

ЗАЖИВЛЕНИЕ ОЖГОВЫХ РАН ПРИ ПРИМЕНЕНИИ АЛЛОГЕННЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Предотвращение рубцовой деформации век, являющейся последствием травмы или ожогов, является актуальной проблемой в офтальмохирургии. Для понимания механизмов регенерации тканей после реконструктивных операций век с использованием аллогенных биоматериалов представляется интересным в эксперименте сравнение с динамикой заживления ожоговых ран без лечения и с репаративными процессами после применения традиционных лекарственных средств (актовегина).

Эксперимент проведен на 84 белых крысах-самцах линии Вистар. Моделировали термический ожог кожи. В контрольной группе крыс без лечения заживление ожоговой раны происходило с длительным сохранением струпа, запоздалой эпителизацией и торможением процесса созревания новообразованной соединительной ткани вследствие выраженных воспалительных процессов. Репаративная регенерация была неполной с формированием грубой рубцовой ткани. Во второй контрольной группе животных при лечении актовегином эпителизация происходила быстрее, но отмечалось торможение процессов регенерации в дермальной пластинке кожи. Воспалительные процессы преобладали над репаративными, грануляционная ткань длительно оставалась незрелой и в итоге также подвергалась грубому рубцеванию. В опытных группах животных, которым в пораженной зоне проводили подкожное введение диспергированных биоматериалов (изготовленных из дермы кожи и сухожилий) отмечалась быстрая пролиферация эпителиального слоя, ограничение некротических масс и быстрая десквамация струпа. Грануляционная ткань созревала и формировала собственную соединительнотканную пластинку кожи, почти идентичную по структуре неповрежденной ткани.

Установлено, что использование аллогенных биоматериалов при заживлении термических ожогов кожи приводит к ускорению эпителизации и полному закрытию дефекта. В процессе репарации тканей биоматериалы ингибируют формирование грубого рубца.

Ключевые слова: моделирование ожога кожи, аллогенные биоматериалы, регенерация, ингибитор рубца.

Актуальность

Предотвращение рубцовой деформации век, являющейся последствием их травмы или ожогов, является актуальной проблемой в офтальмохирургии [6]. Для восстановления анатомического положения века после тяжелых травм и ожогов многие годы весьма успешно используются аллогенные биоматериалы «Аллоплант для каркасной пластики век» (из аллогенной дермы кожи – ДК) и «Аллосухожильные нити» (из аллогенных сухожилий – АС) для фиксирующей пластики, изготавливаемые в лаборатории консервации тканей ФГБУ ВЦГПХ МЗ РФ [1], [2], [4]. Для понимания механизмов регенерации тканей после реконструктивных операций представляется интересным в эксперименте сравнение динамики заживления ожоговых ран при применении аллогенных биоматериалов и традиционных лекарственных средств.

Цель настоящего исследования

Гистологическими методами оценить влияние аллогенных биоматериалов на качество заживления ожоговых ран кожи.

Материал и методы исследования

Исследование проводилось на 84 белых крысах-самцах линии Вистар 6-месячного возраста с массой тела 250–300 г. Эксперименты на животных выполнялись с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минвуза от 13 ноября 1984 г. № 742).

Так как ранее выполненные исследования показали, что регулирующее влияние на регенеративные процессы в тканях при применении аллогенных биоматериалов оказывают их компоненты и экстрагируемые из них вещества, для проведения экспериментов были использованы диспергированные формы аллогенных биоматериалов [3]. В лаборатории консервации тканей ВЦГПХ из дермы кожи и сухожилий крыс по технологии Аллоплант® были изготовлены инъекционные формы диспергированных аллогенных биоматериалов.

Ожоговые раны кожи у крыс создавали с помощью бытового электрического паяльника (220 В) мощностью 100 Вт [5]. Животным под эфирным наркозом в межлопаточной области

спины сбривали шерсть и прикасались паяльником на 10 секунд, создавая при этом ожоговую рану площадью, соответствующей площади прикосновения паяльника (320 мм²). Манипуляции проводили под эфирным наркозом. После моделирования ожоговой раны кожи животные были распределены на группы: 1 контрольная группа – спонтанная регенерация без лечения; 2 контрольная группа – на 3 сутки после моделирования ожога подкожное введение в зоне поражения препарата актовегина; 3 опытная группа – на 3 сутки после моделирования ожога подкожное введение в зоне поражения аллогенного биоматериала, изготовленного из дермы кожи крыс по технологии Аллоплант; 4 опытная группа – на 3 сутки после моделирования ожога подкожное введение в зоне поражения аллогенного биоматериала, изготовленного из сухожилий крыс.

Объектом морфологического исследования стали фрагменты кожных покровов в области термического ожога. Забор материала производился на 4, 7, 14, 21, 30, 60 и 120 сутки после введения актовегина и аллогенных биоматериалов.

Материал фиксировали в 10 % нейтральном формалине и заливали в парафин по общепринятым стандартным методикам. Срезы готовили на микротоме LEICA (Германия) и окрашивали гематоксилином и эозином, по методу Ван-Гизон, по Маллори, по Вейгерту на эластин. Микроскопические исследования и фотографирование проводились с использованием светового микроскопа LEICA DMD-108 (Германия).

Результаты исследования и их обсуждение

В 1-ой контрольной группе крыс даже на 14-е сутки эксперимента в зоне термического ожога эпителиальный слой кожи не восстанавливался. Лишь с периферии под струпом определялась небольшая зона растущего эпителия. Выявлялись скопления гнойного экссудата с распространением его на прилегающую грануляционную ткань, которая была представлена многочисленными тонкими соединительнотканными волокнами, большим количеством мелких сосудов капиллярного типа и скоплением различных клеток: макрофагов,

лимфоцитов, фибробластических и малодифференцированных клеток.

Только лишь через месяц зона термического поражения покрывалась эпителиальным пластом неравномерной толщины, причем над ним частично сохранялся струп. В грануляционной ткани вследствие продолжающихся воспалительных процессов клеточные элементы продолжали преобладать над волокнистыми. Через два месяца под эпидермальным слоем определялась бессосудистая плотная рубцовая ткань, которая спустя 4 месяца сохранялась в виде грубой фиброзной ткани с большим количеством фиброцитов (рис. 1, цветная вкладка). В сформировавшемся регенерате элементы придатков кожи, а именно сальные железы и волосяные фолликулы не восстанавливались. При окраске гистологических препаратов по Вейгерту на эластин в отличие от окружающей неповрежденной дермы в рубцовом регенерате полностью отсутствовали эластические волокна.

В отличие от первой контрольной группы крыс во второй контрольной группе (введение актовегина) на 7 сутки после начала лечения с периферии раны со стороны неповрежденной кожи под струпом неравномерным пластом начинал прорастать эпителий. На 14-й день эксперимента зона термического воздействия полностью была покрыта эпителиальным слоем разной толщины. Под ним выявлялась широкая полоса грануляционной ткани с избытком тонких разнонаправленных коллагеновых волокон, между которыми просматривалось множество клеток: макрофагов, лимфоцитов, фибробластических клеток разной степени зрелости и крупных малодифференцированных клеток. Через месяц зона ожога была покрыта эпидермисом неравномерной толщины с очагами гиперпролиферации с формированием акантоэпителиальных разрастаний, количество рядов клеток в них колебалось от четырех–пяти до шести–восьми. Соединительнотканый регенерат состоял частично из плотной рубцовой ткани и частично из волокнистой соединительной ткани, формирующейся из слабо и умеренно фуксинофильных пучков коллагеновых волокон, интенсивно инфильтрированных клеточными элементами. Спустя 2 и 4 месяца морфологическая картина в зоне ожога кожи крыс была примерно одинаковой. Под эпителиальным слоем вплоть до

гиподермы выявлялась широкая полоса грубой рубцовой ткани (рис. 2, цветная вкладка).

Сальные, потовые железы и волосяные фолликулы не восстанавливались. Роговой слой эпидермиса интенсивно слущивался. В образовавшемся плотном соединительнотканном регенерате эластические волокна, так же как и в предыдущей контрольной группе, не выявлялись.

В третьей группе животных (подкожное введение биоматериала, изготовленного из дермы кожи – ДК) и в четвертой группе (подкожное введение биоматериала, изготовленного из сухожилий крыс – АС) выявленная морфологическая картина на гистологических препаратах кожи, подвергшейся термическому воздействию, во все сроки эксперимента была идентичной. На 4 сутки после введения биоматериалов под некротически измененными тканями определялась довольно широкая зона перифокального воспаления. В самых глубоких слоях дермальной пластинки кожи и подлежащей гиподерме выявлялись признаки умеренно выраженного отека тканей, расширение и полнокровие отдельных сосудов. Такая же сосудистая реакция проявлялась в мышечном слое и фасциальной прослойке, в которой введенные частицы биоматериала инфильтрировались макрофагами, мало дифференцированными и фибробластическими клетками. Биоматериал интенсивно лизировался и резорбировался довольно многочисленными макрофагальными клетками. Менялись тинкториальные свойства частиц биоматериала, ярко-красные первоначально, в результате лизиса они приобретали желтоватые оттенки.

Через 7 суток после подкожного введения аллогенного биоматериала под струп по всей пораженной поверхности кожи прорастал пролиферирующий эпителий. Струп почти полностью десквамировался. В глубоких слоях дермальной пластинки и в гиподерме отечность исчезала, кровеносные сосуды несколько сужались. Пласт грануляционной ткани состоял из многочисленных новообразованных тонких коллагеновых волокон, между которыми выявлялось большое количество тонкостенных мелких сосудов капиллярного типа и клеток фибробластического ряда.

На 14 сутки соединительнотканый регенерат становился более плотным. При больших увеличениях микроскопа было четко видно,

что в сформированном регенерате волокнистые структуры преобладают над клеточными элементами – фибробластами. Эти признаки указывали на высокую степень зрелости грануляционной ткани. Многочисленные сосуды грануляционной ткани подвергались редукции, оставалось лишь небольшое количество функционирующих капилляров. Подлежащие под регенератом ткани имели нормальное строение, в том числе и фасциальная прослойка, в которой большинство частиц биоматериала резорбировалось и замещалось тонкими коллагеновыми волокнами.

Спустя месяц сформированная дермальная пластинка большей частью была представлена зрелой волокнистой соединительной тканью, состоящей из фуксинофильных пучков коллагеновых волокон, инфильтрированных фибробластическими клетками. Ровный слой покрывающего его многослойного ороговевающего эпителия лежал на четко выраженной тонкой базальной мембране. Эпидермис дифференцировался на слои (базальный, шиповатый и роговой). На 60 сутки структура соединительнотканного регенерата отличалась от структуры дермальной пластинки в непораженных участках кожи тем, что ход пучков коллагеновых волокон был более однонаправленный. Сальные и потовые железы, а также волосяные фолликулы, в зоне регенерации пораженной кожи крыс не выявлялись. Кровеносные сосуды в подлежащих тканях имели обычное строение.

Через четыре месяца с начала эксперимента пораженные участки кожи визуально отличались от окружающих тканей более редким волосным покровом. На гистологических препаратах одинаковой толщины многослойный эпителий, лежащий на ровной базальной мембране, четко дифференцировался на слои – базальный, шиповатый и роговой. Под ним определялась широкая дермальная пластинка из довольно плотно упакованных пучков коллагеновых волокон, между которыми просматривались фибробластические клетки, гистиоциты, редкие мелкие кровеносные сосуды (рис. 3а, цветная вкладка). Ход пучков коллагеновых волокон сформированного регенерата продолжал отличаться от таковой дермы в непораженных участках кожи однонаправленностью, и волокнистые пучки лежали плотнее (рис. 3б, цветная вкладка). Признаки

воспалительных реакций в подлежащих тканях вокруг регенерата отсутствовали. Придатки кожи (сальные, потовые железы, волосяные фолликулы) восстанавливались лишь в участках с сохранившимися в глубоких слоях дермы волосяными луковицами и хотя бы с частью желез (рис. 4, цветная вкладка).

При окраске по Вейгерту на эластин среди пучков коллагеновых волокон обнаруживались редкие тонкие эластические волокна синего цвета. Большой частью они определялись ближе к полностью восстановившемуся эпителиальному слою.

При оценке нами процессов регенерации основными критериями стали следующие гистологические показатели: степень отторжения струпа над регенерирующей поверхностью кожи, полнота эпителизации раневой поверхности, степень зрелости сформировавшейся грануляционной ткани по соотношению клеточных и волокнистых элементов. Исходя из этого, можно сделать заключение, что заживление ожоговой раны у крыс контрольной группы, не получавших лечение, происходило с длительным сохранением струпа, запоздалой эпителизацией в сочетании с торможением процесса созревания новообразованной соединительной ткани вследствие продолжающихся воспалительных явлений. Репаративная регенерация протекала по типу неполной с формированием грубой руб-

цовой ткани. В контрольной группе животных, где ожоговые раны лечились одним из традиционных лекарств – актовегином, эпителизация происходила быстрее, но отмечалось торможение процессов регенерации под эпителием в дермальной пластинке кожи. Воспалительные явления при этом превалировали над репаративными, грануляционная ткань длительно оставалась незрелой и в конечном итоге также подвергалась рубцеванию. В опытных группах животных, где для лечения применялись аллогенные биоматериалы (вне зависимости от вида биоматериала), течение процесса восстановления интенсифицировалось. Отмечалась быстрая пролиферация эпителиального слоя, отграничение некротических масс и быстрая десквамация сформировавшегося струпа. Грануляционная ткань под новым эпителием на фоне стихания воспаления созревала, формируя собственную соединительнотканную пластинку кожи, почти идентичную по структуре неповрежденной ткани, только лишь частично с отсутствием элементов придатков кожи.

Таким образом, результаты экспериментально-морфологического исследования доказывают, что при заживлении ожоговых ран кожи аллогенные биоматериалы ингибируют грубое рубцевание новообразованных тканей и способствуют формированию структурно-функционального регенерата.

10.09.2015

Список литературы:

1. Галимова В.У., Кульбаев Н.Д., Нураева А.Б. Реконструктивные операции при посттравматических деформациях век // Вестник ОГУ. – 2011. – №14. – С.86-87.
2. Мулдашев Э.Р., Нураева А.Б., Галимова В.У., Салихов А.Ю. Способ хирургического лечения рубцового выворота нижнего века // Авторское свидетельство на изобретение № 2248193. – 2005.
3. Муслимов, С.А. Морфологические аспекты регенеративной хирургии. – Уфа: Башкортостан, 2000. – 168 с.
4. Нураева А.Б. Восстановительная хирургия при последствиях травм и ожогов век // Вестник ОГУ. – 2010. – №12. – С.168-169.
5. Шин Ф.Е., Стрельников П.И., Странадко Е.Ф. Фотодинамическая терапия экспериментальных ожоговых ран // Лазерная медицина. – 2009. – № 13. – С.55-60.
6. Malhotra R, Sheikh I, Dheansa B. The management of eyelid burns // Surv. Ophthalmol. – 2009. – №54. – P. 356 – 371.

Сведения об авторах:

Мусина Ляля Ахияровна, ведущий научный сотрудник отдела морфологии Всероссийского центра глазной и пластической хирургии, доктор биологических наук, e-mail: morphoplant@mail.ru

Нураева Айгуль Булатовна, заведующий отделением Всероссийского центра глазной и пластической хирургии, кандидат медицинских наук, офтальмохирург, e-mail: a.nuraeva@mail.ru

450075, г. Уфа, ул. Р. Зорге, 67/1