the contact frostbite modeling. During microscopic examination it was shown the necrotic mass are absent on day 3, also there are small inflammatory cell infiltrates. The granulation tissue is formed in wound edges. By the 7th day the granulation layer thickens owing to the dense connective tissue fibers are accumulated. At the end of our experiment the whole damage area is filled by connective tissue, this fact suggests that the newly formed collagen fibers mature in the forming cicatrix. The efficiency of contact frostbite correction by the combined administration of DSLET (10 mcg/kg a day) and Serotonin adipinate (4,5 mg/kg a day) in conjunction with the active surgical approach is confirmed by the 2-fold reduction of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, TNF-α ($p < 0.05$) compared with the control group.

Keywords: contact frostbite, active surgical approach, morphological study, pro-inflammatory cytokines

Введение

Вопросы холодовой травмы всегда были и остаются актуальными для специалистов по лечению термических повреждений в России в силу её географического положения [4, 5].

Несмотря на широкое применение лекарственной терапии при отморожениях, использование селективного агониста дельта опиоидных рецепторов DSLET и серотонинергического средства – серотонина адипината позволит раскрыть перспективу их целенаправленного использования в качестве дополнения к существующим методам лечения холодовой травмы [3, 6]. Сопоставление динамики морфологической картины на макро- и микроскопическом уровнях актуально для определения адекватных сроков и тактики лечения холодовой травмы [2, 5].

Работа является фрагментом исследования на соискание учёной степени кандидата медицинских наук «Активная хирургическая тактика с использованием опиоидного пептида и серотонина в лечении отморожений».

Цель исследования

Изучить влияние активной хирургической тактики с комбинированным применением опиоидного пептида DSLET и серотонинергического препарата серотонина адипинат на динамику морфологических изменений кожи и уровень провоспалительных цитокинов при контактном отморожении в эксперименте.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на половозрелых крысах-самцах линии «Wistar», массой тела 250 г. Операции и все манипуляции с крысами проводились в условиях общего обезболивания путем внутривентрального введения хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг [1].

У крыс контрольной серии после наступления наркотического сна моделировали отморожение по методу Бойко В.В. 2010 г. [2].

На 3 сутки после моделирования отморожения под наркозом хлоралгидратом острым путем производили некрэктомию.

Крысы опытной группы получали комбинированное лечение: DSLET в дозе 10 мкг/кг внутривентрально и серотонина адипинат в дозе 4,5 мг/кг внутривентрально после моделирования отморожения на первые, третьи, пятые и седьмые сутки после холодовой травмы.

Животных выводили из эксперимента на 3, 7 и 14 сутки передозировкой хлоралгидрата и осуществляли забор тканей. Исследовали состояние поврежденных тканей на поверхности и разрезе, визуально учитывали особенности их строения. Для гистологического исследования брали 4-5 кусочков ткани из видимой области повреждения и из пограничной области. Кусочки ткани фиксировали в 10% растворе формалина на фосфатном буфере (рН 7,2-7,4) в течение двух дней, заливали в парафин, изготавливали срезы толщиной 4-5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином и по методу Ван Гизона.

Выраженность воспалительных процессов оценивали по количественному

содержанию интерлейкина-6 (ИЛ-6) и фактора некроза опухоли-альфа (ФНО-α), которые определяли с помощью наборов для иммуноферментного анализа для крыс («Rat TNF-α Platinum ELISA» и «Rat IL-6 Platinum ELISA» фирмы «eBioscience», Австрия).

Достоверность наблюдавшихся при действии исследованных препаратов изменений параметров, как абсолютных, так и в процентах от исходного уровня, определяли путем расчета средней арифметической (M), ошибки средней арифметической ($\pm m$) и оценки достоверности различий сравниваемых параметров между группами с использованием t-test для групп с разными дисперсиями, достоверными считались различия сравниваемых параметров при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

При морфологическом исследовании на 3-е сутки в поверхностных слоях операционной раны выявляются очаги некроза мышечной и жировой ткани (рис. 1). В пограничной области обнаруживаются инфильтраты, состоящие из нейтрофилов, макрофагов и плазмочитов. Сосуды расширены, гиперемизованы, стенки в состоянии мукоидного набухания. В отдельных сосудах отмечается лейкостаз. Имеются очаги плазморрагии, небольшие свежие кровоизлияния. Бактериальная инвазия, выраженные нейтрофильные инфильтраты и абсцессы не обнаруживаются. Имеются мелкие очаги формирования грануляционной ткани.

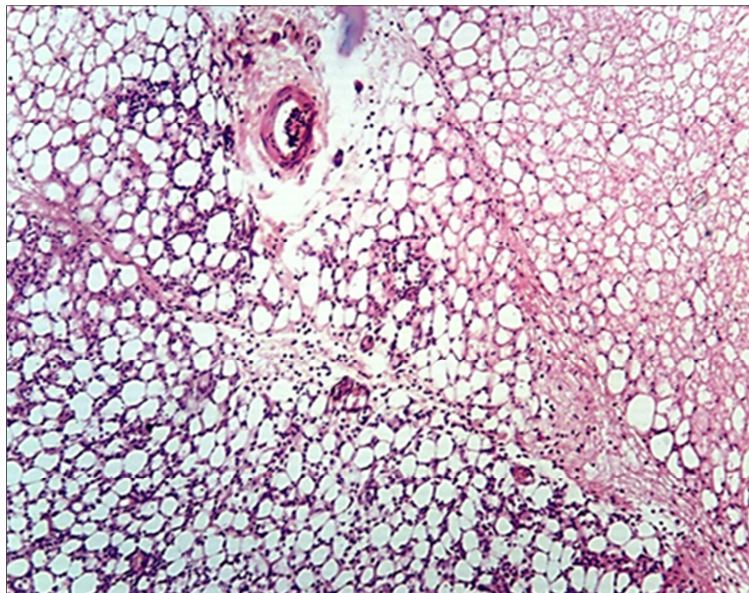


Рисунок 1. Очаг некроза жировой ткани окружен инфильтратами из нейтрофилов. В сосудах отмечается лейкостаз. Окраска гематоксилином и эозином. х 100.

К 7-м суткам в области раны по-прежнему выявляется очаг некроза, окруженный плотным демаркационным слоем нейтрофилов (рис. 2). В пограничной области обнаруживаются небольшие инфильтраты, состоящие из нейтрофилов, макрофагов и

плазмоцитов. Сосуды расширены, гиперемированы, стенки в состоянии мукоидного набухания. Имеются мелкие очаги формирования грануляционной ткани с множественными фибробластами, тонкими новообразованными волокнистыми структурами.

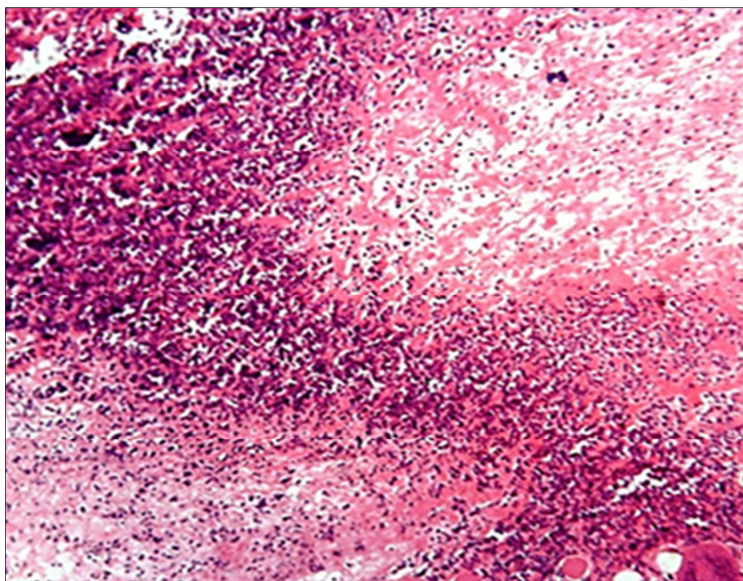


Рисунок 2. Очаг некроза окружен формирующейся зоной демаркации, представленной скоплением нейтрофилов. Окраска гематоксилином и эозином. х 100.

К 14-м суткам в области операционной раны небольшой очаг некроза окружен формирующейся молодой соединительной тканью с большим количеством активных фибробластов, тонкими новообразованными коллагеновыми волокнами. Соединительная ткань, окружающая зону некроза, рыхлая отечная, выталкивает некротические массы на поверхность. Вблизи области повреждения новообразованные сосуды грануляционной ткани содержат форменные элементы крови.

Таким образом, в ходе проведенного эксперимента в контрольной группе репаративные процессы после холодовой травмы замедлены, персистируют некротические изменения. Формирование струпа в области повреждения макроскопически обнаруживаются к 7-м суткам, так же как и формирование демаркационной зоны вокруг некротизированных тканей. К 7-м суткам появляются отдельные очаги развития молодой соединительной ткани, лишь к 14-м суткам зона некроза окружена грануляционной тканью, созревание ее замедлено.

При комбинированном использовании препаратов DSLET и серотонина на 3 сутки после некрэктомии в области операционной раны демаркационная зона становится макроскопически видимой, при микроскопическом исследовании некротические массы не выявляются, обнаруживается жировая ткань с небольшими клеточными инфильтратами (рис. 3), а также тонким слоем грануляционной ткани с большим количеством макрофагов и

фибробластов. В межмышечной соединительной ткани обнаруживаются единичные небольшие скопления нейтрофилов. Сосуды расширены, гиперемизированы, стенки набухшие, в просветах – стаз. Выражен отек тканей.

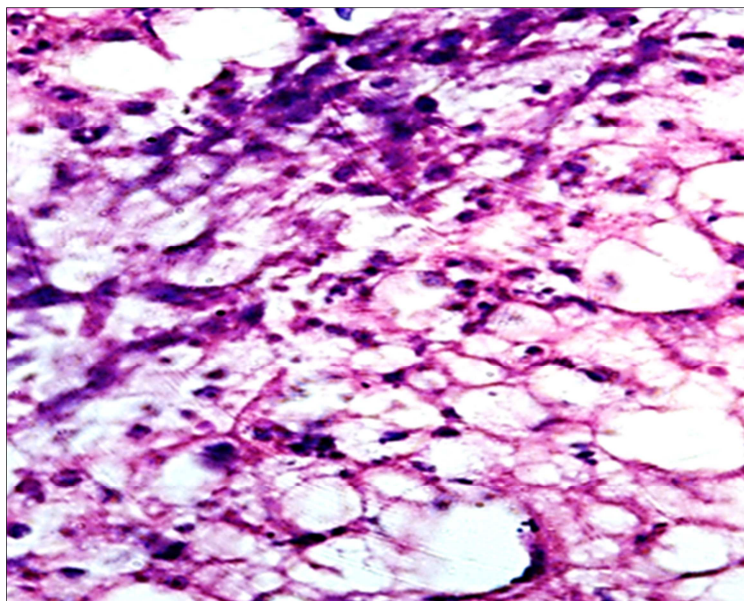


Рисунок 3. Участок жировой ткани с небольшим воспалительным инфильтратом в краях операционной раны. Отсутствие некротических масс. Серотонин и DSLET. Окраска гематоксилином и эозином. х 200.

К 7-м суткам на поверхности раны обнаруживается толстый слой грануляционной ткани, богатой фибробластами, макрофагами с примесью нейтрофилов. Имеются очаги скопления плотных новообразованных соединительнотканых волокон.

К 14-м суткам формируется плотная соединительная ткань, богатая зрелыми волокнистыми структурами (рис. 4).

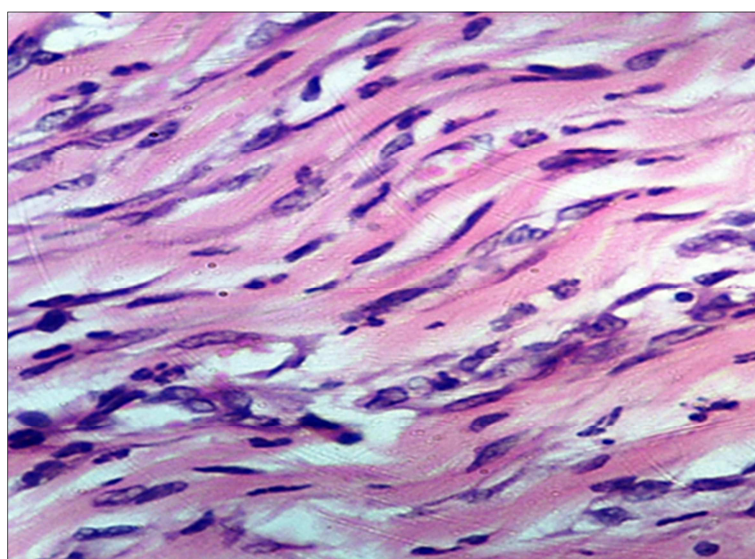


Рисунок 4. Сформировавшаяся соединительная ткань на месте холодовой раны. Окраска гематоксилином и эозином. х 400.

Таким образом, использование комбинации препаратов DSLET и серотонин позволяют морфологически (макроскопически) определять зону демаркации на 3-и сутки и проводить адекватную некрэктомию в пределах границ некроза. При микроскопическом исследовании на 3-и сутки некротические массы отсутствуют, имеются небольшие воспалительные клеточные инфильтраты. В краях раны формируется грануляционная ткань. К 7-м суткам слой грануляций утолщается, накапливаются плотные соединительнотканые волокна, к 14-м суткам формируется зрелая волокнистая соединительная ткань.

Большое значение в патогенезе холодовой травмы имеет цитокиновый статус, что подтверждается достоверным повышением уровня ИЛ-6 и ФНО- α в сыворотке крови экспериментальных животных контрольной группы.

Активная хирургическая тактика (некрэктомия) в сочетании с комбинированным лечением приводила к статистически достоверному снижению уровня ИЛ-6 на протяжении всего эксперимента, при этом обращает на себя внимание то, что на фоне комбинированной терапии уровень ИЛ-6 снижался до уровня интактных животных как на 7-е, так и на 14-е сутки эксперимента.

При оценке ФНО- α было получено, что комбинированное лечение приводило к статистически достоверному снижению данного показателя по сравнению с контрольной группой на 7-е и 14-е сутки исследования.

Следует отметить, что более быструю нормализацию уровня провоспалительных цитокинов в позднем реактивном периоде можно объяснить диссекцией зон воспаления, что приводило к снижению поступления цитокинов в общий кровоток из поражённых тканей после купирования спазма сосудов и подтверждалось снижением уровня провоспалительных цитокинов в 2 раза по сравнению с контрольной группой животных к 14-м суткам эксперимента.

Таким образом, было установлено благоприятное влияние комбинированного лечения животных с контактным отморожением после некрэктомии опиоидным пептидом DSLET и серотонинергическим средством серотонина адипинатом на показатели ИЛ-6 и ФНО- α .

Одним из основных и наиболее информативных критериев, характеризующих эффективность лечения, является оценка уровня летальности в ходе эксперимента. Нами был проведен анализ данного показателя во всех исследуемых группах животных.

Комбинированное использование препаратов DSLET и серотонина адипината на фоне активной хирургической тактики значительно сократило количество павших животных и, тем самым, снизило общую летальность с 30,0% в контрольной группе до 16,6% в группе животных, получавших комбинированное лечение.

Выводы

1. Морфологическое исследование подтвердило высокую органопротективную активность комбинированного лечения DSLET и серотонина адипинатом на фоне активной хирургической тактики, стимулирующую процессы регенерации и репарации.
2. В ходе исследований установлена эффективность коррекции контактного отморожения на фоне комбинированного применения DSLET и серотонина адипината в сочетании с активной хирургической тактикой, что подтверждается снижением уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ФНО- α) в 2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой.
3. Некрэктомия в сочетании с комбинированным лечением DSLET и серотонина адипинатом способствует максимальному снижению общей летальности с 30,0% в контрольной группе до 16,6% в группе животных, получавших комбинированное лечение.

Список литературы

1. Артющкова Е. В. Эндотелио- и кардиопротективные эффекты мельдония и триметазидина при L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции в эксперименте // Курский науч.-практ. вестн. «Человек и его здоровье». — 2010. - №3. — С. 5-10.
2. Бойко В. В. Изучение морфологических особенностей в тканях экспериментальных животных при моделировании холодовой травмы // Вестник морфологии. — 2010. - №16(3). — С. 526—528.
3. Горпинич А. Б. Применение серотонина адипината в лечении пациентов с критической ишемией нижних конечностей // Ученые записки Орловского государственного университета. Серия: Естественные, технические и медицинские науки. — 2008. - № 2. — С. 91-96.
4. Кузнецова Н. Л., Савкин А. Н. Комплексное обследование и варианты лечения пострадавших с холодовой травмой верхней конечности // Материалы I Междунар. конгресса «Современные технологии диагностики, лечения и реабилитации при повреждениях и заболеваниях верхней конечности». — Москва, 2007. — С. 56-57.
5. Imray C., Grieve A., Dhillon S. Cold damage to the extremities: frostbite and non-freezing cold injuries // Postgrad. Med. J. — 2009. — Vol.85, №1007. — P. 481-488.
6. Khalefa B. I., Mousa S. A., Shaqura M., Lackó E. Peripheral antinociceptive efficacy and potency of a novel opioid compound 14-O-MeM6SU in comparison to known peptide and non-peptide opioid agonists in a rat model of inflammatory pain. // Pharmacol. — 2013. — 713(1-3) — P. 54-57.

Рецензенты:

Бежин А.И., д.м.н. профессор, заведующий кафедрой оперативной хирургии и топографической анатомии им. профессора А.Д. Мясникова ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Курск.

Маль Г.С., д.м.н. профессор, зав. кафедрой фармакологии ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Курск.