

ДИНАМИКА РЕПАРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ ПЛЕНКИ С ЭРИТРОПОЭТИНОМ

Осиков М.В.¹, Симонян Е.В.¹, Голощапова Ж.А.², Саедгалина О.Т.¹, Бирюкова Т.И.¹

¹ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, e-mail: osaedgalina@mail.ru;

²ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины», Челябинск

Ожоги представляют актуальную медико-социальную проблему. В основе термической травмы (ТТ) лежит развитие местных и системных реакций организма на повреждение. Особый интерес при лечении ТТ представляет местное применение эритропозтина (ЭПО). Цель работы: исследовать динамику репаративных процессов при экспериментальной ТТ в условиях применения трансдермальной пленки с ЭПО. Эксперимент выполнен на 30 белых нелинейных половозрелых крысах массой 300±20 г. Исследования проводили на 3, 8 и 14-е сутки ТТ. ТТ IIIA степени площадью 4% моделировали путем погружения межлопаточной области крысы в горячую очищенную воду с температурой 98-99 °С на 12 с. Исследовали внешний вид раны, наличие отделяемого, состояние окружающей кожи, площадь раневого дефекта. Микроскопические исследования проводили на микроскопе LeikaDMRXA (Германия) с оценкой глубины повреждения кожи, реакции сосудистого русла, наличия и состава клеточного инфильтрата, сроков появления в ране грануляционной ткани, сроков эпителизации раны. Установлено, что при ТТ на 3-и и 8-е сутки эксперимента в очаге повреждения преобладают нейтрофилы. На 14-е сутки в очаге повреждения снижается представительство нейтрофилов и увеличивается – лимфоцитов и гистиоцитов. В динамике ТТ площадь ожога снижается и на 14-е сутки составляет 46% от исходной площади раны. Применение трансдермальной пленки с ЭПО при ТТ на 3, 8 и 14-е сутки наблюдения способствует сокращению площади ожога на 28, 37 и 78% соответственно, увеличивает скорость эпителизации ожоговой раны, приводит к замедлению снижения представительства полиморфноядерных лейкоцитов в очаге повреждения.

Ключевые слова: термическая травма, морфология, эритропозтин, трансдермальная пленка.

DYNAMICS OF REPARATIVE PROCESSES IN EXPERIMENTAL THERMAL INJURY IN THE APPLICATION OF TRANSDERMAL FILMS WITH ERYTHROPOIETIN

Osikov M.V.¹, Simonyan E.V.¹, Goloshchapova J.A.², Saedgalina O.T.¹, Biryukova T.I.¹

¹South Ural State Medical University, Chelyabinsk, e-mail: osaedgalina@mail.ru;

²A multidisciplinary center for laser surgery, Chelyabinsk

Burns injuries represent an actual medical and social problem, in the basis for the development of thermal injury (TI) is the development of local and systemic reactions to damage. Of special interest in the treatment of TI is local application of erythropoietin (EPO). Objective: to investigate the dynamics of reparative processes in experimental TI, with the application of transdermal films with the EPO. The experiment was performed on 30 white nonlinear Mature rats weighing 300±20 g. the study was performed at 3, 8 and 14 day TI. TI IIIA degree with an area of 4% was simulated by immersing the interscapular region in rats in the hot purified water with a temperature of 98-99°C with 12 s. Investigated the appearance of wounds, presence of discharge, state of surrounding skin, the area of the wound. Microscopic examination was carried out on microscope "LeikaDMRXA" (Germany) with the evaluation of the depth of skin damage, the reactions in the bloodstream, the presence and composition of cellular infiltrate, the timing of the appearance in the wound granulation tissue, timing wound epithelization. It is established that when TI on the 3 and 8 days of the experiment in the focus of damage is dominated by neutrophils. At day 14 the lesions reduced representation of neutrophils and increased lymphocytes and histiocytes. In the dynamics of the TI area of the burn is reduced and at day 14 is 46 % of the original area of the wound. The use of transdermal films with the EPO in TI on the 3, 8 and 14 days observation helps to reduce the area of the burn by 28, 37 and 78%, respectively, increases the rate of epithelialization of burn wounds leads to a slower decline representation of polymorphonuclear leukocytes in the lesions.

Keywords: thermal injury, morphology, erythropoietin, transdermal films

Ожоги представляют актуальную медико-социальную проблему, т.к. количество пострадавших от ожогов не имеет тенденции к снижению [7]. Термическая травма (ТТ)

занимает около 90% среди всех ожоговых повреждений [5]. В основе развития ТТ лежит развитие местных и системных реакций организма на повреждение, в т.ч. с участием факторов системы иммунобиологического надзора [4]. Возможность использования эндогенных регуляторов гомеостаза для лечения ожогов является объектом пристального внимания многих исследователей [2; 10]. Особый интерес при лечении ТТ представляет местное применение эритропоэтина (ЭПО), эффективность которого при системном воздействии была успешно продемонстрирована [8; 9]. **Цель работы** - исследовать динамику репаративных процессов при экспериментальной термической травме в условиях применения трансдермальной пленки с эритропоэтином.

Материалы и методы исследования. Эксперимент выполнен на 30 белых нелинейных половозрелых крысах массой 300 ± 20 г при строгом соблюдении требований по уходу и содержанию животных, а также выводу их из эксперимента с последующей утилизацией в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123 от 18.03.1986, Страсбург) [1]. Животные были случайным образом разделены на 3 группы: группа 1 ($n=10$) – контрольная-1, термическая травма с наложением асептической повязки; группа 2 ($n=10$) – контрольная-2, термическая травма с наложением трансдермальной пленки (ТДП) без действующего вещества и асептической повязки; группа 3 ($n=10$) – опытная, термическая травма с наложением ТДП с ЭПО и асептической повязки (ТДП ЭПО). перевязка проводилась ежедневно. Исследования проводили на 3, 8 и 14-е сутки после индукции ТТ.

ТТ IIIA степени и площадью около 3,25% моделировали путем погружения межлопаточной области крысы в горячую очищенную воду с температурой 98-99 °C на 12 с в условиях общей анестезии, вызванной внутримышечным введением препарата «Золетил 50» (МНН: тилетамина гидрохлорид (общий анестетик) и золазепам гидрохлорид (производное бензодиазепинов), VirbacSanteAnimale, Франция) в дозе 15 мг/кг. Через 24 часа после ТТ проводили иссечение некротизированных участков раны. Для макроскопической оценки состояния дефекта кожи после ТТ исследовали внешний вид раны, наличие отделяемого, выраженность отёка, состояние окружающей кожи. Для оценки динамики эпителизации измеряли площадь раневого дефекта методом цифровой планиметрии с использованием цифровой фотокамеры NikonCoolpixS2800 (Китай) и стандартного пакета программ Microsoft Office Visio [6]. Для расчета поверхности тела у крыс использовали формулу Мее-Рубнера в модификации Lee: $S = K \cdot W^{0,60}$, где S - поверхность тела в квадратных сантиметрах, K - коэффициент, равный 12,54, W - вес животного в граммах. По полученным данным вычисляли относительную площадь ожога в %. Наиболее важным показателем заживления ожоговой раны является ее эпителизация. Скорость эпителизации (VS)

рассчитывалась по формуле : $VS = S - S_n / t$, где S — начальная площадь раны до лечения (в дальнейшем площадь при предыдущем измерении); S_n — площадь при последующем измерении; t - число дней между измерениями. При этом площадь раны в последующих измерениях определяли в % за сутки, принимая за 100% площадь ожоговой раны до лечения.

Для исследований кожи в области повреждения использовали стандартные морфологические методики при окраске срезов гематоксилином и эозином и по методу Ван Гизона. Микроскопические исследования проводили на микроскопе LeikaDMRXA (Германия). Морфометрические исследования выполняли с помощью компьютерной программы анализа изображений «ДиаМорфCito-W» (Россия). Оценивали глубину повреждения кожи, реакцию сосудистого русла, наличие и состав клеточного инфильтрата, сроки появления в ране грануляционной ткани, сроки эпителизации раны. Морфологическими критериями ТТ IIIA степени являлось развитие коагуляционного некроза, распространяющегося до сосочкового слоя дермы. Результаты обрабатывали с использованием программы Statistica 10.0 forWindows. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием критериев Манна-Уитни, Вальда-Вольфовитца, Краскела-Уоллиса.

Результаты и их обсуждение. Результаты оценки морфологических критериев представлены в таблице 1. Установлено, что при ТТ на 3-и сутки эксперимента дно раны представлено сухим струпом, края раны ровные. Площадь раны составляет около 2,7%. Микроскопические исследования показали, что в ране отсутствует эпидермис, дно покрыто слоем коагулированных и вакуолизированных структур дермы, сохраняющих только их контуры и имеющих гематоксилинофильную окраску. Выражены отек стромы, стаз крови, кровоизлияния. Наблюдается слабая нейтрофильная инфильтрация стромы с выраженным рексисом ядер. В краях раны под сохранившимся эпидермисом наблюдается густая нейтрофильная инфильтрация, рексис ядер. В очаге преобладает количество нейтрофилов (около 63%), количество гистиоцитов составляет около 20,8%, а лимфоцитов – 12,7%.

На 8-е сутки ТТ площадь и скорость эпителизации статистически значимо не изменяются при сравнении с 3-ми сутками ТТ. В дне раны наблюдается однородного гематоксилинофильного вида ткань, местами сохраняющая контуры коагулированных коллагеновых волокон. Эта зона отделена от подлежащих слоев гиподермы узким слоем из нейтрофилов с рексисом их гиперхромных ядер. Среди жировой и мышечной ткани видны «языки» прорастающей грануляционной ткани. В краю раны под струпом наплывает на ее дно эпидермис с большим количеством слоев клеток (до 10). В этой зоне, покрытой

эпидермисом, видны волосяные фолликулы и сальные железы. Клеточный состав очага повреждения статистически значимо не изменяется при сравнении с 3-ми сутками ТТ.

На 14-е сутки ТТ площадь ожога сокращается примерно на 46%, соответственно этому ускоряется эпителизация. Дно раны представлено красно-розовыми мелкими сосудами, края раны ровные. На микропрепаратах в области дна раны видна грануляционная ткань, в которую замурованы фрагменты некротизированных мышечных волокон и островки жировой ткани. С краев раны, отодвигая струп, наползает на грануляционную ткань эпителиальный пласт с большим количеством слоев клеток (8-10). Под эпидермисом инфильтрат, состоящий из макрофагов, гистиоцитов, единичных нейтрофилов. В дне раны много коллагеновых волокон, располагающихся параллельно поверхности. Представительство клеток в очаге повреждения изменяется в пользу гистиоцитов. Наблюдается снижение количества нейтрофилов и увеличение - лимфоцитов.

Таблица 1

Морфологические показатели раны при экспериментальной ТТ (Ме (Q₂₅ -Q₇₅))

Показатели	Группа ТТ 3-и сутки	Группа ТТ 8-е сутки	Группа ТТ 14-е сутки
Площадь ожога, %	2,71(2,55-3,10)	2,77(2,64-2,77)	1,69(1,68-1,72)*
Скорость эпителизации	-	0,035(0,024-0,297)	0,179(0,169-0,182)*
Уменьшение площади раны, %	-	7,84(5,94-14,78)	46,39(40,65-47,83)*
Нейтрофилы, %	63,05(54,9-71,4)	65,90(58,10-70,80)	8,75(4,50-23,90)*
Лимфоциты, %	12,70(12,10-21,30)	6,20(5,00-9,60)	26,80(25,70-32,50)*
Гистиоциты, %	20,80(16,30-25,90)	26,35(15,00-35,70)	63,05(54,9-71,4)*

Примечание. * - значимые ($p < 0,05$) различия с группой ТТ 3-и сутки по критериям Манна-Уитни, Вальда-Вольфовитца, Краскела-Уоллиса.

Итак, в очаге ТТ на 3-8-е сутки наблюдения клеточный состав представлен преимущественно полиморфноядерными лейкоцитами, к 14-м суткам количество нейтрофилов снижается, возрастает содержание лимфоцитов и гистиоцитов. Такая смена клеточного состава очага повреждения при ТТ может быть связана с перераспределением клеток между очагом повреждения и системным кровотоком в различные стадии воспалительного процесса [3]. Заживление ожоговой раны сопровождалось постепенным уменьшением площади раневого дефекта и к 14-м суткам составило 46,4% в сравнении с исходной площадью раны.

В условиях местного применения ЭПО в составе ТДП на 3-и сутки ТТ площадь раны сокращается на 28% и растет скорость эпителизации (табл. 2). Дно раны покрыто струпом с обугленными тканевыми фрагментами, выражено расстройство кровоизлияния в виде отека, венозного полнокровия. Наблюдается слабая нейтрофильная инфильтрация подлежащих слоев подкожно-жировой клетчатки и мышц с рексисом ядер. В очаге увеличивается содержание нейтрофилов и снижается – лимфоцитов и гистиоцитов.

На 8-е сутки ТТ в условиях применения ТДП с ЭПО наблюдается сокращение площади ожога (около 37%) на фоне увеличения скорости эпителизации. С краев раны на дно наплзает эпителиальный пласт с регенерирующим эпителием (количество слоев клеток 6-8), отторгающий струп. В мышечной ткани наблюдаются участки с грануляционной тканью. Количество нейтрофилов и лимфоцитов в очаге ТТ статистически значимо не изменяется, количество гистиоцитов - увеличивается.

На 14-е сутки ТТ в условиях применения ТДП с ЭПО фиксируется сокращение площади ожога примерно на 78%, соответственно этому наблюдается увеличение скорости эпителизации. Дно раны покрыто эпидермисом, наблюдаются очаги грануляционной ткани в подлежащих тканях, единичные нейтрофилы (рисунок). Клеточный состав очага ТТ статистически значимо не изменяется за исключением нейтрофилов, представительство которых увеличено по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, при ТТ в условиях применения трансдермальной пленки с ЭПО ускоряются репаративные процессы в очаге повреждения: значимо при сравнении с контрольной группой уменьшается площадь раны, ускоряется ее эпителизация. При анализе клеточного состава очага повреждения в динамике ТТ обнаружено более медленное снижение представительства нейтрофилов. Полагаем, что ЭПО способствует сокращению площади ожога и скорости эпителизации преимущественно за счет изменения функциональной активности клеток, а не их количества в очаге термического повреждения. По данным Н. Sayan et al., ЭПО в условиях системного введения при повреждениях кожи ингибирует липидную пероксидацию, способствует высвобождению васкулярного эндотелиального фактора роста и образованию коллагена.

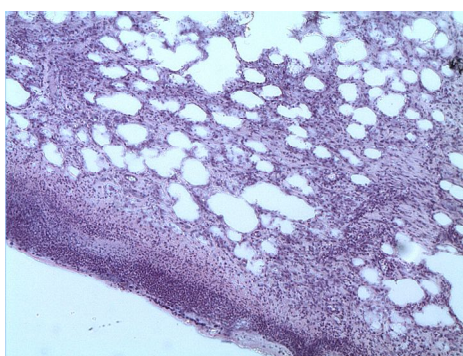
Таблица 2

Морфологические показатели раны при экспериментальной ТТ в условиях применения ТДП с ЭПО (Ме (Q₂₅ -Q₇₅))

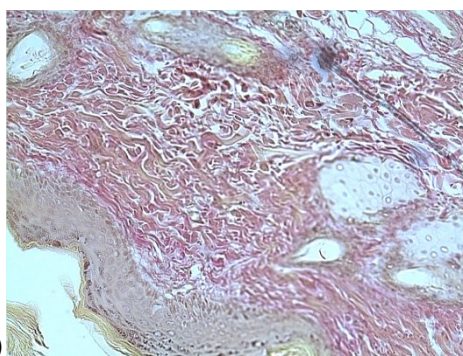
Показатели	Группа ТДП 3-и сутки	Группа ТДП ЭПО 3-и сутки	Группа ТДП 8-е сутки	Группа ТДП ЭПО 8-е сутки	Группа ТДП 14-е сутки	Группа ТДП ЭПО 14-е сутки
Площадь ожога, %	2,93 (2,86-	2,27 (2,14-2,79)#	2,60(2,24-2,72)	2,12(1,78-2,31)&	1,53(1,21-1,62)	0,69(0,63-1,00) \$

	3,05)					
Скорость эпителизации	0,089 (0,077-0,099)	0,18 (0,182-0,224) #	0,110(0,110-0,157)	0,113(0,089-0,121)	0,177(0,171-0,178)	0,189(0,154-0,238) \$
Уменьшение площади раны, %	12,42 (11,66-14,01)	28,57 (23,33-31,14) #	25,53(23,36-27,61)	37,71(33,3-42,66) &	57,72(56,17-60,76)	78,25(69,23-80,21)\$
Нейтрофилы, %	24,40 (11,40-47,20)	79,30 (78,70-82,50) #	65,35(46,40-86,55)	49,60(49,20-57,60)	16,25(10,40-22,30)	31,60(16,00-38,80) \$
Лимфоциты, %	62,80 (30,20-71,40)	15,70(12,40-16,40) #	19,65(9,55-28,95)	17,55(17,00-20,00)	29,50(26,10-33,80)	21,25(15,00-27,80)
Гистиоциты, %	17,10 (12,80-22,60)	5,10 (4,31-5,62) #	11,15(3,80-28,55)	29,60(26,90-34,40)&	56,40(51,00-63,10)	39,50(35,50-69,60)

Примечание. # - значимые ($p < 0,05$) различия с группой ТДП 3-и сутки, & - с группой ТДП 8-е сутки по критериям Манна–Уитни, Вальда–Вольфовитца, Краскела–Уоллиса.



а)



б)

Морфологическая картина дна раны на 14-е сутки ТТ: а) ТДП, увеличение $\times 100$, окраска гематоксилином и эозином; б) ТДП с ЭПО, увеличение $\times 200$, окраска гематоксилином и эозином

Выводы

1. При термической травме на 3-и и 8-е сутки эксперимента в очаге повреждения преобладают нейтрофилы. На 14-е сутки в очаге повреждения снижается представительство нейтрофилов и увеличивается – лимфоцитов и гистиоцитов. В динамике термической травмы площадь ожога снижается и на 14-е сутки составляет 46% от исходной площади раны.
2. Применение трансдермальной пленки с эритропоезином при термической травме на 3, 8 и 14-е сутки наблюдения способствует сокращению площади ожога на 28, 37 и 78% соответственно, увеличивает скорость эпителизации ожоговой раны, приводит к замедлению снижения представительства полиморфноядерных лейкоцитов в очаге повреждения.

Список литературы

1. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях // Сайт Совета Европы. – 2014. – 8 июня. – URL: <https://rm.coe.int/CoERMPublicCommonSearchServices/DisplayDCTMContent?documentId=090000168007аба8> (дата обращения: 28.12.16).
2. Осиков М.В., Телешева Л.Ф., Лихачева А.Г. Влияние локального применения эпидермального фактора роста на врожденный иммунитет и клеточный состав очага повреждения при экспериментальной термической травме // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2014. - Т. 157, № 3. - С. 280-283.
3. Телешева Л.Ф., Осиков М.В., Лихачева А.Г. Показатели врожденного иммунитета и морфология очага повреждения при экспериментальной термической травме // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 8-2. – С. 381-386.
4. Calum H. et al. Thermal injury induces impaired function in polymorphonuclear neutrophil granulocytes and reduced control of burn wound infection // Clinical and Experimental Immunology. – 2009. - № 156. – P. 102-110.
5. Ghanime G., Rizkallah N., Said J.M. Epidemiology of major burns at the Lebanese burn center in geitawi, Lebanon // Ann burns fire disasters. - 2013. - Vol. 26, № 2. - P. 59-62.
6. Joseph A. et al. Molnaruse of Standardized, Quantitative Digital Photography in a multicenterweb-based Study // Published January. – 2009. – № 12. – P. 19-26.
7. Rani M., Schwacha M.G. Aging and the pathogenic response to burn // Aging dis. - 2012. - Vol. 3, № 2. -P. 171-180.
8. Sandhi A., Wardhana A. The effect of erythropoietin administration in experimental burns wound healing: an animal study // Jurnal plastic rekonstruksi. - 2016. - Vol. 3, № 1. - P. 1-8.
9. Tobalem M. et al. Secondary burn progression decreased by erythropoietin // Critical care medicine. - 2013. - Vol. 41, № 4. - P. 963-971.
10. Wang J. et al. Improved scar in postburn patients following interferon- α 2b treatment is associated with decreased angiogenesis mediated by vascular endothelial cell growth factor // Journal of Interferon & Cytokine Research. - 2007. - Vol. 28, № 7. - P. 423-434.