

УДК 616-001.4-089.193.4

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОЖОГОВОЙ РАНЫ В УСЛОВИЯХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ

Могильная Г.М., Евглевский А.А.

Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения, Краснодар, e-mail: evglandr@mail.ru

Целью работы являлась оценка характеристики морфологических преобразований кожи и функционального статуса фибробластов в зоне ожоговой раны под влиянием супероксиддисмутазы. Для проведения исследования была создана модель ожоговой раны, возникающей при ожогах IIIa степени. В группе сравнения по периферии ожоговой поверхности (на границе визуально определяемой «интактной» кожи) подкожно вводили стерильный раствор препарата «Рексод» в концентрации 0,02 мг/кг, что соответствует 8000 ЕД/кг. Забор материала для гистологического исследования проводили на 1-е, 7-е, 14-е и 30-е сутки после отхождения струпа. Образцы тканей подвергали фиксации в 10%-ном нейтральном формалине. Проводку и заливку материала выполняли в процессорах фирмы Tissue-Tek VIP5Jr., (Япония). Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 10 микрон с использованием ротационного микротомы HM 340 E (MICROM Laborgerate GmbH, Германия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое выявление коллагена было проведено с использованием моноклональных антител к коллагену I и III типа (ABCAM, USA) и системы визуализации (Nikon eclipse 80i, Japan). Документирование результатов исследования осуществляли цифровой фотокамерой DCM-310. Полученные данные свидетельствуют, что использование супероксиддисмутазы стимулирует эффект эпителизации с изменением клеточного состава дермы и ее экстрацеллюлярного матрикса. Выявленные изменения дермы связаны с активацией фибробластов по пути синтеза ими коллагена с эффектом увеличения объема экстрацеллюлярного матрикса дермы.

Ключевые слова: ожоговая рана, коллаген, фибробласт, супероксиддисмутазы, экстрацеллюлярный матрикс.

MORPHOLOGICAL FEATURES OF THE BURN WOUND UNDER THE CONDITIONS OF THE USE OF RECOMBINANT SUPEROXIDE DISMUTASE

Mogilnaya G.M., Evglevsky A.A.

Kuban State Medical University Ministry of Health, Krasnodar, e-mail: evglandr@mail.ru

The aim of the work was to evaluate the characteristics of the morphological transformations of the skin and the functional status of fibroblasts in the area of the burn wound under the influence of superoxide dismutase. For the study, a model of a burn wound was created that occurs with burns of the IIIa degree. In the comparison group, along the periphery of the burn surface (on the border of the visually determined «intact» skin), a sterile solution of the drug «Rexod» was injected subcutaneously at a concentration of 0.02 mg/kg, which corresponds to 8000 IU/kg. The sampling of material for histological examination was carried out on the 1st, 7th, 14th and 30th day after the discharge of the scab. The tissue samples were fixed in 10% neutral formalin. The wiring and pouring of the material was performed in the processors of Tissue-Tek VIP5Jr., (Japan). Sections of 10 microns thick were made from paraffin blocks using a rotary microtome HM 340 E (MICROM Laborgerate GmbH, Germany). Sections were stained with hematoxylin and eosin. Immunohistochemical detection of collagen was performed using monoclonal antibodies to type I and III collagen (ABCAM, USA) and an imaging system (Nikon eclipse 80i, Japan). The study results were documented with a DCM-310 digital camera. The data obtained indicate that the use of superoxide dismutase stimulates the effect of epithelialization with a change in the cellular composition of the dermis and its extracellular matrix. The revealed changes in the dermis are associated with the activation of fibroblasts along the path of collagen synthesis by them with the effect of increasing the volume of the extracellular matrix of the dermis.

Keywords: burn wound, collagen, fibroblast, superoxide dismutase, extracellular matrix.

Вопрос о характере регуляции процесса регенерации кожи при ожоговых ранах остается актуальным. Регенерация кожи включает несколько фаз, отличающихся определенной стадийностью [1–3].

Так, в процессе заживления ожоговой раны выделяют гнойно-некротическую фазу (1–3-и сутки), которая характеризуется высоким уровнем бактериальной загрязненности, гиперемией области раны, отечностью тканей и активным противостоянием бактериальной флоре иммунной системы. Далее следует фаза грануляции, которая является периодом очистки раны от гнойно-некротических масс, сопровождающимся уменьшением и исчезновением отеков, подавлением бактериальной агрессии (4–14 суток), и, наконец, фазу эпителизации, в период которой происходят восстановление кожного покрова или формирование рубца и окончательное заживление раны (3–4 недели).

В ряде работ показана возможность использования для лечения ран антиоксидантов, которые могут обеспечивать эффект стимуляции процессов репаративной регенерации [4, 5]. Одним из возможных препаратов для лечения ожоговых поверхностей может быть препарат, изготовленный на основе рекомбинантной супероксиддисмутазы [6].

Цель исследования. Оценить характеристики морфологических преобразований кожи и функционального статуса фибробластов в зоне ожоговой раны под влиянием супероксиддисмутазы.

Материалы и методы исследования

Экспериментальное исследование выполнено на 20 самцах беспородных крыс массой 180–200 г (ПЛЖ «Рапполово» Ленинградской области). Животных содержали в виварии с регулируемым световым режимом и свободным доступом к пище и воде, что соответствует ГОСТу 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (приказ Федерального агентства по техрегулированию и метрологии от 20.11.2014 г. № 170-ст), а также Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных научных целей (ЕТ8 № 123; Страсбург, 18.03.1986 г.; <https://textarchive.ru/c-2022735-rall.html>). Содержание и дизайн исследований согласованы с Независимым этическим комитетом ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (протокол № 54 от 11.10.2017 г.). Исследование проводилось в течение 1,5 месяца. Обезболивание лабораторных крыс осуществляли с использованием ингаляционного наркоза (препарат «Севоран», Великобритания). Для моделирования ожоговой раны использовался латунный цилиндр площадью рабочей поверхности 706 мм², массой 300 г, нагретый до 100°C в кипящей воде, равномерность давления на всей площади контакта обеспечивалась собственной тяжестью цилиндра. После нагрева цилиндр извлекали из сосуда, удаляли остатки воды и прикладывали своей рабочей поверхностью к депилированной коже лабораторного животного на 15 секунд, что обеспечивало формирование ожога IIIa степени [7]. В зависимости от примененных воздействий все животные были разделены на две группы по 10 крыс в каждой. На раны контрольной группы крыс накладывали стерильную салфетку с

0,9%-ным раствором хлористого натрия. В группе сравнения по периферии ожоговой поверхности (на границе визуально определяемой «интактной» кожи) подкожно вводили стерильный раствор препарата супероксиддисмутазы (СОДМ) «Рексод» в концентрации 0,02 мг/кг, что соответствует 8000 ЕД/кг. Забор материала для гистологического исследования проводили на 1-е, 7-е, 14-е и 30-е сутки после отхождения струпа. Дополнительно однократно проводили забор материала для гистологического исследования из участков интактной кожи. Образцы тканей подвергали фиксации в 10%-ном нейтральном формалине. Проводку и заливку материала выполняли в процессорах фирмы Tissue-Tek VIP5Jr., (Япония). Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 10 микрон с использованием ротационного микротомы НМ 340 Е (MICROM Laborgerate GmbH, Германия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Визуальное изучение материала осуществляли с использованием светового микроскопа МББ-1А при суммарном увеличении $\times 100$, $\times 200$ и $\times 400$. Иммуногистохимическое выявление коллагена было проведено с использованием моноклональных антител к коллагену I и III типа (ABCAM, USA) и системы визуализации (Nikon eclipse 80i, Japan). Документирование результатов исследования осуществляли цифровой фотокамерой DCM-310.

Результаты исследования и их обсуждение

Изучение зоны ожога проведено в различные сроки, однако исходными были 1-е сутки после отторжения струпа. При изучении микропрепаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, оказалось, что поверхность повреждения не эпителизирована, а участок дермы заполнен большим числом фибробластов и плазматических клеток. На различных участках повреждения морфологический статус дермы варьировал от зон обширной мононуклеарной инфильтрации со значительным числом кровеносных сосудов, характеризующихся явлениями стаза эритроцитов и зон белковой имбибиции, до участков с относительно стабилизированным клеточным составом, но с небольшим количеством коллагеновых волокон (рис. 1).

Изучение микропрепаратов с использованием иммуногистохимических реакций на коллаген I показало, что в 1-е сутки после отторжения струпа эффект эпителизации в препаратах контроля (без введения СОДМ) отсутствует, а участок дермы содержит клетки фибробластического типа, обнаруживающие слабую реакцию на коллаген I типа. Клетки уплощены, окрашиваются слабо и диффузно. При этом в отдельных фибробластах, характеризующихся наличием значительного числа отростков, отмечается накопление проколлагена, цитоплазма таких клеток окрашена в коричневый цвет диффузно и умеренно. Среди фибробластов встречается большое число крупных макрофагов (рис. 2).

При использовании препарата СОДМ одноименный участок кожи характеризуется появлением положительной реакции на коллаген I типа на участке в зоне отторгнутого струпа, здесь слабо и диффузно окрашивается экстрацеллюлярный матрикс (рис. 3). В глубоких слоях дермы можно увидеть единичные фибробласты с высоким уровнем экспрессии коллагена I типа.

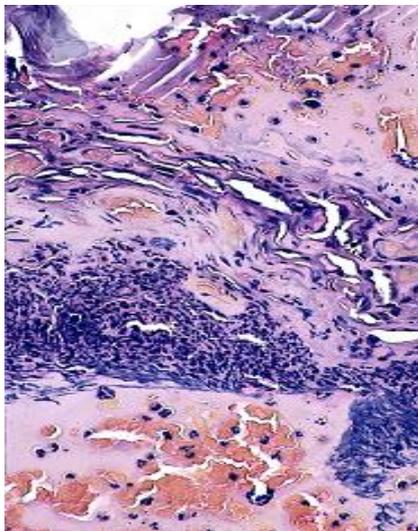


Рис. 1. Участок дермы в зоне ожоговой травмы на 1-е сутки после отхождения струпа (контроль, окраска гематоксилином и эозином. x400)

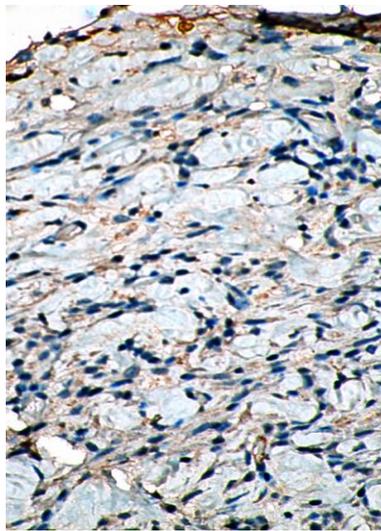


Рис. 2. Иммуногистохимическая реакция на коллаген I типа в фибробластах (контроль. 1-е сутки после отторжения струпа. x400)

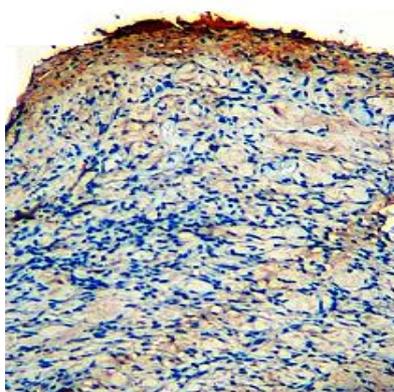


Рис. 3. Иммуногистохимическая реакция на коллаген I типа в зоне отторгнутого струпа (СОДМ 1-е сутки после отторжения струпа. x200)

Цитоплазма этих клеток окрашивается диффузно, и клетки определяются в виде клякс с четко очерченной поверхностью. В зоне экстрацеллюлярного матрикса видны тонкие фибриллы, экспрессирующие коллаген III типа (рис. 4). В случае введения препарата СОДМ отмечается появление отдельных участков с умеренным уровнем содержания коллагена III типа в зоне внеклеточного матрикса дермы. Клетки с высоким уровнем экспрессии коллагена III типа выявляются в глубоких слоях дермы. Здесь можно наблюдать участки с высоким содержанием коллагена и в зоне экстрацеллюлярного матрикса (рис. 5). Интересно, что эти участки окружены большим числом клеток фибробластического типа. Коллаген III с высокой степенью экспрессии появляется не только на поверхности зоны ожога, но и в глубине участка повреждения в виде очагов в экстрацеллюлярном матриксе.

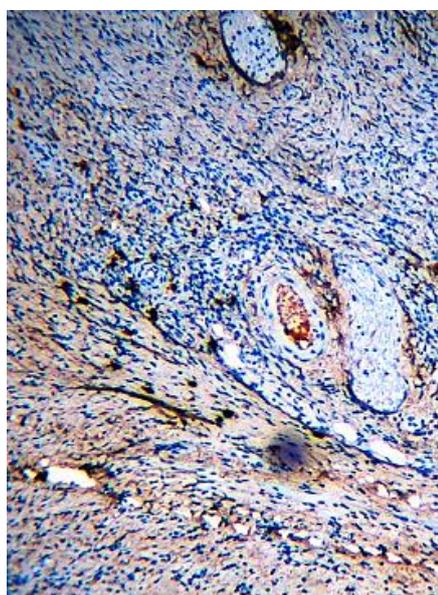


Рис. 4. Иммуногистохимическая реакция на коллаген III типа (контроль. 1-е сутки после отторжения струпа. x100)

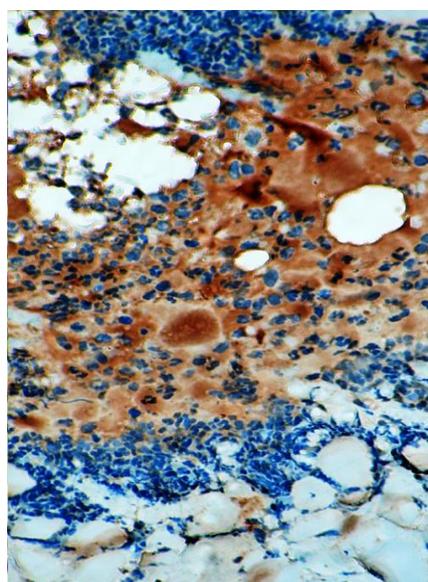


Рис. 5. Иммуногистохимическая реакция на коллаген III типа (СОДМ. 1-е сутки после отторжения струпа. x400)

В период, соответствующий 7-м суткам после отторжения струпа (или 21-й день после ожоговой травмы), у животных контрольной группы поверхность раны начинает эпителизоваться, при этом формируемый пласт имеет дифференцируемые слои. Граница между эпидермисом и дермой относительно ровная, базальная мембрана не определяется. Изменения в дерме к этому сроку связаны с появлением в ее поверхностной зоне большого числа коллагеновых волокон, имеющих вид достаточно плотных пучков. Капилляры по-прежнему полнокровны, явления стаза сохраняются, однако белковой имбибиции не наблюдается, а явления мононуклеарной инфильтрации весьма умеренны (рис. 6).

На 7-е сутки после отхождения струпа в контроле в зоне ожога отмечается эффект эпителизации поверхности. При этом реакция на коллаген I типа связана с

появлением в поверхностных слоях зоны ожога тонких фибриллярных структур, обнаруживающих умеренную экспрессию коллагена I типа. Прилежащая часть дермы содержит тонкие филаменты и уплотненные немногочисленные фибробласты с умеренным уровнем содержания коллагена I (рис. 7).

На фоне введения препарата СОДМ 7-е сутки репаративного процесса характеризуются наличием эпидермиса, в составе которого определяются все дифференцированные слои.

В случае лечения с использованием СОДМ интенсивность реакции отдельных компонентов дермы на коллаген I типа возрастает. При этом эффект увеличения экспрессии коллагена прослеживается как в поверхностной, так и в глубоких частях дермы. В других случаях увеличение экспрессии коллагена I типа происходило очагово на отдельных участках. Под действием СОДМ к 7-м суткам наблюдения выявляется резкое увеличение числа активных фибробластов (рис. 8). Клетки становятся крупными с большим числом отростков, т.е. с увеличением поверхности экзоцитоза. В цитоплазме этих клеток появляется большое число гранул, содержащих проколлаген.

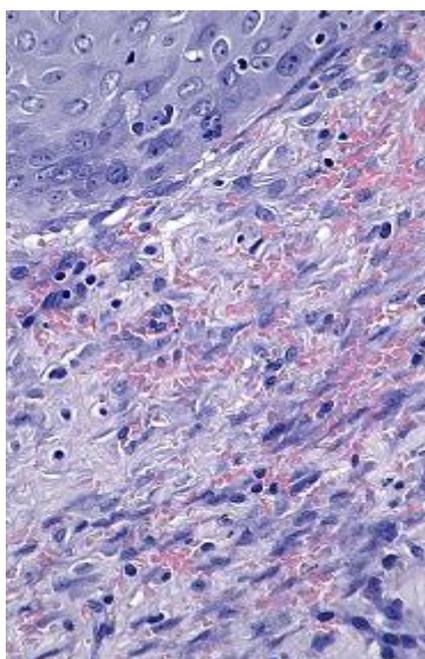


Рис. 6. Зона ожоговой травмы (контроль, 7-е сутки после отхождения струпа. Окраска гематоксилином и эозином. x200)

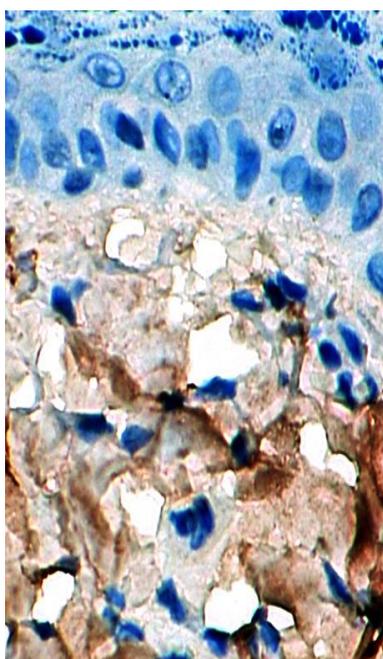


Рис. 7. Иммуногистохимическая реакция на коллаген I типа в поверхностной зоне. (контроль, 7-е сутки после отторжения струпа. x400)

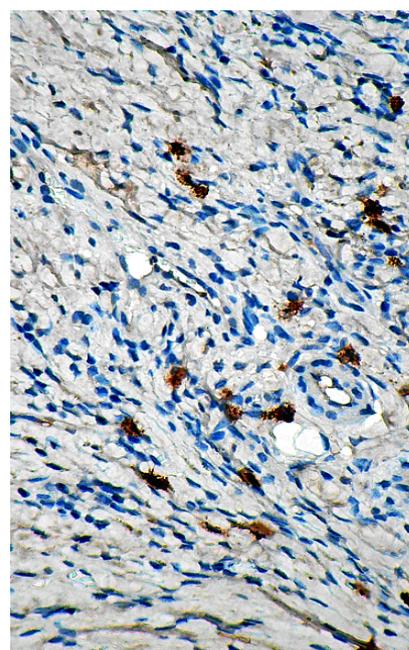


Рис. 8. Иммуногистохимическая реакция на коллаген I типа (СОДМ, 7-е сутки после отторжения струпа. x200)

На 7-е сутки после отторжения струпа при выявлении коллагена III типа ожоговый участок кожи контрольных животных характеризуется наличием хорошо выраженного

эпидермиса с четким делением его на дифференцированные слои. Участок дермы обнаруживает умеренную реакцию на коллаген III типа преимущественно в зоне экстрацеллюлярного матрикса, где отчетливо видны отдельные, нагруженные тропоколлагеном фибробласты (рис. 9). На участке с СОДМ в срок, соответствующий 7-м суткам, отмечается появление большого количества крупных активированных фибробластов. Отчетливо видно, что все клетки заполнены большим числом гранул, обнаруживающих высокую экспрессию коллагена III типа. В некоторых случаях обнаруживаются участки с высоким содержанием коллагена III типа в виде фибрилл, ассоциированных между собой с умеренной, а местами – с высокой экспрессией коллагена.

В некоторых случаях при избирательном выявлении коллагена III типа на фоне введения препарата, содержащего СОДМ, можно было наблюдать необычный очаговый характер его распределения (рис. 10).

На 14-е сутки эксперимента участок кожи контрольных животных покрыт эпидермисом. В зоне сосочкового слоя заметны тонкие волокна, обнаруживающие положительную реакцию на коллаген III типа. Здесь же встречались единичные фибробласты с узкой зоной цитоплазмы и низкой экспрессией коллагена III (рис. 11).

На фоне применения СОДМ – эпидермис широкий с большим числом клеток в составе герминативной зоны. Очень хорошо выражен зернистый слой, насчитывающий до 5 клеточных рядов. При этом клетки заполнены большим количеством гранул кератогиалина. Коллаген III типа выявлялся в виде тонких единичных фибрилл в зоне под эпидермисом. Местами обнаруживались мелкие лишённые отростков фибробласты с высоким уровнем экспрессии коллагена III типа (рис. 12).

На 30-е сутки в контрольных срезах определялся регенерированный эпидермальный пласт, сохраняющий эффект гиперплазии герминативного компартмента. Дерма под этим участком имела ровную границу, сосочки сглажены и неглубокие. Реакцию на коллаген III типа обнаруживали фибробласты, уровень экспрессии коллагена которых был достаточно высоким, а в отдельных клетках можно было увидеть единичные гранулы (рис. 13). Встречались фибробласты с неровными контурами за счет прилежащего к этим клеткам слабоокрашенного внеклеточного матрикса.

К 30-м суткам эксперимента на фоне введения препарата СОДМ граница между сосочковым и сетчатым слоями нивелируется. Дерма обнаруживает присутствие небольшого количества фибробластов с нечеткими размытыми границами, окружающий эти клетки экстрацеллюлярный матрикс окрашивается умеренно, а цитоплазма фибробластов – интенсивно (рис. 14).

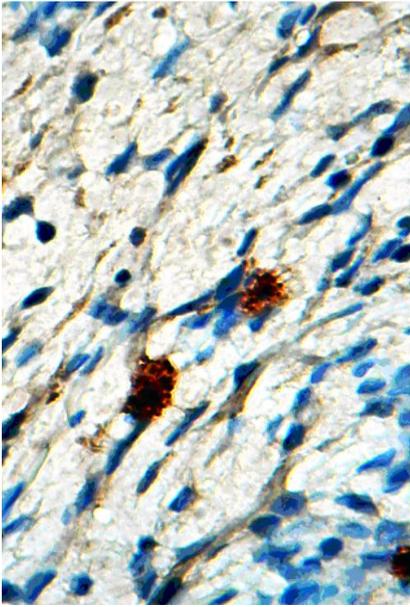


Рис. 9.
Иммуногистохимическая реакция на collagen коллагена III типа (контроль. 7-е сутки после отторжения струпа. x400)

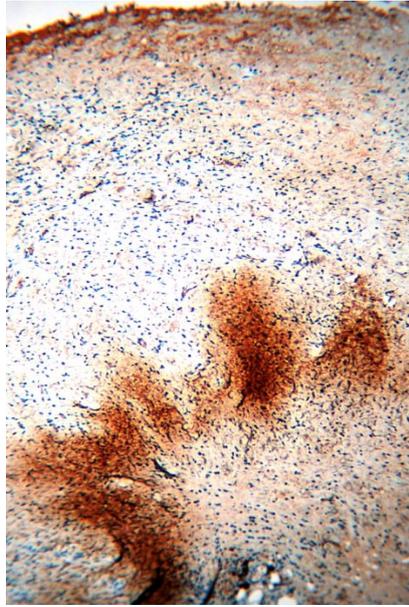


Рис. 10.
Иммуногистохимическая реакция на collagen III типа (СОДМ. 7-е сутки после отторжения струпа. x100)

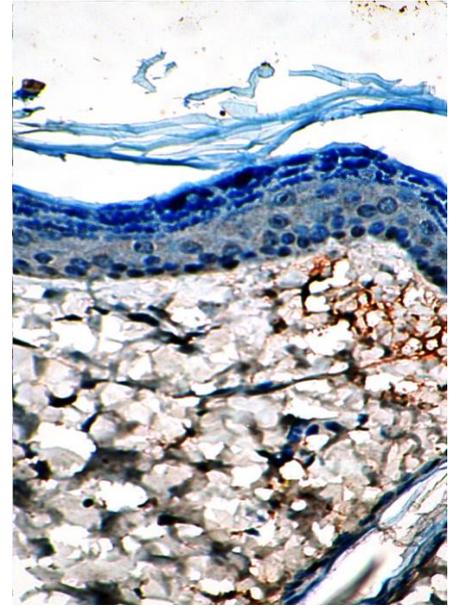


Рис. 11.
Иммуногистохимическая реакция на collagen III типа (контроль. 14-е сутки после отхождения струпа. x400)

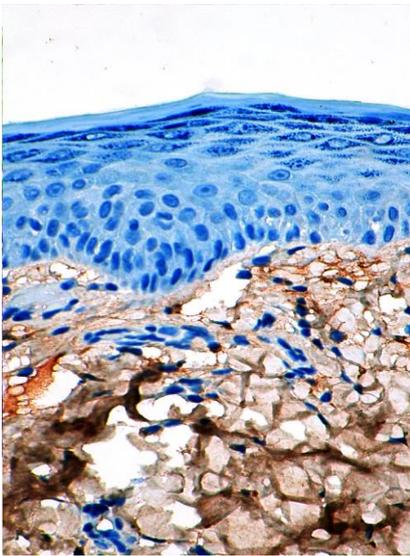


Рис. 12.
Иммуногистохимическая реакция на collagen III типа (СОДМ. 14-е сутки после отхождения струпа. x400)

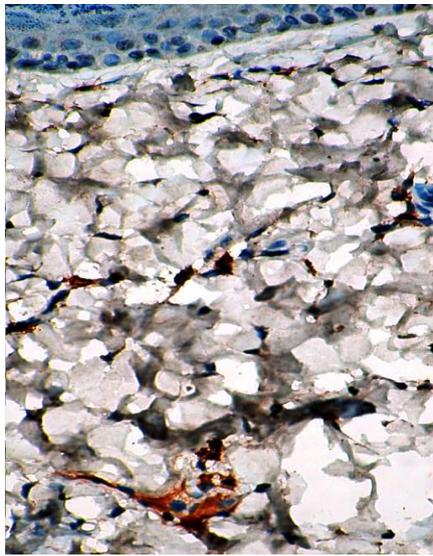


Рис. 13.
Иммуногистохимическая реакция на collagen III типа (контроль. 30-е сутки после отхождения струпа. x400)

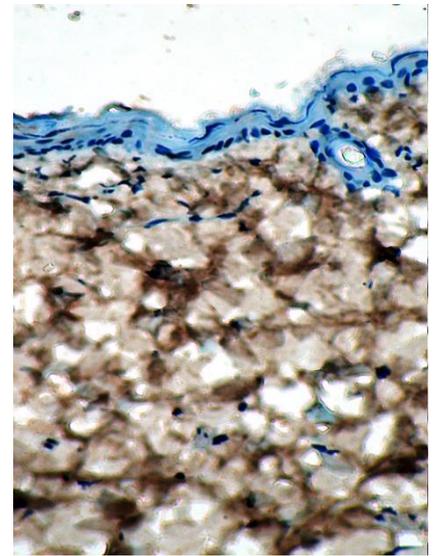


Рис. 14.
Иммуногистохимическая реакция на collagen III типа (СОДМ. 30-е сутки после отхождения струпа. x400)

Известно, что в процессе заживления ожоговой раны выделяют три его фазы [8], среди которых: первая воспалительная, характеризующаяся вазодилатацией и отеком; вторая – пролиферативная фаза с эффектом сближения краев раны и реваскуляризацией; третья фаза – ремоделирование с заживлением зоны повреждения и формированием рубца. Перечисленные процессы ремоделирования протекают за счет биосинтеза коллагена и эластина, а также пролиферации фибробластов с трансформацией последних в миофибробласты. Суммируя вышесказанное, результаты проведенного нами исследования укладываются во вторую и третью его фазы.

Поскольку морфологическое изучение зоны повреждения проведено после отторжения струпа, то срок изучения – 1 сутки – соответствует 2 неделям после ожога. При этом эффект эпителизации зоны ожога и в контроле, и в эксперименте еще отсутствует.

В 1-е сутки после отторжения струпа под влиянием препарата, содержащего СОДМ, по сравнению с контролем происходят резкое увеличение в зоне повреждения числа клеток макрофагального и фибробластического рядов и существенная нормализация гемодинамики, выражающаяся в уменьшении явлений межтучного отека тканей, отсутствии белковой имbibиции, уменьшении явлений стаза в кровеносных сосудах.

Участок дермы после введения препарата, содержащего СОДМ, обнаруживал наличие клеточных элементов типа макрофагов и фибробластов, в составе последних выявлялись гранулы проколлагена, а окружающие их участки экстрацеллюлярного матрикса характеризовались экспрессией коллагена III типа.

На 7-е сутки исследования и в контроле, и в эксперименте при использовании препарата, содержащего СОДМ, имеет место эпителизация. Эпидермис характеризуется наличием четко выраженных клеточных рядов с большим количеством базофильно окрашенных клеток в зоне герминативного компартмента. По периферии ожогового повреждения формируется грануляционная ткань. Однотипные очаги с большим количеством клеток видны и в центре зоны повреждения. На 14-е сутки эксперимента зона герминативного компартмента сохраняет значительное число базофильных (активированных) клеток, а зернистый слой характеризуется присутствием крупных клеток, заполненных большим числом кератогиалина.

В дерме увеличивается число фибрилл, экспрессирующих коллаген I типа. Здесь выявляется много фибробластов с высоким уровнем экспрессии коллагена I. При этом в зоне вокруг фибробластов можно увидеть коллаген III типа.

На 30-е сутки эксперимента и эпидермис и дерма могут интерпретироваться как участок кожи, завершивший процесс регенерации. Использование препарата, содержащего СОДМ, сопровождалось формированием в зоне очага повреждения более широкого слоя

эпидермиса, а в зоне дермы к этому времени появлялись упорядоченно расположенные коллагеновые волокна и большое число клеток фибробластического ряда. Объем герминативного компартмента снижался, а в дерме уменьшалось число фибробластов. Остающиеся фибробласты были крупными клетками с нечетко выраженными границами и с высокой степенью экспрессии коллагена III типа вокруг них.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют, что использование препарата, содержащего СОДМ, стимулирует эффект эпителизации и изменение клеточного состава дермы и ее экстрацеллюлярного матрикса. Выявленные изменения дермы связаны с активацией фибробластов по пути синтеза ими коллагена с эффектом увеличения объема экстрацеллюлярного матрикса. К 30-м суткам на фоне введения препарата, содержащего СОДМ, эффект заживления завершается, тогда как у животных контрольной группы сохраняются отдельные участки, не восстановившие целостность.

Список литературы

1. Verena Schneider, Daniel Kruse, Ives Bernardelli de Mattos, Saskia Zöphel, Kendra-Kathrin Tiltmann Amelie Reigl, Sarah Khan, Martin Funk, Karl Bodenschatz and Florian Groeber-Becke. A 3D In Vitro Model for BurnWounds: Monitoring of Regeneration on the Epiderma Level. *Biomedicines*. 2021. vol. 9. no. 9. P.1135-1153. DOI: 10.3390/biomedicines9091153.
2. Donati G., Watt F.M. Stem cell heterogeneity and plasticity in epithelia. *Cell Stem Cell*. 2015. vol. 16. no. 5. P.465-476. DOI: 10.1016/j.stem.2015.04.014.
3. Shpichka A., Butnaru D, Bezrukov E.,Roman B., Sukhanov A.A., BurdukovskiiSkin tissue regeneration for burn injury. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019. vol. 10. P. 1-16. DOI: 10.1186/s13287-019-1203-3.
4. Олифирова О.С., Козка А.А. Значение антиоксидантов и гипербарической оксигенации в лечении ожоговых ран // *Новости хирургии*. 2017. Т. 25. № 2. С. 148-154.
5. Козка А.А., Олифирова О.С. Антиоксиданты и гипербарическая оксигенация в комплексном лечении больных с глубокими ожогами // *Практ Медицина*. 2015. Т. 6. С.112-115.
6. Гулевская О.Н., Селецкая В.В., Зеленская А.В., Хананашвили Я.А., Нефедов Д.А., Галенко-Ярошевский П.А., Шахмарданова С.А. Антиоксиданты: классификация, фармакотерапевтические свойства, использование в практической медицине // *ЖФМиБ*. 2016. № 3. С. 3-15.

7. Павленко С.Г., Шаблин Д.В., Хуранов А.А., Зобенко В.Я., Евглевский А.А. Приспособление для моделирования экспериментальной ожоговой раны на животном // Патент на полезную модель № 151026, зарегистрирован 11.02.2015 г. Патентообладатели: Павленко С.Г., Шаблин Д.В.
8. Adam J. Singer, Steven T. Boyce. Burn Wound Healing and Tissue Engineering. J. Burn Care Res. 2017. vol. 38. no. 3. P. 605–613. DOI: 10.1097/BCR.0000000000000538.