

УДК 616-001.17.616.1.577.4

**О. Ю. Павленко, Н. П. Бгатова, О. П. Макарова,
Л. Н. Рачковская, В. С. Садыкова, Ю. М. Викторова**

НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН
ул. акад. Тимакова, 2, Новосибирск, 630117, Россия
Новосибирский государственный медицинский университет
Красный просп., 52, Новосибирск, 630091, Россия
E-mail: n_bgatova@ngs.ru

ОСОБЕННОСТИ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ФИБРОБЛАСТОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПОДХОДАХ К ЛЕЧЕНИЮ ОЖОГОВОЙ РАНЫ КОЖИ

Проведено сравнительное исследование ультраструктуры фибробластов грануляционной ткани кожи крыс линии Вистар при местном лечении ожоговой раны и с использованием энтеросорбентов. Показано, что применение сорбентов «СУМС-1» и «Энтеросорб» в послеожоговом периоде способствовало снижению степени эндогенной интоксикации организма. Снижение уровня токсемии при использовании энтеросорбентов, по-видимому, обусловило сохранение реактивности и ускоренное восстановление функций клеток-эффекторов воспаления, обеспечило благоприятные условия микроокружения для развития регенераторного процесса. Ультраструктурная организация фибробластов может быть маркером эффективности лечения ожоговой раны кожи.

Ключевые слова: кожа, ожог, энтеросорбенты, фибробласты.

Известно, что при тяжелой ожоговой травме развивается эндогенная интоксикация, транзиторная или устойчивая бактериемия, инфекционные осложнения и сепсис, глубокая иммунодепрессия, ДВС-синдром с тромбозами и кровотечениями, гиперметаболическая реакция [1–4]. При этом ожоговая рана является сильнейшим антигеном и триггером к пролонгированной ответной реакции до момента полного восстановления кожного покрова и даже несколько дольше. Поэтому выбор правильной тактики лечения ожоговой раны определяет не только эффективность ее заживления, но и тяжесть течения ожоговой болезни [2–5].

В медицине оформилось целое направление – сорбционная терапия, включающее детоксикацию организма с помощью экстракорпоральной перфузии биологической жидкости через колонки с сорбентом или путем энтерального и аппликационного применения сорбентов [6; 7]. В условиях ожоговой травмы чрезвычайно перспективным является использование неинвазивных технологий: сорбционных препаратов, которые будут оказывать протективное дейст-

вие на систему естественной детоксикацией организма.

Цель исследования: выявление особенностей ультраструктурной организации фибробластов грануляционной ткани кожи крыс при различных подходах к лечению ожоговой травмы.

Материал и методы

В эксперименте использовали 45 крыс-самцов линии вистар. Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Под эфирным наркозом крысам выбривали участок кожи в грудно-поясничной области и наносили ожог диаметром 2 см с помощью специального устройства, подающего водяной пар в течение 5 с. В результате у экспериментальных животных развивалась ожоговая рана кожи IIIA степени, занимающая 10 % поверхности тела, что документировалось морфологическими исследованиями.

В течение 15-ти дней после термического ожога кожи животные получали энтерально сорбенты в крахмальном геле из расчета

0,1 г/кг массы тела. Все животные были разделены на несколько групп: 1-я – интактные животные; 2-я – животные, которым применялись местно аппликации мази «Левомеколь» («Нижфарм», Россия) на ожоговую рану для сравнения эффективности использования энтеросорбции и местного лечения ожоговой раны [2]; 3-я – животные, получавшие энтеросорбент «СУМС-1»; 4-я – животные, получавшие энтеросорбент «Энтеросорб». Этот сорбент представляет собой углерод-минеральную матрицу с нанесенным на ее поверхность полисахаридом [8]. Оба сорбента отечественного производства.

Декапитацию животных проводили на 15-е сутки после термического ожога кожи – период, соответствующий фазе развития грануляционной ткани при спонтанном заживлении ожоговой раны [3].

Для изучения в просвечивающем режиме электронного микроскопа образцы кожи фиксировали в 1 % растворе OsO₄ на фосфатном буфере (рН = 7,4), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон. Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм, окрашивали толуидиновым голубым, изучали под световым микроскопом и выбирали необходимые участки тканей для исследования под электронным микроскопом. Выбранные ультрасрезы толщиной 35–45 нм контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата, цитратом свинца и изучали под электронным микроскопом.

Для оценки степени эндогенной интоксикации использовали метод определения средних молекул в сыворотке крови [9].

Результаты исследования и обсуждение

При исследовании состояния раневой поверхности после термического ожога кожи было показано, что у животных, не получавших лечения, гнойно-некротический детрит начинал отделяться по краю раны на 15-е сутки после ожога. При этом на месте струпа оказывалась открытая, мокнущая раневая поверхность. У животных, которым на место ожога накладывали левомеколь, отмечали отторжение струпа на 15-й день после ожога. Под струпом открывалась раневая поверхность без признаков нагноения.

При визуальном наблюдении за развитием раневого процесса у животных, которые после ожога кожи получали энтеросорбенты СУМС-1 или энтеросорб, выявлено, что картина заживления на 15-е сутки после ожога была сходна с таковой у крыс, получавших местное лечение с использованием левомеколя. Отторжение струпа происходило также на 15-й день после ожога. Под струпом открывалась раневая поверхность без признаков нагноения.

При морфологическом исследовании структуры ожоговой раны на 15-е сутки эксперимента наблюдали появление грануляционной ткани. У нелеченных животных фибробласты отличались слабым развитием белоксинтетического аппарата, расширением цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума и набуханием митохондрий (рис. 1, а). Клеточный отек приводил к возрастанию объемной плотности мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума на 29 %, при этом численная плотность прикрепленных рибосом была снижена на 28 % (табл. 1). В структуре грануляционной ткани выявлялось большое число нейтрофилов (рис. 1, б). Популяция макрофагов была гетерогенна по ультраструктурной организации, однако преобладали клетки, у которых вакуолярный аппарат был переполнен фагированным материалом и липидными включениями (рис. 1, в), что, вероятно, было связано с незавершенностью фагоцитоза, отмечаемой при ожоговой травме [10].

В структуре фибробластов грануляционной ткани животных, получавших местное лечение ожога с использованием аппликаций левомеколя наблюдали возрастание объемной плотности мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума на 30 % и увеличение численной плотности прикрепленных рибосом на 74 % (см. табл. 1). Фибробласты образовывали пласты клеток и были окружены коллагеновыми волокнами. В структуре грануляционной ткани редко встречались нейтрофилы. Преобладающими из клеток эффекторов воспаления были макрофаги.

При энтеральном использовании в послеожоговом периоде СУМС-1 наблюдали эффективное развитие грануляционной ткани в области ожоговой раны. Среди фиб-

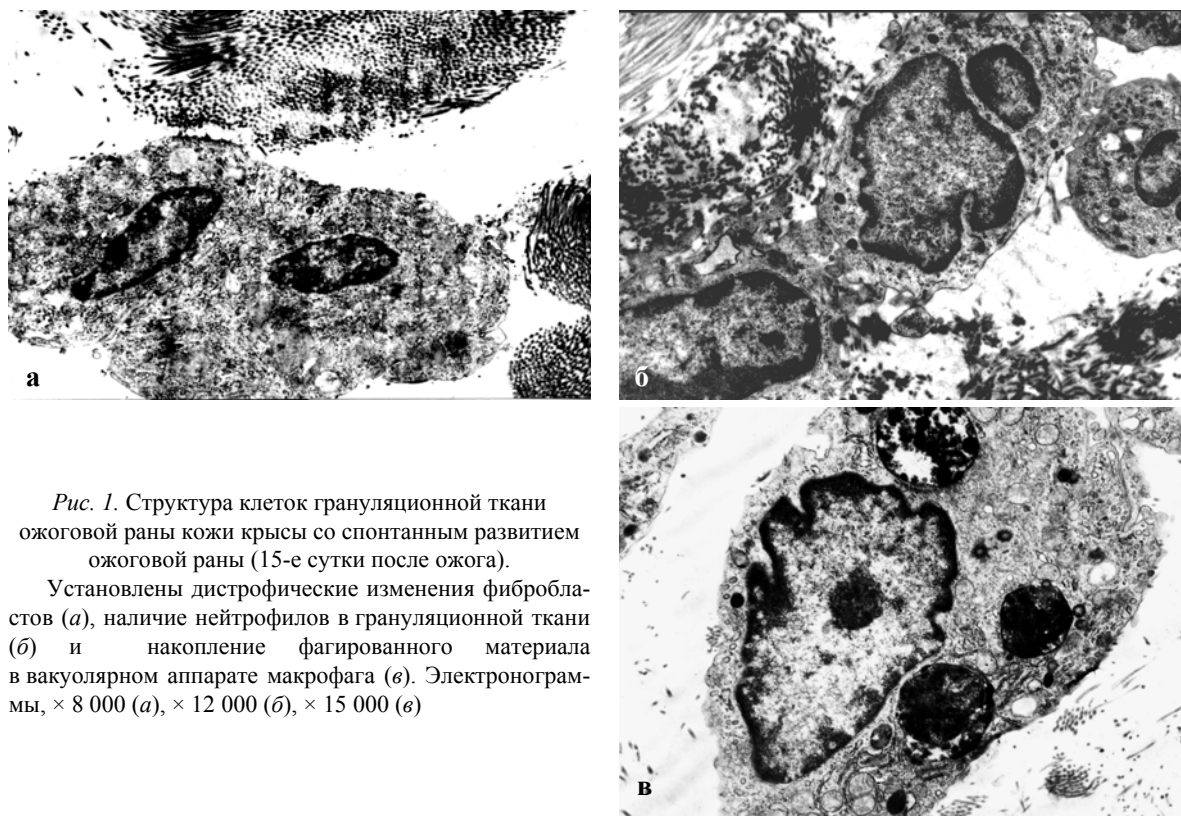


Рис. 1. Структура клеток грануляционной ткани ожоговой раны кожи крысы со спонтанным развитием ожоговой раны (15-е сутки после ожога).

Установлены дистрофические изменения фибробластов (а), наличие нейтрофилов в грануляционной ткани (б) и накопление фагированного материала в вакуолярном аппарате макрофага (в). Электронограммы, $\times 8\ 000$ (а), $\times 12\ 000$ (б), $\times 15\ 000$ (в)

Таблица 1. Ультраструктура фибробластов грануляционной ткани через 15 суток после термического ожога кожи ($M \pm m$)

Параметры	Интактные животные	Метод лечения ожога			
		без лечения	левомеколь	СУМС-1	энтеросорб
Vv митохондрий	$10,2 \pm 0,1$	$11,5 \pm 0,6$	$11,8 \pm 0,2$	$12,3 \pm 0,2$	$11,4 \pm 0,2$
Sv наружной мембраны митохондрий	$0,29 \pm 0,10$	$0,30 \pm 0,15$	$0,44 \pm 0,18$	$0,36 \pm 0,28$	$0,41 \pm 0,54$
Sv внутренней мембраны митохондрий	$0,81 \pm 0,28$	$0,97 \pm 0,40$	$0,95 \pm 0,31$	$0,99 \pm 0,12$	$0,96 \pm 0,24$
Vv ГЭР	$19,5 \pm 0,5$	$25,2 \pm 0,7^*$	$25,7 \pm 0,1^*$	$18,9 \pm 0,3$	$20,2 \pm 0,2$
NA прикрепленных рибосом	$37,7 \pm 3,5$	$29,2 \pm 3,4^*$	$66,1 \pm 5,9^{\circ}$	$42,4 \pm 2,6^{\circ}$	$60,2 \pm 3,3^{\circ}$
NA свободных рибосом	$53,2 \pm 3,8$	$37,8 \pm 3,9^*$	$54,5 \pm 7,3^{\circ}$	$72,3 \pm 2,8^{\circ}$	$66,4 \pm 3,6^{\circ}$
NA лизосом	$1,27 \pm 0,46$	$1,53 \pm 0,99$	$1,73 \pm 0,88$	$1,38 \pm 0,12$	$1,62 \pm 0,96$
VV лизосом	$0,30 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,13$	$0,20 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,21$

Примечание: ГЭР – гранулярная эндоплазматическая сеть; Vv – объемная плотность структур (% от объема цитоплазмы); Sv – поверхностная плотность структур (мкм^2 в $1\ \text{мкм}^3$ объема цитоплазмы); NA – число структур в тестовой площади; * – достоверность отличия относительно соответствующих величин у интактных животных; $^{\circ}$ – достоверность отличия относительно соответствующих величин у животных, не получавших лечения ($p < 0,05$).

робластов преобладали клетки с повышенным содержанием свободных полисомальных рибосом, численная плотность которых была больше соответствующего значения у интактных животных на 36 %, и у животных, не получавших лечения после ожога,

на 89 %. Наблюдали макрофаги с электронно-плотными вторичными лизосомами и липидными включениями в цитоплазме. Содержание и плотность расположения лизосом была меньше, чем в клетках нелеченных животных (рис. 2, а).

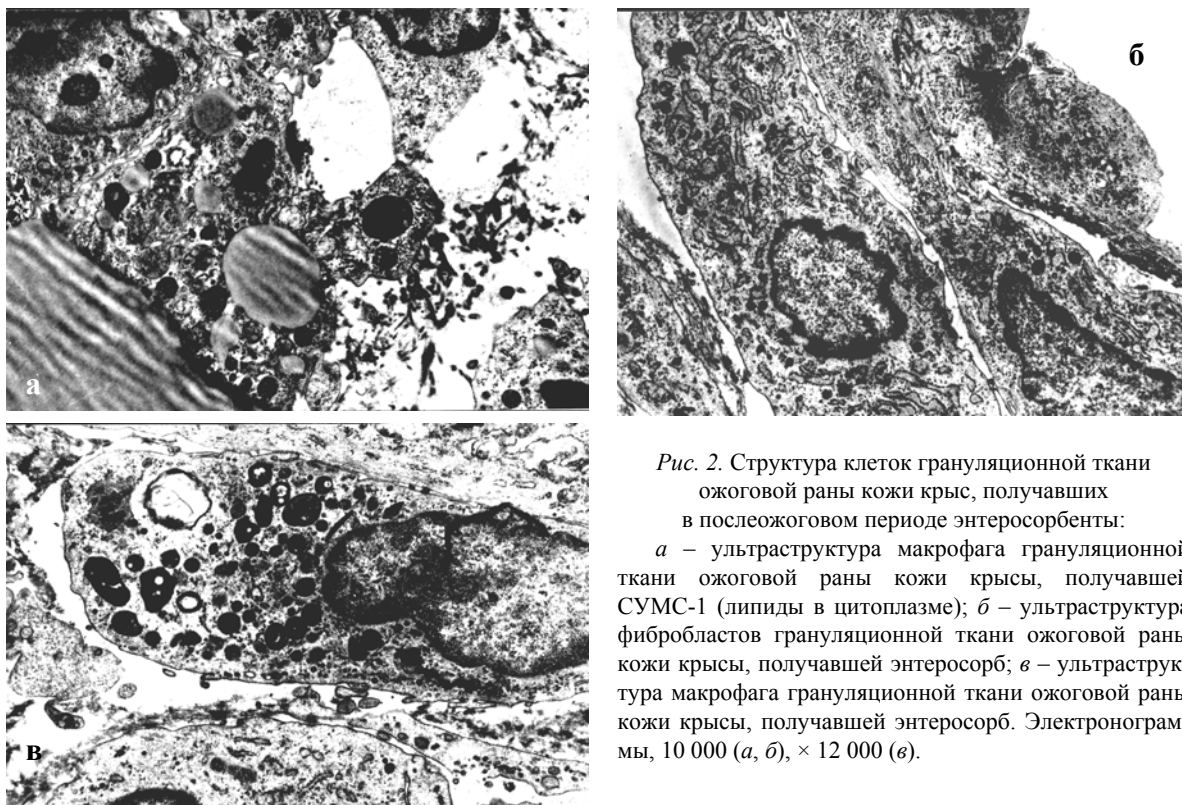


Рис. 2. Структура клеток грануляционной ткани ожоговой раны кожи крысы, получавших в послеожоговом периоде энтеросорбенты: а – ультраструктура макрофага грануляционной ткани ожоговой раны кожи крысы, получавшей СУМС-1 (липиды в цитоплазме); б – ультраструктура фибробластов грануляционной ткани ожоговой раны кожи крысы, получавшей энтеросорб; в – ультраструктура макрофага грануляционной ткани ожоговой раны кожи крысы, получавшей энтеросорб. Электронограммы, 10 000 (а, б), × 12 000 (в).

Таблица 2. Концентрация средних молекул в крови крыс с термическим повреждением кожи при использовании энтеросорбентов (M ± m)

Группы животных	Концентрация средних молекул, ммоль/л	
	D254 нм	D280 нм
Интактные (n = 5)	0,241 ± 0,022	0,180 ± 0,002
Ожог без лечения (n = 5)	–	0,206 ± 0,004*
Лечение ожога левомеколом (n = 5)	0,208 ± 0,002	0,190 ± 0,005
Лечение СУМС-1 (n = 5)	0,185 ± 0,006 ^{°°}	0,138 ± 0,010 ^{+ °}
Лечение энтеросорбом (n = 5)	0,197 ± 0,005 [°]	0,140 ± 0,005 ^{++ °}

Примечание: * – достоверность отличия по сравнению с группой интактных животных ($p < 0,05$); + – достоверность отличия $p < 0,05$, ++ – $p < 0,01$ по сравнению с группой животных с ожогом без лечения; ° – достоверность отличия $p < 0,05$, °° – $p < 0,01$ по сравнению с группой животных, получавших лечение левомеколом.

При использовании энтеросорба в послеожоговом периоде структура грануляционной ткани отличалась большим содержанием фибробластов и межклеточного вещества. Фибробласты образовывали пласты, контактировали друг с другом, имели крупные размеры и хорошо развитую гранулярную эндоплазматическую сеть (рис. 2, б). Численная плотность прикрепленных рибосом превышала значение в контроле на 58 %, а численная плотность свободных полисомальных рибосом возросла на 25 %. Нейтрофилы встречались редко. Среди гетерогенной популяции макрофагов преобладали крупные клетки с большим содержанием лизосом, заполненных электронноплотным содержимым (рис. 2, в). Размеры и электронная плотность лизосом была меньшей, чем у нелеченных животных

и животных, получавших аппликации левомеколя и энтеросорбент СУМС-1.

Состояние ожоговой раны при энтеральном использовании энтеросорба в послеожоговом периоде свидетельствовало о большей зрелости грануляционной ткани и большей функциональной состоятельности макрофагов, чем у нелеченных животных и животных, получавших аппликации левомеколя и энтеросорбент СУМС-1.

При использовании энтеросорбентов после термического ожога кожи концентрация среднемoleкулярных пептидов снижалась по сравнению с животными со спонтанным заживлением ожоговой раны (табл. 2).

Известно, что при ожогах и ранениях происходит мобилизация клеток, обеспечивающих эффективность воспалительной реакции: возрастает количество нейтрофи-

лов, а затем макрофагов. В ранние сроки после травмы выявляется снижение функциональной активности клеток-эффекторов воспаления, связанное с накоплением токсичных метаболитов [5; 10]. Снижение уровня токсемии при использовании энтеросорбентов, по-видимому, способствовало сохранению реактивности и ускоренному восстановлению функций клеток и обеспечивало благоприятные условия микроокружения для развития регенераторного процесса. Критерием эффективности развития процессов регенерации в ожоговой ране кожи может быть структурная организация фибробластов, вносящих основной вклад в формирование грануляционной ткани [4].

Нами выявлено, что при использовании энтеросорбентов происходила в большой степени активация синтетической функции фибробластов. Структурными признаками возрастания белоксинтетической функции клеток было увеличение численных плотностей прикрепленных и свободных полисомальных рибосом.

Таким образом, применение энтеросорбентов СУМС-1 и энтеросорба в послеожоговом периоде способствовало снижению степени эндогенной интоксикации организма, что обусловило сохранение реактивности и ускоренное восстановление функций клеток-эффекторов воспаления, обеспечивало благоприятные условия микроокружения для развития регенераторного процесса. При этом ультраструктурная организация фибробластов может быть маркером эффективности лечения ожоговой раны кожи.

Список литературы

1. Huang Y. S. et al. A prospective clinical study on the pathogenesis of multiple organ failure in severely burned patients /

Y. S. Huang, A. Li, Z. C. Yang // Burns. 1992. Vol. 18, № 1. P. 30–34.

2. Спиридонова Т. Г. Консервативное лечение ожоговых ран // Рус. мед. журн. 2001. Т. 9, № 13–14. С. 560–561.

3. Спиридонова Т. Г. Патогенетические аспекты лечения ожоговых ран // Рус. мед. журн. 2002. Т. 10, № 8–9. С. 395–399.

4. Death in the burn unit: sterile multiple organ organ failure / R. L. Sheridan, C. M. Ryan, L. M. Yin et al. // Burns. 1998. № 24. P. 307–311.

5. Arturson G. Post burn inflammatory response // Burns. 2000. № 26. P. 599–604.

6. Беляков Н. А. Эндогенные интоксикации и лимфатическая система // Эффективная терапия. 1998. Т. 4, № 2. С. 11–16.

7. Бородин Ю. И. О функциональном взаимодействии сорбирующих веществ с лимфатическими структурами // Проблемы сорбционной детоксикации внутренней среды организма: Материалы междунар. симп. Новосибирск, 1995. С. 3–7.

8. Иммуностимулирующая и антикоагулянтная активность фукоидана из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens* / Т. А. Кузнецова, Т. С. Запорожец, Н. Н. Беседнова и др. // Антибиотики и химиотерапия. 2002. Т. 48, № 4. С. 11–13.

9. Габриелян И. И. и др. Скрининговый метод определения средних молекул в биологических жидкостях / И. И. Габриелян, Э. Р. Левицкий, Н. Л. Дмитриев. М., 1985. С. 20.

10. Effects of taurine on polymorphonuclear phagocytosis activity in burned patients / M. Farriol, Y. Venereo, J. Rossello et al. // Amino Acids. 2002. Vol. 23, № 4. P. 441–445.

Материал поступил в редколлегию 06.07.2006

О. Ю. Павленко, Н. П. Вгатовая, О. П. Макарова, Л. Н. Рачковская, В. С. Садикова, Ю. М. Викторова

Features of ultrastructural organization fibroblasts at various approaches to treatment of the burn wound

Comparative research of ultrastructure of the fibroblasts of the skin granulation tissue at local treatment burn wounds and use of enterosorbents is carried out. It is shown, that application SUMS-1 and Enterosorb in post burn period promoted decrease in a degree an intoxication of an organism. Decrease in a level toxemia at enterosorbents used, apparently, has caused preservation of reactance and the accelerated restoration of functions of cells-effectors of an inflammation, has provided favorable conditions of a microenvironment for development process of regeneration. The ultrastructural organization fibroblasts can be a marker of efficiency of treatment of skin burn wounds.

Keywords: skin, burn, enterosorbents, fibroblasts.