

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕГЕНЕРАЦИИ ОЖГОВЫХ РАН ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СУПЕРНАТАНТА СПЛАВА НИКЕЛИДА ТИТАНА

Р. М. Урузбаев, Л. В. Вихарева

С целью оценки репаративного действия супернатанта сплава никелида титана при ожоговых ранах проведен морфологический анализ выраженности репаративных реакций в трех группах сирийских хомяков ($n = 81$): группа интактных животных, не подвергавшихся термическому воздействию ($n = 21$); контрольная группа – животные с ожоговой раной без лечебного воздействия ($n = 30$); опытная группа – животные с обработкой ожоговой раны супернатантом сплава никелида титана ($n = 30$). Выявлено выраженное ускорение репаративных процессов и статистически значимое снижение выраженности проявлений воспалительной реакции, что позволяет оценивать применение супернатанта никелида титана как эффективный способ восстановления ожоговой раны.

Ключевые слова: кожа, термический ожог, никелид титан, супернатант.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых подходов и средств в лечении ожоговых ран продолжает оставаться важной, поскольку при существовании в настоящее время большого количества различных перевязочных материалов отсутствуют препараты, которые не только бы ускоряли процесс заживления, но и предупреждали инфицирование ожоговой поверхности [1–2]. На протяжении нескольких десятилетий сплав никелида титана, обладающий эффектом «памяти формы», успешно применяется не только в травматологии, стоматологии, хирургии, но и других областях медицины [3–4]. Данные о применении супернатанта никелида титана в лечении ожоговых ран в литературе отсутствуют, что и инициировало организацию и проведение экспериментального исследования как метода изучения механизмов действия новых препаратов и способов лечения.

Цель работы – оценка репаративного действия супернатанта сплава никелида титана и выраженности репаративных реакций при ожоговой ране по данным морфологического анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Морфологический анализ выраженности репаративных реакций в ожоговой ране проведен в трех группах ($n=81$) сирийских хомяков (*Mesocricetus auratus*) 5–6-месячного возраста с массой тела животных в начале эксперимента 90–120 грамм: группа интактных животных, не подвергавшихся термическому воздействию ($n = 21$); контрольная группа ($n = 30$) – животные с ожоговой раной без лечебного воздействия; опытная группа ($n=30$) – животные с обработкой ожоговой раны супернатантом сплава никелида титана (наложение стерильной салфетки, пропитанной супернатантом никелида титана). Экспериментальная работа проводилась в соответствии с приказом Министерства высшего образования СССР № 724 «Правила проведения работ с экспериментальными животными».

Обезболивание животных осуществляли при помощи ингаляционного наркоза Севоран (Sevorane®) с последующим нанесением стандартной раны путем использования бытового электропаяльника, нагретого до 230 °C, время контакта составляло 3 сек. Такое

COMPARATIVE ANALYSIS OF BURNED WOUNDS REGENERATION FROM EXPOSURE TO SUPERNATANT OF TITANIUM NICKELIDE ALLOY

R. M. Uruzbaev, L. V. Vikhareva

The purpose of the study is to assess the reparative effect from exposure to supernatant of titanium nickelide alloy. Morphological analysis is performed. Experimental treatment for thermal injuries is carried out with Syrian hamsters ($n = 81$). Material is divided into 3 groups: intact animals without thermal manipulation ($n = 21$); the control group with a burn wound, without therapeutic intervention ($n = 30$); the trial group with a wound exposed to the supernatant of titanium nickelide alloy ($n = 30$). The evident speed-up of reparative processes and statistically significant decrease in inflammatory reactions allow recommending this solution as an effective way of skin structure recovery.

Keywords: skin, thermal burn, titanium nickelide, supernatant.

воздействие приводит к поражению кожи, аналогичному ожогу III степени у человека [5].

Из эксперимента животных выводили после общего обезболивания с последующей декапитацией на 1, 3, 7, 14, 21, 28-е и 34-е сутки. Во все указанные сроки забирали материал для морфологического исследования.

Супернатант готовили из расчета 10,0 г порошка сплава никелида титана на 1 л стерильной воды. Данная лекарственная форма разработана в «НИИ медицинских материалов и имплантатов с памятью формы» Сибирского физико-технического института при Томском государственном университете. Дисперсную систему получали методом ультразвукового диспергирования с последующей выдержкой до стабилизации турбидности.

Образцы кожи ($2,0 \times 2,5$ см) фиксировали в нейтральном забуференном 10 %-м растворе формалина («Биовитрум», г. Санкт-Петербург), подвергали стандартной гистологической проводке [6], гистологические срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином по Ван Гизону. Волокнистый остов и клеточный состав изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с использованием сканирующего электронного микроскопа «JSM-840». Распределение элементов Ni+ и Ti+ в образцах кожных регенератов изучали с помощью рентгеновского электронно-зондового микроанализатора «INKA Energy 200» (Oxford Instruments Analytical), смонтированного на сканирующем электронном микроскопе «JSM-840» в режиме «картирование».

Для изучения пролиферативной активности клеток в ожоговой ране использовали Ki-67 (клон-RM 9106 Rabi; Лэб Вижн Корпорэйшн; США). Экспрессия маркера оценивалась как низкая (+) – при накоплении продукта реакции менее чем в 20 % клеток; как умеренная (++) – при накоплении продукта реакции в ядрах от 20 % до 40 % клеток и как высокая (+++) – при экспрессии более чем в 40 % клеток.

Статистическая обработка результатов изучена вариационно-статистическим методом с использованием пакета прикладных программ Microsoft Office Excel 2007 на IBMPC/AT Pentium-IV в среде Windows 7.0, сравнение проводилось с использованием непараметрического метода Манна – Уитни, при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование показало, что нанесение термической травмы сопровождается некрозом эпидермиса, разрушением дермы и ее дериватов. В контрольной группе (без лечебного воздействия) на 7-е сутки в эпидермисе продолжался процесс дегенеративных изменений, в дерме и гиподерме сохранялся выраженный отек ткани; наличие паретически расширенных и полнокровных сосудов, тромбообразования, диффузной густой лейкоцитарной инфильтрации отражало выраженный воспалительный ответ. Экспрессия Ki-67 определялась в отдельных клетках и была низкой (14,3 %). Вместе с тем, отмечалось начало неангиогенеза (рис. 1). Известно, что ангиогенез является критическим процессом в ходе заживления ран [7]. Вновь образующиеся кровеносные сосуды участвуют в инициации формирования грануляционной ткани и обеспечивают питанием и кислородом вновь образующиеся клетки.

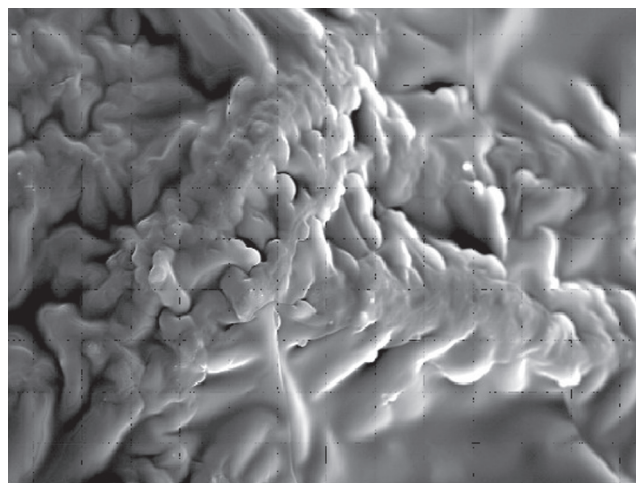


Рис. 1. Новообразованные сосуды капиллярного типа в центральной части ожогового поля: контрольная группа; 7-е сутки после термической травмы; сканирующая электронная микроскопия; увеличение 430х

Начиная с 14-х суток по периферии раны со стороны неповрежденной кожи, под струп неравномерным пластом начинал прорастать пролиферирующий эпидермис, состоящий из 2–3 слоев клеток (рис. 2). В дерме и гиподерме в этот период наблюдалось сохраняющееся нарушение микроциркуляторного русла в виде расширенных сосудов с выраженной периваскулярной инфильтрацией, в которой по-прежнему преобладали нейтрофильные лейкоциты, макрофаги и единичные тучные клетки.

К 21-м суткам наблюдалась частичная эпителизация раневой поверхности. Дерма была представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью. Коллагеновые волокна оставались незрелыми, встречались единичные короткие и утолщенные эластические волокна без ветвлений. Элементы дериватов кожи отмечались по краям дефекта, единичные присутствовали под остатками струпа. В воспалительном клеточном инфильтрате начинали преобладать макрофаги, лимфоциты и фибробласты.

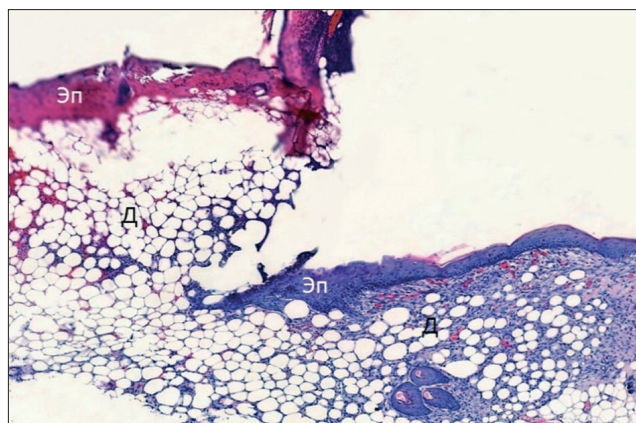


Рис. 2. Регенеративный эпидермис заходит под поврежденный пласт: воспалительная инфильтрация в дерме; контрольная группа; 14-е сутки после термической травмы; Эп – эпидермис, Д – дерма; окраска гематоксилином и эозином; увеличение 10х

К 28-м суткам наблюдалось полное закрытие раневого дефекта, тонкий слой эпидермиса был пред-

ставлен базальным, 3–4 рядами клеток шиповатого слоя, тонкой полосой зернистого и тонким роговым слоем. Соединительнотканый рубец представлял собой прилежащие друг к другу пучки коллагеновых волокон. Эластические волокна располагались преимущественно в сосочковом слое новообразованной дермы и в капсулах волосяных фолликулов, наблюдалось большое количество фибробластов и макрофагов.

К 34-м суткам в эпидермисе контрольной группы происходило дальнейшее утолщение и стратификация слоев. В дерме определялось разделение на сетчатый и сосочковые слои, но, в отличие от интактной группы, пучки коллагеновых волокон были утолщен-

ными, имели разнонаправленный характер. Число сосудов и плотность волос достигали уровня интактной группы.

Проследивая ход процессов регенерации в контрольной и опытной группах, было выявлено, что с первых суток эксперимента, когда макроскопическая картина еще не имела выраженной положительной динамики, при проведении рентгеновского электронно-зондового микроанализа в суммарном спектре элементов выявлялось проникновение атомов никеля и титана в ткани ожоговой раны (рис. 3). Вероятно, что в биологические системы данные ионы попадают при помощи образования их оксидных форм.

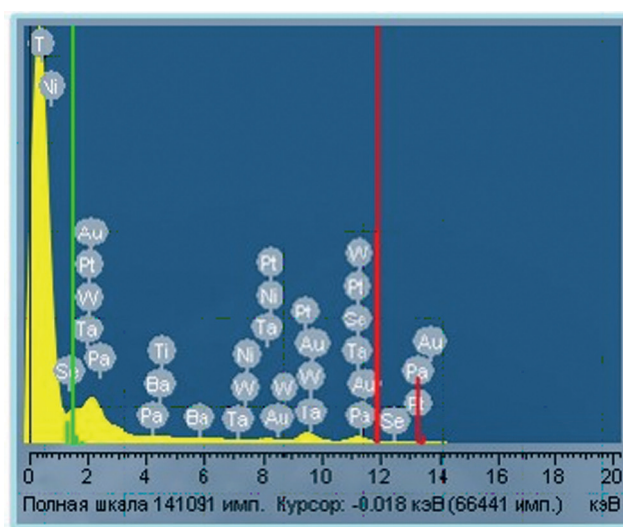
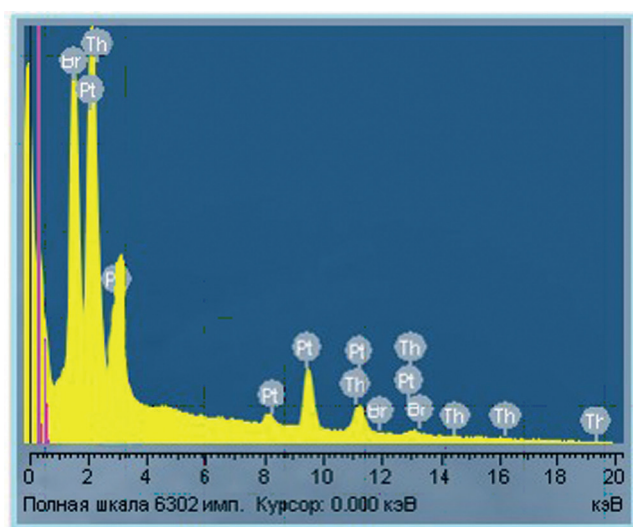


Рис. 3. Суммарный спектр элементов, обнаруживающийся в кожном покрове:
А – контрольная группа; Б – опытная группа; Ti – красный, Ni – зеленый

В отличие от контрольной группы, в опытной наблюдалось подрастание эпителия под струн на 250–300 мкм уже на третьи сутки. Наиболее выраженная миграция наблюдалась на 7-е сутки. Пролиферативная активность в опытной группе на 14-е сутки была максимально выраженной (Ki67 – 78 %), именно к этому периоду происходило уже полное закрытие раневого дефекта (рис. 4).

На 14-е сутки на границе дермы и гиподермы наблюдались новообразованные волосяные фолликулы, имеющие гнездовое расположение с увеличением количества слоев эпителиоцитов в корневых влагалищах. Сосуды дермы и гиподермы были полнокровны и расширены, они занимали не только пограничное положение, но и встречались в большом количестве в центре раны. Методом СЭМ на 21-е сутки отмечено, что формирование и перестройка фибриллярного остова подходила к завершению, хотя в данный период выявлено четкое различие по структуре сосочкового и сетчатого слоев дермы, а также активное формирование волосяных фолликулов как в области дермы, так и во всей толще гиподермы.

При анализе опытной группы (применение супернатанта сплава никелида титана) выраженность воспалительной реакции отмечалась на третьи сутки, а смена клеточного состава воспалительного инфильтрата на макрофагальную фазу происходила на 7-е сутки, коли-

Эп

Д

Рис. 4. Зона контакта края регенерировавшей кожной раны и ожогового поля (стрелки – волосные фолликулы): опытная группа; 14-е сутки эксперимента; окраска гематоксилином и эозином; увеличение 20х

чество фибробластов достигало максимума на 28-й день и в сравнении с контрольной группой этот процесс происходил статистически значимо раньше (табл. 1).

Динамика изменения клеточного состава кожи в контрольной и опытной группах в различные периоды после ожогового воздействия Me (Q25–Q75)

Сутки	Клеточный состав	Контрольная	Опытная	Значение p
1-е	Нейтрофильные лейкоциты	42,0 (28,7–55,3)	38,7 (31,4–46,0)	≤ 0,05
	Тканевые базофилы	3,8 (1,2–6,4)	6,5 (4,5–8,5)	≤ 0,01
	Макрофаги	2,1 (0,8–3,4)	5,4 (4,3–6,5)	≤ 0,01
	Фибробласты	52,1 (31,7–72,5)	49,4 (38,7–60,1)	≤ 0,05
3-е	Нейтрофильные лейкоциты	51,3 (32,4–70,2)	41,7 (34,8–48,6)	≤ 0,01
	Тканевые базофилы	7,6 (4,8–10,4)	12,1 (10,3–13,9)	≤ 0,01
	Макрофаги	8,7 (5,3–12,1)	8,4 (6,8–10,0)	≤ 0,01
	Фибробласты	32,4 (27,6–37,2)	37,8 (26,4–49,2)	≤ 0,05
7-е	Нейтрофильные лейкоциты	58,3 (48,1–68,5)	34,8 (28,1–41,5)	≤ 0,01
	Тканевые базофилы	9,7 (7,4–12,0)	10,1 (7,9–12,3)	≤ 0,05
	Макрофаги	10,7 (8,4–13,0)	28,7 (22,0–35,4)	≤ 0,01
	Фибробласты	21,3 (18,4–24,2)	26,4 (22,1–30,7)	≤ 0,01
14-е	Нейтрофильные лейкоциты	28,7 (23,1–34,3)	28,3 (19,7–36,9)	≤ 0,01
	Тканевые базофилы	8,7 (5,6–11,8)	8,4 (5,1–11,7)	≤ 0,05
	Макрофаги	39,7 (31,1–48,3)	18,7 (14,2–23,2)	≤ 0,01
	Фибробласты	22,9 (18,4–27,4)	44,6 (38,2–51,0)	≤ 0,01
21-е	Нейтрофильные лейкоциты	21,6 (18,4–24,8)	13,3 (10,1–16,5)	≤ 0,01
	Тканевые базофилы	5,1 (4,2–6,0)	5,7 (4,8–6,6)	≤ 0,05
	Макрофаги	30,6 (24,1–37,1)	12,6 (9,7–15,5)	≤ 0,01
	Фибробласты	42,7 (37,3–48,1)	68,4 (61,7–75,1)	≤ 0,05
28-е	Нейтрофильные лейкоциты	15,3 (12,5–18,1)	5,5 (2,4–8,6)	≤ 0,01
	Тканевые базофилы	3,8 (2,3–5,3)	3,1 (2,3–3,9)	≤ 0,01
	Макрофаги	23,1 (18,7–27,5)	3,8 (2,9–4,7)	≤ 0,01
	Фибробласты	57,8 (51,3–64,3)	87,6 (76,3–98,9)	≤ 0,05
34-е	Нейтрофильные лейкоциты	6,2 (4,3–8,1)	4,3 (2,1–6,5)	≤ 0,01
	Тканевые базофилы	3,1 (2,7–3,5)	5,8 (3,4–8,2)	≤ 0,05
	Макрофаги	10,6 (8,7–12,5)	6,1 (4,8–7,4)	≤ 0,01
	Фибробласты	80,1 (73,2–87,0)	83,8 (80,1–87,5)	≤ 0,01

Примечание: каждый срок анализировался в 100 полях зрения при увеличении объектива ×100.

На сегодняшний день разработка как новых оригинальных лекарственных препаратов на основе рекомбинантных цитокинов, так и биосимиляров известных препаратов является чрезвычайно перспективной темой научно-исследовательских проектов во всем мире. Идет поиск новых лекарственных средств для активации процессов стимуляции заживления ран и язв. При применении супернатанта сплава никелида титана в процессе заживления ожоговых

ран отмечена благоприятная динамика репаративных процессов: темп снижения выраженности воспалительных процессов и начало репарации процессов был несколько выше, чем в контрольной группе. Также важно отметить статистически значимое увеличение числа активных фибробластов и раннее формирование грануляционной ткани, что ведет к сокращению сроков заживления ожоговой раны. Такие изменения, вероятно, связаны с местно-раздражающим

и противовоспалительным свойствами супернатанта сплава никелида титана на ткани ожоговой раны, а также его выраженным пролиферативным эффектом за счет выделения биологически активных веществ и факторов роста.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, применение супернатанта сплава никелида титана при ожоговых ранах выявило статистически значимое увеличение скорости регенераторных процессов, снижение деструкции, стимуляцию ангиогенеза и восстановление архитектоники кожи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев А. А., Бобровников А. Э., Малютина Н. Б., Авагимян А. Г. Применение перевязочных материалов на основе липидо-коллоидной технологии при местном лечении ожоговых ран. М., 2010. 16 с.
2. Брязин В. Н. и др. Местное лечение поверхностных ожогов // Сб. науч. тр. III съезда комбустиологов России 15–18 ноября 2010 г. М., 2010. С. 163–164.
3. Муслов С. А., Шумилина О. А. Медицинский нитинол: друг или враг? Еще раз о биосовместимости никелида титана // Фундамент. исслед. 2007. № 10. С. 87–89.
4. Повстаной Н. Е., Коваленко О. Н. Выбор методов кожной пластики при раннем хирургическом лечении ожогов // Комбустиология на рубеже веков : сб. тез. Междунар. конгр. М., 2000. С. 149.
5. Парамонов Б. А., Чеботарев В. Ю. Методы моделирования термических ожогов кожи при разработке препаратов для местного лечения // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. 2002. Т. 134. № 11. С. 593–597.
6. Саркисов Д. С. Микроскопическая техника : рук. М. : Медицина, 1996. 544 с.
7. Гуляев А. Е., Шульгау З. Т., Сергазы Ш. Д., Ашуева З. И., Толыбекова А. А. Безопасность и переносимость гелевой формы рекомбинантного ангиогенина человека под торговым названием «Фармаген» при наружном применении у здоровых добровольцев // Вестник СурГУ. Медицина. 2016. № 3. С. 39–47.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Урузбаев Ринат Маратович – аспирант кафедры патологической анатомии и судебной медицины, Тюменский государственный медицинский университет; e-mail: uruzbaevrm@mail.ru.

Вихарева Лариса Владимировна – доктор медицинских наук, профессор кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии, Тюменский государственный медицинский университет; e-mail: vikharevalv@yandex.ru.

ABOUT THE AUTHORS

Rinat M. Uruzbaev – Postgraduate, Pathologic Anatomy and Forensic Medicine Department, Tyumen State Medical University; e-mail: uruzbaevrm@mail.ru.

Larisa V. Vikhareva – Doctor of Science (Medicine), Professor, Operative Surgery and Topographic Anatomy Department, Tyumen State Medical University; e-mail: vikharevalv@yandex.ru.