

УДК [616-001.17.-085.355:577.152.34]-092.9

*Т.В. Звягинцева, А.В. Александрова, О.В. Наумова*

*Харьковский национальный медицинский университет*

### **МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОЖОГА У КРЫС ПРИ ЛЕЧЕНИИ СИНТЕТИЧЕСКИМ ИНГИБИТОРОМ МАТРИЧНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ ДОКСИЦИКЛИНОМ**

Изучены морфологические особенности термического ожога кожи крыс при использовании синтетического ингибитора матричных металлопротеиназ доксициклина. Под влиянием доксициклина заживление протекает интенсивнее, чем при лечении препаратом сравнения метилурацилом, что проявляется ограничением деструктивного процесса в пределах эпидермиса и дермы, отсутствием гнойно-некротических осложнений, ускорением эпителизации и полным закрытием дефекта в большинстве наблюдений.

**Ключевые слова:** *ожоговая рана, патоморфология, доксициклин.*

Ожоги являются одним из широко распространённых травматических поражений кожи. В структуре общего травматизма они занимают третье место среди травм мирного времени [1]. Термическая травма вызывает в организме пострадавших глубокие системные изменения. Значительные качественные и количественные изменения метаболических процессов происходят сразу после ожога [2]. Эндогенная интоксикация и связанное с ней снижение неспецифической резистентности организма вызывают значительные морфофункциональные изменения органов и тканей при термическом ожоге. Эти нарушения продолжают вплоть до полного заживления ожоговых поверхностей [3]. Как показало наше исследование [4], применение синтетического ингибитора матричных металлопротеиназ доксициклина улучшает репаративные процессы, ускоряя заживление. Для подтверждения этого результата необходимо провести морфологическое исследование кожи области ожога.

Целью настоящего исследования явилось изучение морфологических особенностей заживления ожоговой раны крыс при применении синтетического ингибитора матричных металлопротеиназ доксициклина.

**Материал и методы.** Эксперименты по моделированию ожогов выполнены на 96 крысах популяции WAG массой 200–250 г.

© *Т.В. Звягинцева, А.В. Александрова, О.В. Наумова, 2012*

На выстриженном участке задней части бедра под барбитуровым наркозом вызывали термический ожог [5]. Животные были разделены на три группы по 24 особи в каждой группе. Первая (контрольная) группа – крысы с термическим ожогом без лечения, крысам второй группы вводили метилурацил в дозе 0,126 мг/кг (препарат сравнения), третьей группы – синтетический ингибитор матричных металлопротеиназ – доксициклин в дозе 2,5 мг/кг. Препараты вводили внутривенно в крахмальной взвеси сразу после термического воздействия и ежедневно в течение всего периода эксперимента (28 суток). Наблюдения за процессами заживления ожоговых ран проводили на 7, 14, 21 и 28-е сутки (по шесть крыс в каждой серии). Материалом для морфологического исследования служили ткани (кожа, подкожная клетчатка, мышцы), иссеченные из зоны термического повреждения бедра крыс всех исследуемых групп в разные сроки эксперимента. Материал фиксировали в 10% -ном нейтральном формалине, после чего иссекали кусочки кожи толщиной около 0,4 см. Материал подвергали спиртовой проводке и парафиновой заливке, изготавливали срезы толщиной 5–6 мкм. Препараты, окрашенные гематоксилином и эозином, использовали для общей оценки состояния исследуемых тканей. Окрашивали препараты фукселином на

эластические волокна по Вейгерту с докрасиванием пикрофуксином по методу ван Гизон для выявления и дифференцировки соединительнотканых структур. С помощью ШИК-реакции по Мак-Манусу – Хочкису (контроль с амилазой) выявляли нейтральные гликозаминогликаны. Гистологические и гистохимические методики выполняли согласно Р. Лилли и Э. Пирс [5, 6]. Все процедуры с животными, а также выведение животных из эксперимента путём декапитации проводили под анестезией с использованием тиопентал-натрия в соответствии с Общими этическими принципами опытов на животных (Украина, 2001), которые согласуются с положениями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986), а также Хельсинкской декларацией, принятой Генеральной ассамблеей Всемирной медицинской ассоциации (1964–2000), Уставом Украинской ассоциации по биоэтике и нормами GLP (1992).

**Результаты и их обсуждение.** В первой группе животных на 7-е сутки эксперимента во всех наблюдениях на поверхности зоны термического ожога эпидермис, как правило, отсутствует. Сохранённые вблизи устьев волосяных фолликулов отдельные островки эпидермиса не дифференцированы на слои и характеризуются выраженными дегенеративными изменениями клеток. В трёх наблюдениях эпидермис практически полностью отсутствует. В островках сохранённого эпидермиса определяется его слабо ШИК-позитивная базальная мембрана в виде тонкой прерывистой линии, на остальном протяжении она отсутствует.

Подлежащие ткани дермы, гиподермы, мышечного слоя с выраженными деструктивными изменениями (рис. 1). Эндотелий дермы десквамирован, базальная мембрана при ШИК-реакции не определяется, стенка эозинофильная, гомогенная, слои не дифференцируются.

Сосуды гиподермы и мышечного слоя с тотальным и субтотальным фибриноидным некрозом стенки лишены эндотелиальной выстилки. Базальная мембрана сосудов неравномерно выражена, слабо ШИК-позитивна.

Зона некроза отграничена от подлежащих тканей в краях и дне раны зоной демаркационного воспаления с отёком тканей и полнокровием сосудов. На 14-е сутки эксперимента микроскопически во всех наблюдениях зона повреждения лишена эпи-

телиальной выстилки и покрыта струпом. В струпе содержатся обрывки некротизированного эпидермиса, фибрин, многочисленные лейкоциты и макрофаги, свободно лежащие и фагоцитированные колонии бактерий. Под струпом определяется узкий слой фибриноидного некроза тканей. Грануляционная ткань представлена многочисленными сосудами капиллярного типа. Количество сосудов и клеточных элементов по направлению ко дну раны в грануляционной ткани уменьшается, содержание соединительнотканых волокон, складывающихся в фуксинофильные пучки, нарастает. В четырёх из шести наблюдений под струпом наблюдается скопление гнойного экссудата с распространением его на прилегающую грануляционную ткань. Очаги фибриноидного некроза окружены демаркационной зоной.

На 21-е сутки эксперимента во всех наблюдениях продолжается эпителизация поверхности области термического воздействия, однако центральная зона на значительном протяжении остаётся без эндотелиальной выстилки и покрыта струпом из фибрина, обрывков некротизированных волоконистых структур, сегментированных лейкоцитов. В двух наблюдениях отмечаются участки с отторжением струпа, покрытые гнойным экссудатом с распространением процесса на подлежащую ткань регенерата. Под струпом и эпителием располагается широкий пласт молодой соединительной ткани.

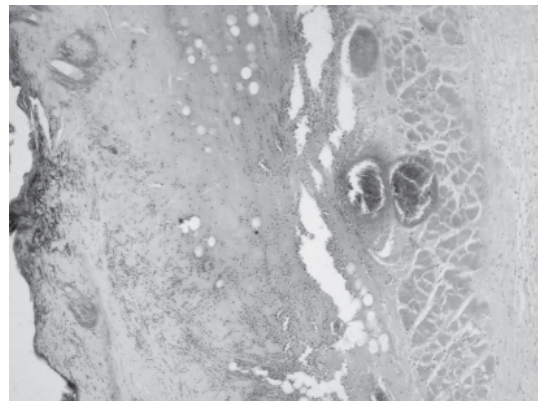


Рис 1. Глубокие деструктивные изменения кожи, подкожной клетчатки и мышечного слоя крыс первой группы, 7-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$

На 28-е сутки микроскопически в препаратах кожи исследуемой группы в большинстве наблюдений зона регенерата полностью покрыта эпителиальным пластом не-

равномерной толщины. Очагово отмечается гиперплазия эпидермиса с эндофитным ростом в подлежащую ткань (акантоотические разрастания). В двух наблюдениях преимущественно в шиповатом слое определяется очаговый спонгиоз. Роговой слой рыхлый, объёмный, в группах клеток видны очаги паракератоза. Базальная мембрана эпидермиса выражена неравномерно – с участками утолщения, расслоения и истончения.

Таким образом, термический ожог кожи у крыс, не получавших лечение, протекает по типу неполной репаративной регенерации с формированием рубцовой ткани. Полученные данные согласуются с данными [5].

Во второй группе животных (лечение метилурацилом в дозе 0,126 мг/кг) к 7-м суткам эксперимента обнаруживаются выраженные деструктивные изменения, захватывающие эпидермис, дерму и в половине наблюдений гиподерму и мышечную ткань. Зона термического воздействия лишена эпидермальной выстилки, за исключением периферических отделов и устьев волосяных фолликулов. Под эпидермисом некротизированная дерма без дифференцировки на сосочковый и сетчатый слои. В подлежащей зоне, соответствующей гиподерме и мышечному слою, разрушенные ткани визуализируются в виде пикринофильных масс. Зона некроза отделена от окружающих тканей неравномерно выраженным слоем молодой грануляционной ткани, представленной отдельными островками, местами сливающимися между собой.

На 14-й день эксперимента в препаратах кожи зона термического воздействия во всех наблюдениях покрыта струпом неравномерной толщины. Под струпом определяется зона регенерата, представленного широким пластом созревающей грануляционной ткани. Верхний слой пласта состоит из равномерно расположенных новообразованных тонкостенных сосудов приблизительно одного диаметра. По направлению к нижним отделам регенерата часть сосудов запустевает и их количество уменьшается. В краях регенерата наблюдается вращение эпидермиса под струп с очаговой его гиперплазией, количество рядов клеток здесь достигает шести–восьми. В двух наблюдениях поверхность препарата частично покрыта гнойными наложениями с наличием свободно лежащих и фагоцитированных колоний бактерий, подлежащая грануляционная ткань с выраженной лейкоцитарной инфильтрацией, очаговыми поверх-

ностными некрозами. В двух наблюдениях в глубоких отделах прилежащих к регенерату тканей определяются вторичные очаговые стромальные некрозы.

К 21-м суткам эксперимента продолжается эпидермизация зоны регенерата, однако центральные отделы во всех наблюдениях лишены эпидермальной выстилки и покрыты струпом. В низлежащих отделах регенерата преобладают фуксинофильные коллагеновые волокна, формирующие пучки, ориентированные параллельно поверхности кожи. Сосудистая базальная мембрана утолщена, непрерывна, ШИК-позитивна (рис. 2). Встречаются немногочисленные фибробласты и фиброциты. Придатки кожи в зоне регенерата не визуализируются. В трёх наблюдениях в прилежащих к регенерату тканях отмечаются межмышечный склероз, огрубение и утолщение нервных стволиков, мелкие стромальные некрозы.

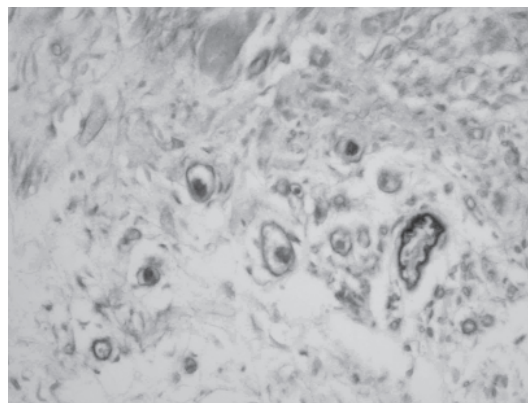


Рис. 2. Огрубение и утолщение базальной мембраны сосудов в глубоких отделах зоны регенерата крыс второй группы, 21-е сутки. ШИК-реакция,  $\times 400$

К 28-м суткам зона регенерата полностью эпителизирована в половине наблюдений. Эпидермис неравномерной толщины с очагами гиперпролиферации с формированием акантоотических разрастаний, количество рядов клеток колеблется от четырех–пяти до шести–восьми. Зона регенерата представлена волокнистой соединительной тканью, состоящей из слабо и умеренно фуксинофильных пучков коллагеновых волокон.

Таким образом, метилурацил способствует заживлению, формированию грануляционной ткани, её эпителизации, однако в половине наблюдений процесс репарации характеризуется незаконченной эпидермизацией и торможением созревания соединительной ткани.

В третьей группе животных (получавших доксициклин в дозе 2,5 мг/кг) к 7-м суткам эксперимента обнаруживаются выраженные деструктивные изменения, захватывающие эпидермис, дерму и в трети наблюдений гиподерму и мышечную ткань. Эпидермис в зоне термического воздействия визуализируется в виде островков, локализованных в периферических отделах и вблизи устьев разрушенных волосяных фолликулов. Зона некроза представлена эозинофильным и фуксинофильным детритом из склеенных между собой обрывков разрушенных волокнистых структур. При ШИК-реакции базальная мембрана сосудов не определяется. Некротически измененные ткани окружены зоной перифокального воспаления.

На 14-й день эксперимента в препаратах кожи зона термического воздействия во всех наблюдениях покрыта струпом неравномерной толщины. Под струпом определяется зона регенерата в виде широкого пласта созревающей грануляционной ткани. В центральных отделах пласта определяются равномерно расположенные многочисленные тонкостенные сосуды капиллярного типа. Придатки кожи в зоне регенерата не визуализируются (рис. 3).

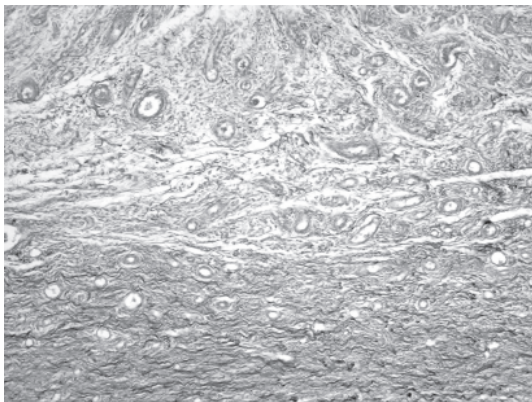


Рис. 3. Зона регенерата, центральный и периферический отделы крыс третьей группы, 14-е сутки. Окраска пикрофуксином по ван Гизон,  $\times 100$

По периферии регенерата под струпом на небольшом протяжении отмечается наполнение эпидермиса на грануляционную ткань с очаговой его гиперплазией в краях до шести-восьми рядов клеток. В одном из шести наблюдений поверхность препарата частично лишена струпа, с гнойными наложениями, в которых определяются свободно лежащие и фагоцитированные колонии бактерий.

К 21-м суткам эксперимента периферические отделы регенерата покрыты эпидер-

мисом, центральные отделы – струпом. В центральном отделе регенерат с неравномерным расположением сосудов, количество которых по сравнению с предыдущим сроком уменьшено. Просвет некоторых сосудов хорошо выражен, в нём определяются многочисленные форменные элементы крови. В периферических отделах регенерата фуксинофильные коллагеновые волокна собраны в пучки, расположенные параллельно поверхности кожи. Придатки кожи в зоне регенерата не визуализируются. В одном наблюдении в прилежащих к регенерату тканях отмечается мелкоочаговый некроз тканей дермы.

К 28-м суткам в пяти наблюдениях из шести зона регенерата полностью покрыта эпидермисом. В одном случае в центральном отделе имеется небольшой участок, покрытый гнойными наложениями. В двух наблюдениях с полной эпидермизацией имеет место очаговый акантоз, количество рядов клеток здесь достигает пяти-шести. На остальном протяжении эпидермис с четкой дифференцировкой на слои (базальный, шиповатый и роговой). При ШИК-реакции базальная мембрана эпидермиса непрерывна, умеренной интенсивности, в участках гиперплазии интенсивность реакции нарастает.

Таким образом, в данной группе крыс применение доксициклина в сравнении с метилурацилом обеспечивает равномерное созревание молодой соединительной ткани, её эпителизацию с нормализацией процессов пролиферации и дифференцировки эпидермоцитов.

#### Выводы

1. Термический ожог у крыс, не получавших лечение, протекает по типу неполной репаративной регенерации с формированием рубцовой ткани.

2. Применение метилурацила ограничивает деструктивные изменения, вызванные термическим ожогом, в пределах эпидермиса, дермы и подкожно-жировой клетчатки, способствует формированию грануляционной ткани, её созреванию и эпителизации, однако в половине наблюдений в центральной зоне регенерата имеет место незаконченная эпидермизация в сочетании с торможением процесса созревания соединительной ткани с сохранением островков грануляционной ткани.

3. Использование синтетического ингибитора матричных металлопротеиназ доксициклина для лечения эксперименталь-

ных животных с термическим ожогом кожи способствует более интенсивному заживлению повреждения, чем при лечении метилурацилом, что подтверждается ограничением деструктивного процесса в пределах

эпидермиса и дермы, отсутствием гнойно-некротических осложнений, ускорением эпителизации и полным закрытием дефекта в большинстве наблюдений в процессе заживления термического ожога.

#### Список литературы

1. Мурадян Р. И. Экстренная помощь при ожогах / Р. И. Мурадян, Н. Р. Панченков. – М. : Медицина, 2003. – 127 с.
2. Ожоговая интоксикация / Г. П. Козинец, С. В. Слесаренко, А. П. Радзиховский [и др.] // Патогенез, клиника, принципы лечения. – К. : Феникс, 2004. – С. 272.
3. Парамонов Б. А. Ожоги: Руководство для врачей / Б. А. Парамонов, Я. О. Порембский, В. Г. Яблонский, СПб. : СпецЛит, 2000. – 480 с.
4. Александрова А. В. Стимуляция заживления ожоговой раны синтетическим ингибитором матричных металлопротеиназ доксициклином / А. В. Александрова // Зб. тез міжвузівськ. конф. молодих вчених та студентів «Актуальні питання діагностики та лікування болю». – Харків, 2011. – С. 6.
5. Звягинцева Т. В. Морфологические изменения кожи крыс после термического ожога при применении мазевых препаратов с разным механизмом действия / Т. В. Звягинцева, А. В. Кривошапка, О. В. Наумова // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Укр. мед. стомат. академії. – Полтава, 2011. – Т. 11, № 2. – С. 34–38.
6. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р. Лилли – М. : Мир, 1960. – 648 с.
7. Пирс Э. Гистохимия (теоретическая и прикладная) / Э. Пирс. – М. : Иностран. лит-ра, 1962. – 962 с.

*Т.В. Звягинцева, А.В. Александрова, О.В. Наумова*

#### МОРФОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОПІКУ У ЩУРІВ ПРИ ЛІКУВАННІ СИНТЕТИЧНИМ ІНГІБІТОРОМ МАТРИЧНИХ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗ ДОКСИЦИКЛІНОМ

Вивчено морфологічні особливості термічного пошкодження шкіри щурів при застосуванні синтетичного інгібітора матричних металлопротеїназ доксицикліну. Під впливом доксицикліну загоєння протікає інтенсивніше, ніж при лікуванні метилурацилом, що проявляється обмеженням деструктивного процесу в межах епідермісу і дерми, відсутністю гнійно-некротичних ускладнень, прискоренням епітелізації та повним закриттям дефекту в більшості спостережень.

*Ключові слова: опікова рана, патоморфологія, доксициклін.*

*T.V. Zvyagintseva, A.V. Aleksandrova, O.V. Naumova*

#### MORPHOLOGICAL RESEARCHES OF RAT'S EXPERIMENTAL BURN AND ITS TREATMENT BY SYNTHETIC INHIBITOR OF MATRIX METALLOPROTEINASES DOXYCYCLINE

The morphological features of thermal rat's burn with usage of synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases of doxycycline have been studied. Under the impact of doxycycline wound healing runs faster in comparison with methyluracil. That indicates limitation of destructive process within the limits of epidermis and dermis, by absence necrotic suppurative complications, acceleration of epithelization and complete closing of the defect in most supervisions.

*Key words: burn injury, pathomorphology, doxycycline.*

*Поступила 19.01.12*