

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА ЗАЖИВЛЕНИЯ ОЖГОВОЙ РАНЫ, ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУНИТЕТА И ПАТОМОРФОЛОГИИ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ У КРЫС С ОЖГОВОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ АЛЛОФИБРОБЛАСТОВ

Ш.Х.МАМАДАЛИЕВ, Р.С.АЖИНЯЗОВ, Д.А.ДЖАБРИЕВ, А.Д.ФАЯЗОВ,
М.Д.УРАЗМЕТОВА, О.А.РАДЖАПОВ

Comparative studying of the process of the healing of the burning wound, parameters of immunity and pathomorphology of the lymphoid organs of the rats with burning disease after the transplantation of cultivated allofibroblasts

S.H.MAMADALIEV, R.S.AJINIAZOV, D.A.DJABRIEV, A.D.FAYAZOV, M.D.URAZMETOVA,
O.A.RADJAPOV

Республиканский научный центр экстренной медицинской помощи

Трансплантация культивированных аллофибробластов (КАФ) на глубокие ожоговые раны у крыс с ожоговой болезнью (ОБ) приводит к более раннему купированию признаков ОБ и благоприятному течению раневого процесса. Трансплантация КАФ сопровождается выраженной нормализацией количественных и особенно функциональных показателей иммунного статуса. В ходе экспериментов выявлена также менее бурная реакция лимфоидных органов на термическое повреждение и более ранняя нормализация морфологических признаков болезни на фоне трансплантации КАФ.

Transplantation of the cultivated allofibroblasts (CAF) on a deep burning wounds of the rats with burning disease (BD) leads to the earlier reduction of the symptoms of the BD and more favorable process of the healing of the burning wound. The CAF is accompanied with the normalization of the quantitative and especially the functional parameters of the immune status. The experiments showed the less reaction of the morphological features of the disease during the transplantation.

Термические ожоги требуют изыскания новых методов заживления ожоговых ран [5]. Иммунологические исследования при ожоговой болезни (ОБ) выявили количественные изменения всех показателей гуморального и клеточного звена иммунитета, а также развитие специфических реакций на фоне инфекционного процесса, подавление реакций гиперчувствительности замедленного типа и их взаимосвязь с тяжестью и площадью ожога [2]. Токсемия приводит к тяжелым нарушениям функций, а затем и морфологии паренхиматозных органов.

Цель. Сравнительное изучение процесса заживления ожоговой раны, показателей иммунного статуса и патоморфологии лимфоидных органов при трансплантации культивированных аллофибробластов (КАФ) в эксперименте на животных.

Материал и методы

В экспериментах использовано 52 беспородных белых крысы самоки массой 140-270 г. Глубокий термический ожог кожи (IIIБ степени) моделировали на 46 крысах. Под эфирным наркозом ожог у животных вызвали прикладыванием к коже нагретой до 100° С металлической пластинки. Время экспозиции пластины через влажную салфетку - 16 с. Площадь пластины - 18-20% от общей поверхности кожи животного. При указанных режимах экспозиции достигалось повреждение всех слоев кожи.

Животные были разделены на две группы: 1-я - 28 крыс с глубоким термическим ожогом без лечения, 2-я - 18 животных с глубоким термическим ожогом и трансплантацией КАФ. Контролем служили 6 интактных крыс.

Разработанный нами способ лечения ожогов и ран [7] включает получение первичной культуры аллогенных фибробластов из эмбриональных тканей с последующим наложением клеточной взвеси на раневую поверхность.

Первичную культуру фибробластов получали путем ферментизации эмбриональных кожных покровов 14-17 дневных эмбрионов крыс с последующим культивированием фибробластов в культуральной среде 199, содержащей 10-15% эмбриональную телячью сыворотку, 2% α-глутамин, среду Нерес и антибиотики.

Суспензию КАФ наносили на поверхность ожоговой раны с помощью пипетки на 3-и сутки после моделирования ожога и иссечения образовавшегося некротического струпа (некрэктомия) (2-я гр.). После трансплантации клеток ожоговую поверхность покрывали марлевой салфеткой, смоченной физиологическим раствором с гентамицином. У крыс 1-й группы на 3-и сутки после моделирования ожога иссекали образовавшийся некротический струп без дальнейшего лечения раны.

Контроль заживления ожоговых ран осуществляли визуально (наличие гнойно-воспалительных явлений, характер грануляций и сроки эпителизации) и планиметрическим методом.

Иммунный статус оценивали по унифицированным тестам [3, 4].

Забой животных производился на 3-, 6-, 10-, 17- и 24-е сутки ОБ. Полученные образцы подмышечных лимфатических узлов, селезенки и вилочковой железы фиксировали в 10% растворе формалина на фосфатном буфере (pH 7,2-7,4) с последующей заливкой материала

по Лойду (1983) и окраской гематоксилином и эозином. Гистологические исследования и фотографирование проводили при помощи объектива малого и большого увеличения световым микроскопом Karl Zeiss (ФРГ).

Результаты и обсуждение

В 1-е сутки воспроизведения экспериментального ожога у крыс наблюдалось состояние острой ОБ: вялость, адинамия, диспноэ, тахикардия, полидипсия и полиурия. Состояние животных начинало улучшаться с 3-х суток.

У крыс 1-й группы после иссечения ожогового струпа рана заживала медленно. Так, на 3-и сутки после некрэктомии был виден мышечный слой с сосудистыми капиллярами.

У крыс с ОБ имели место нарушения в иммунной системе: снижение процентного содержания Т-лимфоцитов, Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов, фагоцитарной активности нейтрофилов (ФАН), а также сдвиги функционального состояния иммунитета: нарушение баланса спонтанных цитокинов в сыворотке, снижение активности Т-лимфоцитов, определенных по КонА-индуцированной про-

дукции фактора, угнетающего и фактора, стимулирующего миграцию лейкоцитов крови (ФУМ-А и ФСМ-А).

При развитии ОБ на 3-и сутки в ткани тимуса в основном преобладали ретикулярные клетки. В отличие от животных интактной группы, в соединительнотканых перегородках и капсуле железы определялись диффузно-расположенные дегранулирующие клетки.

Изучение лимфатических узлов в этот же срок развития ОБ показало, что в лимфатических узлах корковая зона в целом была сужена за счет расширения мозговой зоны, в которой определялись отек, расширение медуллярных синусов, дегранулирующие клетки. В коре преобладали первичные лимфоидные фолликулы небольших размеров. Паракортикальная зона была относительно расширена.

В ткани селезенки белая пульпа, которая была слабо выражена, в основном состояла из лимфоцитов. Маргинальная зона была нечеткой. В красной пульпе определялись очаги кровоизлияний, отек стромы, расширение и полнокровные сосуды.

На 6-е сутки у животных с ОБ определялся мышечный

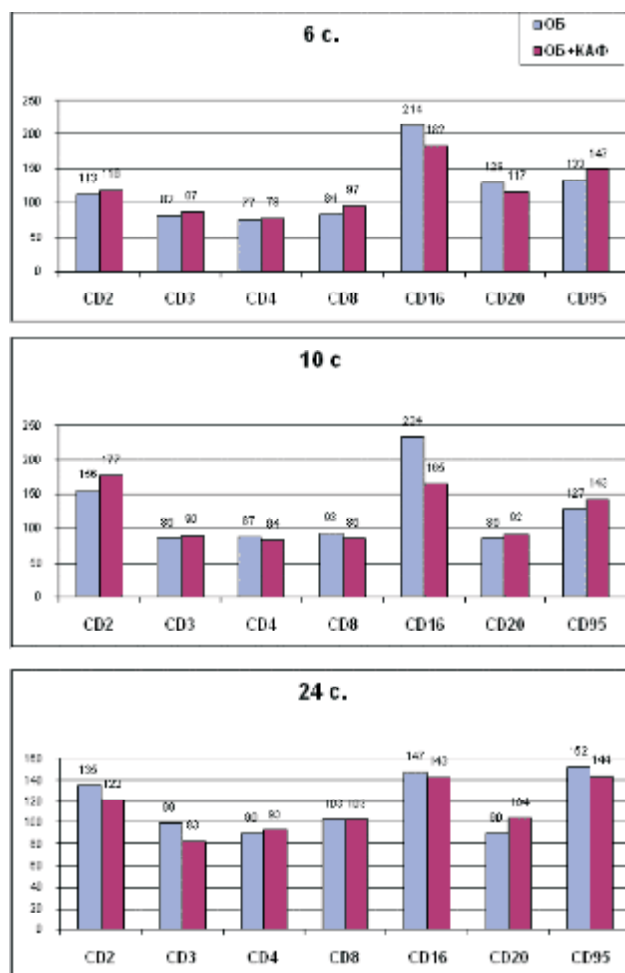


Рис.1. Количественные показатели иммунного статуса у крыс с ожоговой болезнью (ОБ, 1-я группа) и при трансплантации культивированных аллофибробластов (ОБ+КАФ, 2-я группа) на 6-, 10- и 24-е сутки ОБ и соответственно на 3-, 7-, 21-е сутки после трансплантации, в % к контролю.

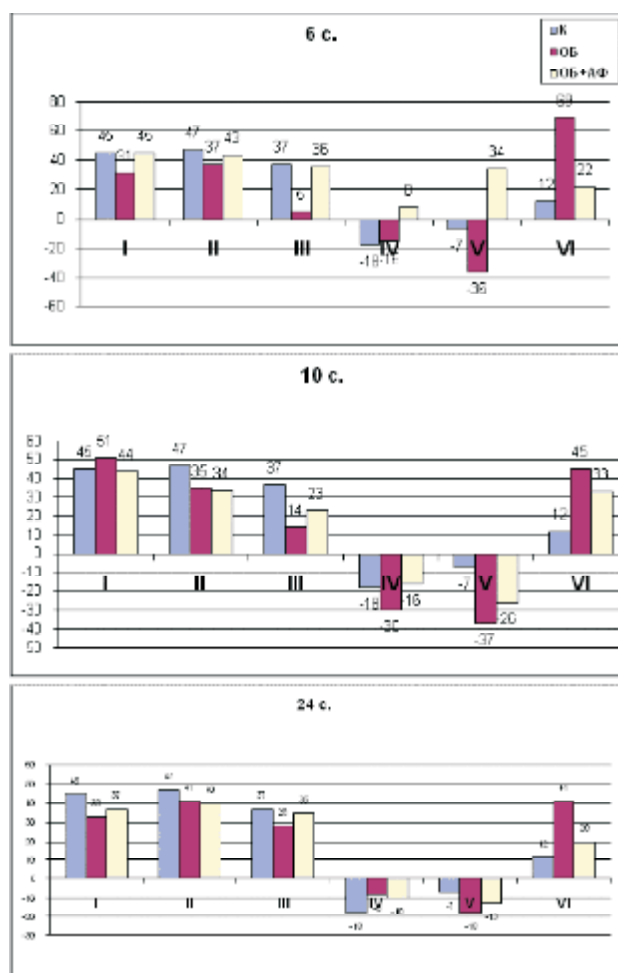


Рис.2. Функциональные показатели иммунитета у крыс с ожоговой болезнью (ОБ, 1-я группа) и при трансплантации КАФ (ОБ+КАФ, 2-я группа) на 6-, 10- и 24-е сутки ОБ и соответственно на 3-, 7-, 21-е сутки после трансплантации: I-СМΛ,ед, II-ΦАН,%, III-ΦУМ,%, IV-ΦСМ,%, V-СПЦ,% и VI-СРБ,%.

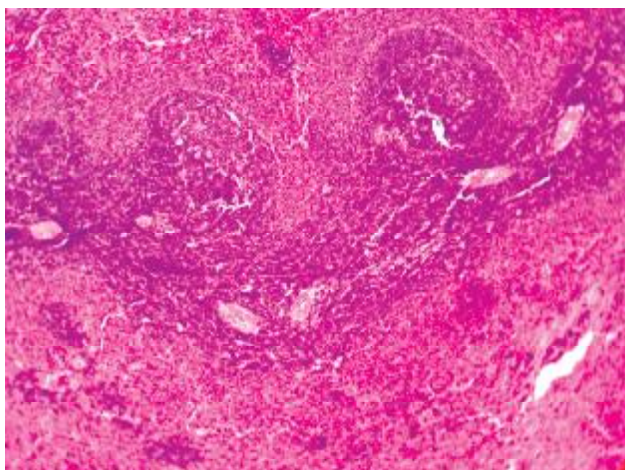


Рис.3. Селезенка на 7-е сутки после пересадки КАФ. Гиперплазия белой пульпы с формированием лимфоидных фолликулов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$.

слой раны с фасциями, покрытый многочисленными капиллярами. Из раны обильно истекала жидкость (плазморея). По краям раны в отдельных местах наблюдалось образование грануляции и струпа.

Увеличивалось количество общих лимфоцитов, но снижался уровень CD3+, CD4+, CD8+ клеток с возрастанием содержания CD16+, CD20+ и CD95+ клеток (Т-лимфоциты, Т-хелперы/индукторы, Т-цитотоксические/супрессоры, натуральные киллеры, В-лимфоциты и апоптотические клетки соответственно) (рис.1). Отмечались сдвиги функционального состояния иммунитета (рис.2).

У крыс сохранялась атрофия тимуса с отсутствием деления на мозговое и корковое вещество с преобладанием ретикулярных клеток. Дегранулирующие клетки определялись как в строме, так и в паренхиме органа.

В лимфатических узлах в корковой зоне выявлялись вторичные лимфоидные фолликулы со слабовыраженными герминативными центрами. В мозговой зоне синусы были расширены, сохранялся отек, количество клеточных элементов было уменьшено. Дегранулирующие клетки определялись и в корковой зоне.

Белая пульпа селезенки крыс этой группы была более выраженной, чем у животных 1-й группы, кроме лимфоцитов, в ней определялись моноциты и макрофаги в небольшом количестве. Маргинальная зона была более четкая. В красной пульпе отмечалась пролиферация ретикулярного остова, клеточный компонент был менее выражен. Полнокровные сосуды сохранялись.

У животных 2-й группы после иссечения ожогового струпа и трансплантации КАФ рана заживала быстрее, чем в 1-й группе. На 3-и сутки трансплантации большая часть раны была покрыта грануляциями с образованием корки. Открытые участки раны были сухими, с видимым мышечным слоем и капиллярами.

Показатели иммунного статуса этих животных достоверно отличались от таковых у нелеченых крыс. Однако они больше приближались к контролю (100%) с некоторым повышением количества общих лимфоцитов и CD95+ клеток, то есть с более высоким выбросом лимфоцитов в кровотока и процессом апоптоза.

При изучении лимфоидных органов животных на 3-и

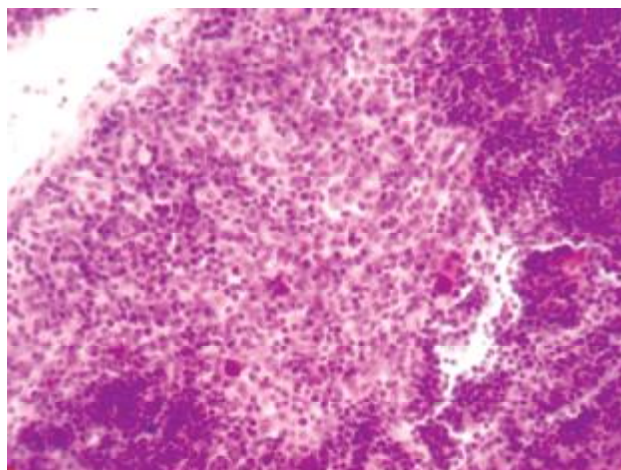


Рис.4. Лимфатический узел крысы на 24-е сутки ОБ. Гиперплазия лимфатического узла по синусовому типу с преобладанием гистиоцитозов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$.

сутки после пересадки КАФ в тимусе, лимфатических узлах и селезенке выявлены изменения, аналогичные таковым в 1-й группе.

На 10-е сутки эксперимента у животных 1-й группы происходило увеличение краевой грануляции ран местами с образованием струпа. Однако при этом наблюдалась плазморея и серозно-гнойное отделяемое из ран.

Эти изменения сопровождалось еще большим повышением количества лимфоцитов (до 156%) и небольшим возрастанием их субпопуляций по сравнению с 6-ми сутками эксперимента. Наблюдалось возрастание на 20% количества CD16+ клеток (до 234%) и снижение числа CD20+ и CD95+ клеток (до 86 и 127% соответственно).

В отличие от тимуса интактных животных, у животных 1-й группы на 10-е сутки в паренхиме железы, наряду с ретикулярными клетками, определялось большое количество лимфоцитов. Имелось нечеткое деление на кору и мозговое вещество. В корковом веществе определялись слабоочерченные лимфоидные фолликулы. Дегранулирующие клетки отсутствовали.

Кортикальная зона лимфатических узлов у этих крыс была расширена за счет вторичных фолликулов, расположенных в несколько рядов. Их герминативные центры находились в стадии расцвета. Паракортикальная зона, напротив, была узкой. Мозговая зона была относительно сужена. Однако медуллярные синусы в ней определялись, клеточный инфильтрат был гетерогенный, невысокой плотности. Дегранулирующие клетки не выявлялись.

Белая пульпа селезенки этих животных была более выражена, кроме лимфоцитов по периферии в центральных зонах определялись моноциты и макрофаги в небольшом количестве. Маргинальная зона четко выявлялась в виде ободка вокруг белой пульпы. В красной пульпе сохранялось полнокровие и расширение сосудов, пролиферация ретикулярной стромы.

У животных 2-й группы на этом этапе клинические признаки ОБ исчезали. Наблюдался процесс отторжения корки с краев раны за счет начала активной эпителизации.

В отличие от 1-й группы, изменение количественных показателей иммунного статуса выражалось в увеличении уровня общих лимфоцитов (до 177% против 156% в 1-й

группе) и снижении числа CD16+ клеток (до 165% против 234% в 1-й группе). Различия остальных показателей были не достоверными.

На 7-е сутки после пересадки КАФ (10-е сутки ОБ), в отличие от 1-й группы, в паренхиме вилочковой железы все еще обнаруживались дегранулирующие клетки, диффузно-разбросанные по строме органа. В ткани лимфатического узла лимфоидные фолликулы первичные без герминативных центров, синусы медуллярной зоны расширены. В селезенке визуализировалась гиперплазия белой пульпы с формированием лимфоидных фолликулов с макрофагами, красная строма с большим количеством плазмочитов (рис.3).

На 24-е сутки развития ОБ у животных 1-й группы происходило дальнейшее развитие струпа с признаками гнойного воспаления в ране и реактивного воспаления в мягких тканях с краевыми вялыми неравномерными грануляциями без признаков эпителизации. Частичное сокращение площади раны происходило за счет краевой контракции.

Иммунологическое исследование животных выявило снижение количества общих лимфоцитов с тенденцией к нормализации содержания CD3, CD4, CD8, CD20+ клеток, но с высоким содержанием CD16+ и CD95+ клеток.

У крыс с ОБ было явно выражено ухудшение всех показателей реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ). Отмечались различия в активности спонтанных цитокинов (СПЦ) сыворотки и реакции на С-реактивный белок (СРБ). Была снижена продукция ФУМ-Л.

У опытных животных определялась гиперплазия тимуса с четким делением на мозговое вещество и кору. В корковом веществе определялись диффузно разбросанные макрофаги. Дегранулирующие клетки отсутствовали.

В отличие от интактных крыс, у животных 1-й группы кортикальная зона лимфатических узлов была узкая, атрофированная, лимфоидные фолликулы в ней практически не определялись. Медуллярные, кортикальные синусы были расширены за счет пролиферации гистиоцитов (рис.4).

В селезенке этих же животных белая пульпа была умеренно выражена, в основном состояла из лимфоцитов. Маргинальная зона нечеткая. В красной пульпе преобладала пролиферация ретикулярной стромы.

У животных 2-й группы на 21-е сутки после трансплантации КАФ (24-е сутки ОБ) наблюдалось полное заживление раны за счет активной эпителизации и краевой контракции. Рана была сухая и покрыта полноценным розовым покровом.

Иммунологические показатели достоверно не отличались от таковых у животных 1-й группы, однако их уровень больше приближался к контролю.

Явно выраженные положительные изменения клинических признаков и качество заживления ран у животных 2-й группы под влиянием трансплантации КАФ больше объясняются разницей в изменении функциональных параметров. На 24-е сутки эксперимента наблюдалась более выраженная тенденция к нормализации спонтанной миграции лейкоцитов (СМЛ), ФАН и КонА-индуцированной продукции ФУМ и ФСМ.

Гиперплазия тимуса с четким делением паренхимы на мозговое вещество и кору со множеством диффузно-разбросанных макрофагов определялась в тимусе крыс на 21-е сутки трансплантации КАФ. Коровая зона лимфатичес-

ких узлов этих животных была узкая, преобладала мозговая зона за счет расширенных отечных синусов и множества плазмочитов. В селезенке же наблюдался регресс белой пульпы, в красной пульпе среди ретикулярного остова было относительно снижено количество свободных клеток.

Обсуждение

В ходе экспериментов, проведенных на крысах с ОБ, после некрэктомии мы наблюдали позднее неравномерное формирование грануляций, покрытых гнойно-фибринозным налетом, с умеренным гнойным отделяемым. Грануляции формировались неравномерно, по краям раны даже на 24-е сутки имелись участки ран без развития грануляционной ткани. Раны покрывались струпом умеренной плотности и толщины, с признаками гнойного воспаления в ране и реактивного воспаления в мягких тканях по ее периферии. Сокращение площади раны происходило лишь за счет краевой контракции, без каких-либо признаков эпителизации.

Иммунологические исследования показали, что ОБ у крыс сопровождается количественным Т-клеточным дефицитом, нарушениями естественных факторов защиты и функциональной активности Т-клеточного иммунитета. У подопытных животных было явно выражено ухудшение всех показателей РТМЛ. Особое внимание обращали на себя различия в активности спонтанных цитокинов сыворотки и реакции на С-реактивный белок, особенно выраженные на 10-й день эксперимента. До конца эксперимента у животных оставалась сниженной продукция ФУМ-Л, характеризующая активность Th1, более выраженное нарушение баланса спонтанных цитокинов сыворотки, отражающих состояние иммунного гомеостаза, и высокая реактивность к С-реактивному белку - белку острой фазы воспаления [6].

Морфологические исследования выявили, что в тимусе животных с ОБ на начальных этапах заболевания определяются дегранулирующие клетки, располагающиеся вначале в капсуле и строде органа, а затем и в его паренхиме. Эти клетки являются маркерами стресса и, по видимому, играют роль стимуляторов иммуногенеза. В дальнейшем у крыс с ОБ наблюдается постепенный расцвет ткани вилочковой железы с образованием патологических фолликулов. Подобная реакция тимуса была характерна для аутоиммунных процессов [9]. Было также установлено, что течение ОБ у крыс сопровождается выраженной реакцией лимфоидной ткани в виде гиперплазии лимфоидных узлов по фолликулярному типу и селезенки с гиперплазией белой пульпы на 6-10-е сутки заболевания, что свидетельствует об активации гуморального иммунитета. Паракортикальная зона, напротив, остается невыраженной. В дальнейшем фолликулярный тип гиперплазии сменяется синусовым с преобладанием явлений гистиоцитоза. Подобный тип гиперплазии характерен для хронически текущих процессов в коже с избыточным поступлением кожных антигенов [10].

В экспериментах после хирургической некрэктомии ожоговых ран мы ускорили образование гранулирующих ожоговых ран путем трансплантации КАФ (2-я группа). Поверхностные слои грануляционной ткани подсыхали, что объяснялось открытым бесповязочным ведением ожоговых ран. При этом образовывалась «корка», которая

покрывала грануляции, выполняла защитную роль. Пересадка КАФ способствовала не только раннему развитию грануляционных тканей, но и стимулировала активную краевую эпителизацию, что визуально проявлялось постепенным отторжением «корки», начиная с краев раны, с обнажением молодой ярко-розового цвета кожи.

При сравнении показателей иммунного статуса у животных 1-й и 2-й групп разница выявлена в основном в содержании общих иммунокомпетентных клеток: CD3+, CD4+ и CD20+ клеток. В группе животных с трансплантацией КАФ эти показатели были выше. Явные положительные изменения клинических признаков и качество заживления ран у животных под влиянием трансплантации КАФ сопровождается менее выраженными изменениями иммунного статуса, чем у нелеченых животных.

В ранее опубликованных работах отмечалось, что ускорение заживления ран при внесении суспензии фибробластов связано со способностью последних синтезировать вещества, стимулирующие миграцию краевых кератиноцитов, их пролиферацию, а также цитокины, оказывающие воздействие на местный и системный иммунитет [1]. Это согласуется с мнением о том, что положительное влияние трансплантации культивированных клеток связано с воздействием специфических факторов регенерации и продуцируемыми при этом цитокинами [8].

У животных с пересадкой КАФ дегранулирующие клетки сохраняются в более поздние сроки заживления, определяется также гиперплазия тимуса с диффузно-разбросанными макрофагами, однако без образования лимфоидных фолликулов. Фолликулярный тип гиперплазии лимфатических узлов и умеренная гиперплазия белой пульпы селезенки также наблюдаются у крыс 2-й группы на 14-е сутки после пересадки КАФ. На 21-й день после трансплантации КАФ у животных отмечается заживление раны. Морфологически в этот срок процессы в корковой зоне лимфатических узлов затихают, преобладает синусовый тип гиперплазии, но за счет расширения и полнокровия синусов, содержащих большое количество лимфоцитов и плазмочитов.

Выводы:

1. Полное закрытие раневого дефекта у крыс с трансплантацией КАФ происходит к 21-м суткам за счет как краевой контракции раны, так и активной краевой эпителизации с формированием полноценного кожного покрова.

2. Применение трансплантации КАФ на поверхность ожоговых ран сопровождается выраженной нормализацией количественных и особенно функциональных показателей иммунного статуса, определяемых с помощью РТМЛ.

3. Применение трансплантации КАФ при лечении ожоговых ран у крыс сопровождается менее бурной реакцией лимфоидных органов на термическое повреждение с более ранней нормализацией морфологических признаков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блинов М.И., Пармонов Б.А., Кухарева Л.В. и др. Влияние фибробластов, коллагена и ламинина на процесс заживления ран. Бюл. экпер. биол. и мед. 1997;

124 (8): 229-232.

2. Вихриев Б.С., Бурмистров В.М. Ожоги. Л. Медицина 1986; 271.
3. Гариб Ф.Ю., Гариб В.Ф., Ризопулу А.П. Способ определения субпопуляций лимфоцитов. ПП РУЗ №2426. Расмий ахборотнома 1995; 1: 90.
4. Залляева М.В. Методы оценки субпопуляций лимфоцитов периферической крови у человека. Метод. рекомендации. Ташкент 2004; 16.
5. Кузнецов Н.М., Малка О.Н., Шанина Л.Н. и др. Применение культивируемых клеток для закрытия дефектов кожи. Новые методы лечения ожогов с использованием культивируемых клеток кожи. Саратов 1998; 20-24.
6. Миркамалова Л.И., Зуннунова С.З. Миграционная активность лейкоцитов и лимфокины, регулирующие их миграцию у человека в процессе адаптации. Журн. теорет. и клин. мед. 2000; 4: 155-157.
7. Уразметова М.Д., Шек А.А. Способ лечения ожогов и ран. Патент РУЗ №4995. 1998.
8. Хаджибаев А.М., Акзамов А.А., Уразметова М.Д. Трансплантация изолированных гепатоцитов при остром поражении печени в эксперименте. Мед. журн. Узбекистана 2004; 6: 50-53.
9. Aster J.C. Disease of white blood cells, lymph nodes, spleen, and thymus. Robbins' pathologic basis of disease. 2003; II (14): 11.
10. Ioachim H.L. Lymph Node Pathology. 1994; 22.

Каламушларнинг куйиш касаллигида ўстирилган аллофибробластларни кўчириб ўтказилганда куйган яранинг битиш жараёни, иммунитет кўрсаткичларини ва лимфоид органларининг патоморфологиясини таққослаб ўрганиш

Ш.Х.Мамадалиев, Р.С.Ажиниязов, Д.А.Джабриев, А.Д.Фаязов, М.Д.Уразметова, О.А.Рагжапов

Республика шойлинич тиббий ёрдам илмий маркази

Куйиш касаллиги (КК) бўлган каламушларнинг чуқур куйган яраларига ўстирилган аллофибробластларни (ЎАФ) кўчириб ўтказилиши КК аломатларини эртароқ тузалишига ва яра жараёни яхши кечишига олиб келади. Куйган яраларнинг устига ЎАФ кўчириб ўтказилишини қўллаш КК аломатларини эртароқ тузалишига, яра дефектини бутунлай ёпилишига олиб келади, ҳамда иммунитет ҳолатининг миқдорий ва айниқса лейкоцитларнинг миграциясини тўхтатиш реакцияси ёрдамида аниқланадиган функционал кўрсаткичларининг яққол нормаллашуви билан кузатилиб борилади. КК бўлган каламушларда ЎАФ кўчириб ўтказилганда ўтказилган морфологик текширувлар ЎАФ қўлланилиши лимфоид органларнинг термик жароҳатга камроқ реакцияси ва морфологик хусусиятларининг эрта нормалланишуви билан кузатилиб келинади.