

УДК 612.75+616-001.186+615.9

*Н.А. Клименко, Л.В. Леонтьева**

Харьковский национальный медицинский университет

**ГУ «Институт общей и неотложной хирургии АМН Украины», г. Харьков*

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИНАМИКИ ВОСПАЛИТЕЛЬНО-РЕПАРАТИВНОГО ПРОЦЕССА ПОСЛЕ ЛОКАЛЬНОЙ ХОЛОДОВОЙ ТРАВМЫ В УСЛОВИЯХ ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

В эксперименте на 120 крысах изучали влияние предварительной острой и хронической алкогольной интоксикации на течение воспалительно-репаративного процесса после локального отморожения III степени и площадью 6,15 см². Установлено, что хроническая алкогольная интоксикация отрицательно влияет на течение раневого процесса, замедляя отторжение зон некроза, образование грануляционной ткани, синтез и созревание коллагена.

Ключевые слова: *отморожение, хроническая алкогольная интоксикация, воспалительно-репаративный процесс, грануляционная ткань.*

Для выработки хирургической тактики при лечении локальных холодовых повреждений крайне важно как можно раньше определить степень отморожения и произвести адекватную хирургическую обработку раны [1–3]. При этом ранняя диагностика отморожений представляет собой самостоятельную теоретическую и методологическую проблему. Предлагались различные методы ее решения: визуальная оценка раневой поверхности, определение микроциркуляции с помощью реовазографии или ультразвукового исследования зоны травмы, термометрии с помощью тепловизора и др. [3–5]. Однако ни один из перечисленных методов не в состоянии через несколько часов после воздействия холодового агента достоверно очертить границы некроза и некробиоза в зоне поражения [3–5]. В то же время это крайне необходимо для поиска диагностически чувствительных лабораторных показателей, которые в дальнейшем позволили бы проводить раннюю и точную диагностику степени отморожения. В связи с изложенным в условиях эксперимента оценку степени отморожения целесообразно проводить с помощью микротонометрического метода, который позволяет непосредственно наблюдать патологические изменения в пораженной ткани.

На патогенез холодового поражения существенно влияет алкогольная интоксика-

ция. В ходе этого процесса реакция организма на холод патологически видоизменяется, что существенно повышает долю летальных исходов [6–9]. Опьянение может дополнительно усугубить воздействие холодового фактора, влияя на поведение человека и на последующий этап восстановления.

Целью данной работы явилось изучение морфологии заживления ран после локальной криодеструкции у предварительно алкогольлизованных животных.

Материал и методы. Опыты проведены на 120 белых беспородных крысах-самцах массой 200–220 г. Подопытных животных разделили на три группы: контрольную и две экспериментальные. Контрольную группу составили животные, у которых было воспроизведено отморожение без алкогольной интоксикации. В первой экспериментальной группе (группа I) отморожение воспроизводили на фоне острой алкогольной интоксикации. Во второй экспериментальной группе (группа II) отморожение воспроизводили на фоне хронической алкогольной интоксикации. Все процедуры с животными, а также выведение животных из эксперимента путем декапитации проводили под анестезией с использованием диэтилового эфира в соответствии с национальными «Общими этическими принципами опытов на животных» (Украина, 2001).

© Н.А. Клименко, Л.В. Леонтьева, 2011

Отморожение моделировали у предварительно наркотизированных тиопенталом натрия животных контактным способом с поражением 4–5 % поверхности тела с помощью стальной гирьки, предварительно охлажденной жидким азотом до температуры -196°C , с площадью контактной поверхности 615 мм^2 при времени экспозиции 90 с. В результате воздействия формировалось отморожение III степени [10–12].

Острую алкогольную интоксикацию вызывали однократным внутрижелудочным введением 40° этанола в дозе 12 мг/кг массы тела (2 мл). Хроническую алкогольную интоксикацию вызывали путем 30-дневного (1 раз в день) внутрижелудочного введения 40° этанола в дозе 12 мг/кг.

Динамику воспалительно-репаративного процесса на месте холодовой травмы описывали в классические фазы: гидратации, дегидратации и эпителизации. В соответствии с этим были определены сроки исследования после криотравмы: 3-и, 7-е и 14-е сутки.

Наряду с изучением метаморфоза раневой поверхности, традиционных качественных критериев стадий заживления, большое внимание уделяли количественным характеристикам, таким как размеры зон некроза, скорость его отторжения, клеточный спектр в зоне воспаления, скорость развития фибробластических процессов и дифференцировки фибробластов, степень дифференцировки эпителиальных клеток.

Исследовали внешний вид пораженной ткани на разрезе, визуально учитывали макроскопические особенности строения. Образцы ткани для дальнейшего морфологического исследования фиксировали в 10 % растворе формалина, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, заливали в целлоидин-парафин, изготавливали срезы толщиной 4–5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином, по методу ван Гизон с использованием стандартных методик. Гистологические срезы изготавливали на микротоме МС-2. Микроскопические препараты исследовали под микроскопом для морфологических исследований МБР-1Е. Увеличение подбирали в соответствии с поставленной целью.

Морфометрическое исследование проводили с помощью стандартной шкалы окуляр-микрометра при стандартных увеличениях $\times 10$ и $\times 40$. Перед началом исследования проводили калибровку сетки окуляр-микрометра с помощью объект-микромет-

ра. При этом одно деление окулярной шкалы было равно 1 мкм при увеличении $\times 10$. Каждый параметр был измерен 10 раз в различных, произвольно выбранных, полях зрения. В качестве морфометрических показателей определяли: клеточную плотность дермы (суммарное число клеток в поле зрения микроскопа), количество макрофагов, лейкоцитов и тучных клеток в поле зрения, толщину росткового слоя, толщину дермы и др. Результаты морфометрических исследований обработаны статистически с использованием программы «Биостатистика», пакета прикладных программ для ПЭВМ «Excel» и критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. В ходе исследования в гистологических препаратах кожи и подлежащих тканей во всех группах определялись изменения в виде коагуляционного некроза, выраженных некробиотических и дистрофических изменений, отека и вакуольной дегенерации соединительной ткани, паретических изменений и тромбозов сосудов, утолщения стенок сосудов, обширных очагов кровоизлияний с формированием рассеянных, очаговых или диффузных, воспалительных инфильтратов. Отмечались глубокие нарушения многослойного плоского эпителия, деструкция его, очаги изъязвления, отторжения, выраженные изменения придатков кожи.

Особенности альтерации после низкотемпературного воздействия состоят в том, что повреждение происходит в две фазы: непосредственный поверхностный некроз клеток под криоапликатором и вторичный ишемический некроз, связанный с блокадой микрогемодинамики в области замораживания.

В течении репаративной регенерации кожи выявлены следующие общие закономерности. На 3-и сутки после локальной криодеструкции при микроскопическом исследовании отмечается резко выраженный коагуляционный некроз с расплавлением ткани и образованием многочисленных мелких кист (вакуолизация соединительной ткани). Наблюдается деструкция всех компонентов кожи (эпидермиса, сосочкового и сетчатого слоев дермы) с густым диффузным воспалительным инфильтратом, представленным полиморфноядерными лейкоцитами с небольшой примесью лимфоцитов и макрофагальных элементов. Сосуды полнокровны, расширены, видны кровоизлияния, микротромбозы. В подкожной жировой клетчатке выявляется лейкоцитарная

инфильтрация, которая в большей степени выражена на границе с собственной мышцей кожи.

При микроскопическом исследовании на 7-е сутки отмечается нарастание лейкоцитарной инфильтрации грануляционно-лейкоцитарного вала, который расположен глубже собственной мышцы кожи и отграничивает некротические участки. Просматривается очень незрелая грануляционная ткань, которая местами рыхлая и немного отечна (рис. 1). Однако выявляется выраженная клеточность грануляционной ткани: в большом количестве наблюдаются не только молодые фибробласты, гистиоциты,

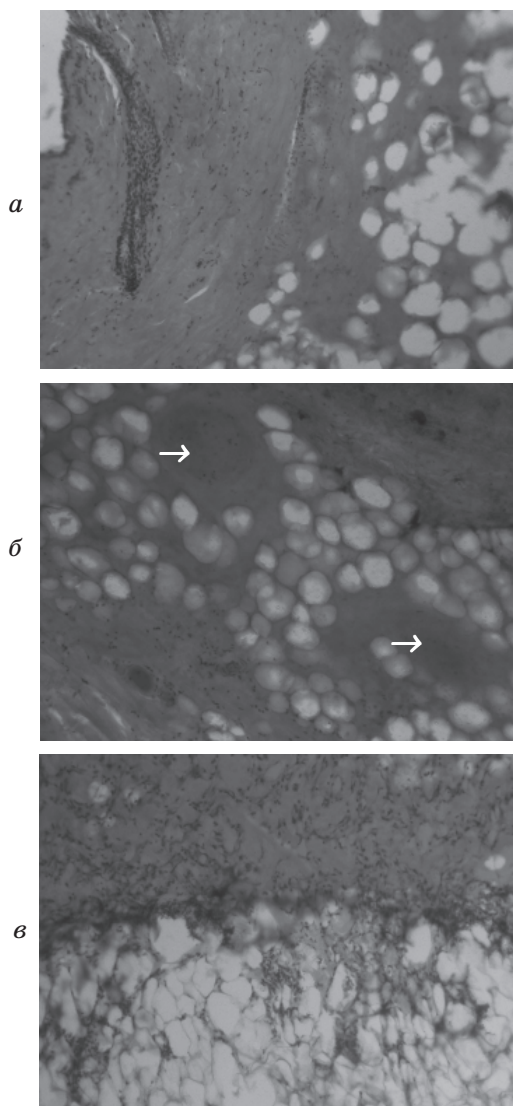


Рис. 1. Кожа крысы через 3 (а) и 7 (б, в) суток после криотравмы, окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$: а — некроз всех слоев кожи и подкожной клетчатки; б — тромбоз сосудов подкожной клетчатки; в — формирование демаркационного вала, воспаление в подкожной клетчатке

лимфоциты, но и нейтрофильные гранулоциты, особенно в неэпителизированных отделах, прикрытых струпом. На значительном протяжении многослойный плоский эпителий или резко истончен, или совсем отсутствует, открывая обширный язвенный дефект с глубокой воспалительной инфильтрацией и кровоизлияниями в подкожной ткани и в сохраненном по краю многослойном плоском эпителии. Под ним располагаются гомогенно окрашенные базальные клетки росткового слоя без ядер. В глубоких слоях дермы наблюдаются расширенные и заполненные кровью сосуды с рыхлыми тромбами в некоторых из них. Определяются вакуолизация соединительной ткани, рассеянный, местами диффузный воспалительный инфильтрат, полнокровные сосуды. Мышечные волокна фрагментированы, окружены круглоклеточным инфильтратом. В глубоких слоях подкожной клетчатки много расширенных, заполненных кровью сосудов, увеличено количество тучных клеток, расположенных периваскулярно.

Через 14 суток демаркация выражена четко, определяется уже на уровне мышечного слоя, но не на всем протяжении некротических масс. Местами, между остатками мышечных волокон и жировых клеток, видно молодую грануляционную ткань, диффузно инфильтрированную лимфоцитами, с обилием тучных клеток и макрофагами, заполняющими дефект. По краям дефекта идет подрастание эпидермального пласта под некротические участки. Дерма — с сохраненной структурой и пролиферацией клеток в стенках волосяных влагалищ, с неравномерной толщиной вновь образующихся стержней (рис. 2).

Несколько иной была картина воспалительно-репаративного процесса в эксперименте с предварительной 30-дневной алкоголизацией животных. На 3-и сутки после нанесения холодовой травмы деструктивные изменения в тканях и кровеносных сосудах были намного больше выражены, чем в контроле. Отмечались гораздо более выраженные явления воспалительной реакции. Значительную площадь занимала язвенная поверхность. Ткань была отечна, сосуды полнокровны, расширены, видны кровоизлияния, микротромбозы. Некроз углублялся, захватывая уже мышечную и рыхлую соединительную ткань. Сосочковый слой кожи был сглажен, эпителиальные клетки всех слоев некротизированы,

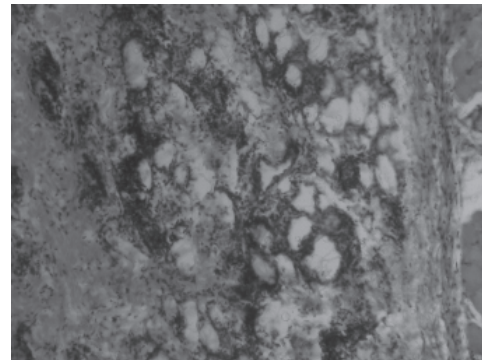
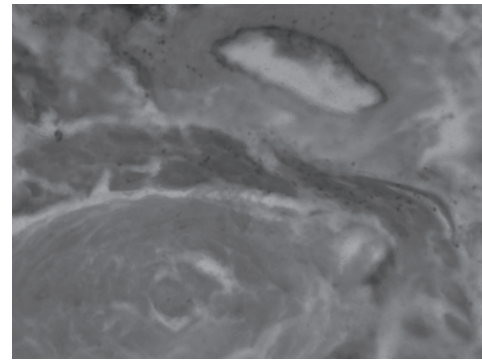
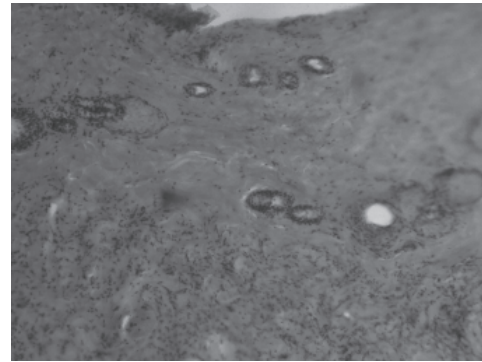
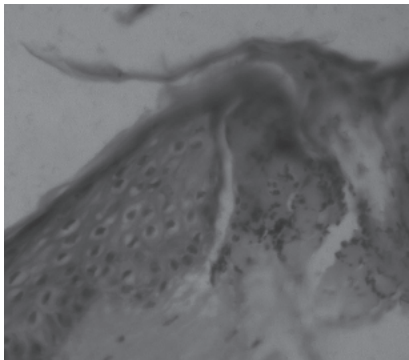
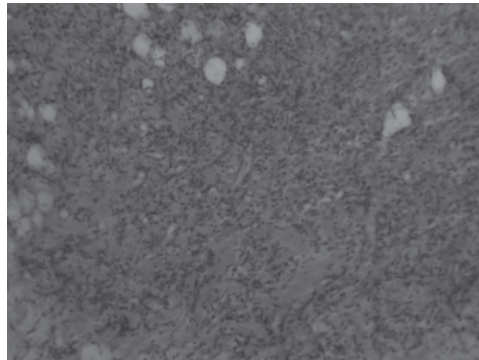
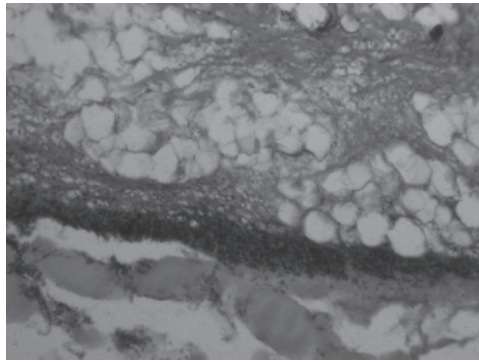


Рис. 2. Кожа крысы через 14 суток после криотравмы, окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$: *a* — демаркационный вал на границе с мышечной тканью; *b* — молодая грануляционная ткань среди остатков мышечных волокон и жировых клеток; *в* — очень слабая эпидермальная кинетика, дистрофия эпидермоцитов в пограничных с дефектом участках кожи

ядра пикнотичны, цитоплазма вакуолизована. Наблюдалась массивная лейкоцитарная инфильтрация дермы, жировой клетчатки. Сосуды были тромбированы, стенки всех сосудов повреждены, часты были кровоизлияния (рис. 3).

На 7-й день местами появлялся не вполне сформированный демаркационный лейкоцитарный вал, отделяющий некротизированные ткани. Определяется коагуляционный некроз с фрагментацией, вакуолизацией, отслойкой и очагами полного отсутствия эпидермиса, некрозом придатков,

Рис. 3. Кожа крысы через 3 суток после криотравмы на фоне предварительной алкоголизации, окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$: *a* — некроз всех слоев кожи; *b* — некроз сосудистых стенок и перивазальной ткани; *в* — воспалительная реакция в подкожной клетчатке

отеком, дистрофией и очагами некроза в дерме, массивной инфильтрацией полиморфноядерными лейкоцитами. В подлежащих отделах — мышечные волокна с межмышечным отеком и воспалительными инфильтратами.

Через 14 суток демаркация четко выражена, определяется на уровне мышечного слоя, но не на всем протяжении некротических масс. Местами, между остатками мышечных волокон и жировых клеток, видно молодую грануляционную ткань. Она состоит из большого количества формирующихся сосудистых петель, ориентированных

перпендикулярно к раневой поверхности, и многочисленных тяжёлых фибробластов. Среди фибробластов встречаются клетки с митозами. По краям дефекта эпидермальная кинетика (гипертрофия, гиперплазия эпидермоцитов) невыразительная. Грануляционная ткань диффузно инфильтрирована лимфоцитами, с обилием тучных клеток и макрофагами, заполняющими дефект.

Можно отметить, что накопление фибробластов в ране у животных с предварительной алкоголизацией (II группа) происходило менее интенсивно, чем у животных с естественным течением отморожения (контрольная группа). Зрелые фибробласты значительно позже появлялись в зоне повреждения. Репаративные процессы протекали менее активно, о чем свидетельствует количество фибробластов в ране. Формирование грануляционной ткани происходило на 14-е сутки, а не на 7-е, т. е. гораздо позже.

Одноразовое введение алкоголя не оказывало заметного влияния на морфологический процесс. По данным морфометрического анализа достоверная разница наблюдается лишь при сравнении групп с естественным течением отморожения и на фоне длительной алкогольной интоксикации (таблица).

Через 3 суток после холодовой травмы у животных контрольной группы клеточная плотность дермы составляла $68,29 \pm 2,25$, тогда как у животных с хронической алкогольной интоксикацией — $75,43 \pm 2,10$. Исходя из этого, уже можно предположить, что

воспалительный процесс будет носить более затяжной характер в последнем случае.

Обращают на себя внимание различия не только в количественном, но и в качественном составе клеток дермы. Так, процентное соотношение полиморфноядерных лейкоцитов и клеток фибробластического дифферона гораздо выше у животных с длительной алкоголизацией, что свидетельствует о более затяжной воспалительной реакции при алкоголизации, а следовательно, и о более длительном заживлении раны [3, 7, 8].

Максимальное количество макрофагов у животных с естественным течением отморожения наблюдается на 3-и сутки, к 14-м суткам их количество постепенно уменьшается, а у животных с длительной алкоголизацией максимальное количество макрофагов наблюдается на 14-е сутки. Данный факт свидетельствует о том, что при длительной алкоголизации грануляционная ткань формируется со значительным опозданием.

Процентное содержание клеток фибробластического дифферона имеет сходную тенденцию. Так, в группе с естественным течением отморожения количество фибробластов на 14-е сутки составляет 65,1 %, а у животных с хронической алкогольной интоксикацией — 43,8 %, что также свидетельствует о сниженной регенераторной активности при алкоголизации.

Таким образом, данные морфологических исследований подтверждают тот факт, что сочетание локального отморожения с хронической алкогольной интоксикацией

Морфометрическая характеристика холодовой кожной раны у контрольной и экспериментальных групп крыс ($M \pm t$)

Группа	Срок исследования, сутки	Клеточная плотность дермы, гиподермы, в поле зрения	Кол-во полиморфноядерных и мононуклеарных лейкоцитов		Кол-во макрофагов	Кол-во тучных клеток	Кол-во клеток фибробластического дифферона	
			абс.	%			абс.	%
Контроль	3-и	$68,29 \pm 2,25$	$40,14 \pm 1,92$	58,8	$13,14 \pm 1,10$	$1,43 \pm 0,20$	$13,86 \pm 1,34$	20,3
	7-е	$64,43 \pm 1,73$	$23,28 \pm 1,44$	36,15	$11,29 \pm 0,61$	$5,14 \pm 0,59$	$28,43 \pm 1,73$	44,1
	14-е	$49,57 \pm 1,76$	$11,29 \pm 0,92$	22,9	$5,14 \pm 0,51$	$2,14 \pm 0,34$	$32,29 \pm 1,51$	65,1
I	3-и	$66,57 \pm 1,67$	$40,86 \pm 1,41$	61,4	$12,57 \pm 0,92$	$1,29 \pm 0,36$	$12,57 \pm 0,78$	18,9
	7-е	$63,14 \pm 1,65$	$22,86 \pm 1,34$	36,2	$10,29 \pm 0,56$	$5,43 \pm 0,57$	$30,57 \pm 1,98$	48,4
	14-е	$51,14 \pm 1,47$	$13,43 \pm 0,99^*$	26,3	$6,14 \pm 0,63$	$2,43 \pm 0,29$	$31,86 \pm 1,34$	62,3
II	3-и	$75,43 \pm 2,10^{*\wedge}$	$56,14 \pm 2,05^{\wedge}$	74,6	$7,71 \pm 0,57^{*\wedge}$	$1,13 \pm 0,25$	$9,29 \pm 0,94^{*\wedge}$	12,3
	7-е	$70,29 \pm 1,06^{*\wedge}$	$38,29 \pm 1,30^{\#@}$	54,5	$9,14 \pm 0,67$	$2,71 \pm 0,29^*$	$23,86 \pm 1,10^{*\wedge}$	33,9
	14-е	$56,71 \pm 1,98^{\wedge}$	$19,57 \pm 1,39^{\#^{\wedge}}$	34,5	$11,14 \pm 0,83^{\#^{\wedge}}$	$2,14 \pm 0,26$	$24,83 \pm 1,30^{*\wedge}$	43,8

Примечание. Разница достоверна при сравнении с показателем контроля: * $p < 0,05$; # $p < 0,01$; показателем крыс I группы: \wedge $p < 0,05$; \circledast $p < 0,01$.

отрицательно влияет на процессы воспаления и регенерации в кожной ране, затягивая воспаление, замедляя клеточную дифференцировку и ослабляя процесс регенерации. Хроническая алкоголизация животных отрицательно влияет на течение воспалите-

льно-репаративного процесса при локальной холодовой травме, снижая как скорость отторжения зон некроза, образования грануляционной ткани и накопления фибробластов, так и интенсивность синтеза коллагена в ране и его созревания.

Список литературы

1. Влияние парентерального введения мелатонина на биохимический состав грануляционно-фиброзной ткани крыс / Т. В. Володина, Е. Г. Ольшевский, Ю. В. Абрамов [и др.] // Вопросы медицинской химии. — 2001. — № 4. — С. 1–8.
2. Котельников В. П. Отморожения / В. П. Котельников. — М. : Медицина, 1988. — 255 с.
3. Имашева А. К. Особенности регенераторных процессов кожи при термических ожогах / А. К. Имашева, М. В. Лазыко // Фундаментальные исследования. — 2009. — № 5. — С. 22–24.
4. Ноздрин В. И. Морфологические аспекты дерматотропного действия метилурацила в условиях кожного применения / В. И. Ноздрин, Т. А. Белоусова, А. Н. Яцковский // Морфология. — 2002. — Т. 122, № 5. — С. 74–78.
5. Дифференциальная диагностика отравления этиловым алкоголем и смерти от охлаждения / В. П. Десятов, Ю. А. Шамарин, А. Д. Шнайдер, Ю. Н. Бунин // Теория и практика судебно-медицинской травматологии. — 1982. — № 2. — С. 90–92.
6. Патогенез и гистоморфологические особенности рубцовых изменений кожи / О. В. Жукова, Н. Н. Потекаев, А. Г. Стенько, А. А. Бурдина // Клиническая дерматология и венерология. — 2009. — № 3. — С. 4–9.
7. Волина В. В. Динамика морфологических изменений кожи после криовоздействия / В. В. Волина, Ю. И. Исаев // Вопросы криоконсервирования биологических объектов. — К., 1978. — С. 28–30.
8. Григорьева Т. Г. Холодовая травма. Отморожения / Т. Г. Григорьева // Международный медицинский журнал. — 2001. — Т. 7, № 2. — С. 42–48.
9. Баженов Ю. И. Влияние этанола на физиологические функции организма / Ю. И. Баженов, А. Ф. Баженова, Я. Ю. Волкова // Вестник Иванов. гос. ун-та. — 2002. — № 3. — С. 14–19.
10. Кухар І. Д. Вплив локальної криодеструкції шкіри щурів на вміст кортикостерону і серотоніну в крові / І. Д. Кухар // Вісник наук. досліджень. — 2000. — № 1. — С. 86–87.
11. Шаповалов К. Г. Патогенетические механизмы местной холодовой травмы : автореф. дис. на соискание уч. степени д-ра мед. наук / К. Г. Шаповалов. — Чита, 2009. — 45 с.
12. Local cold injuries sustained during military service in the Norwegian Army / L. Rosen, L. Eltvik, A. Arvesen, E. Strandén // Arctic Med. Res. — 1991. — V. 50. — P. 159–165.
13. Ervasti E. Frostbite of the extremities and their sequelae / E. Ervasti // Acta Chir. Scand. — 1969. — V. 299. — P. 1–69.

М.О. Клименко, Л.В. Леонтьева

МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ДИНАМІКИ ЗАПАЛЬНО-РЕПАРАТИВНОГО ПРОЦЕСУ ПІСЛЯ ЛОКАЛЬНОЇ ХОЛОДОВОЇ ТРАВМИ ЗА УМОВ ГОСТРОЇ І ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

В експерименті на 120 щурах вивчали вплив передчасної гострої і хронічної алкогольної інтоксикації та перебіг запально-репаративного процесу після локального відмороження III ступеня і площею 6,15 см². Встановлено, що хронічна алкогольна інтоксикація негативно впливає на перебіг ранового процесу, уповільнюючи відторгнення зон некрозу, утворення грануляційної тканини, синтез та дозрівання колагену.

Ключові слова: відмороження, хронічна алкогольна інтоксикація, запально-репаративний процес, грануляційна тканина.

N.A. Klimentko, L.V. Leontyeva

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF INFLAMMATORY REPARATIVE PROCESS DYNAMICS AFTER LOCAL COLD TRAUMA ON BACKGROUND OF ACUTE AND CHRONIC ALCOHOLIC INTOXICATION

Experiments on 120 rats were performed to find the effects of acute and chronic alcoholic intoxication on inflammatory reparative process after frostbite of 3rd stage and of 6,15 cm² area. It was determined, that chronic alcoholic intoxication negatively influence on the wound process, decreasing a tearing of zones of necrosis, formation of granulation tissue, synthesis and maturation of collagen.

Key words: cold trauma, chronic alcoholic intoxication, inflammatory reparative process, granulation tissue.

Поступила 10.03.11