

ВЛИЯНИЕ АЛЛОФИБРОБЛАСТОВ НА ДИНАМИКУ ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ КАРТИНЫ В ОЖГОВОЙ РАНЕ

*Отдел термических поражений и пластической хирургии,
Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака,
Донецкая Народная Республика, 2830045, г. Донецк, Ленинский проспект, 47.
Тел. +380622665010. E-mail: burncenter.vs@gmail.com*

Цель исследования: на основании данных цитологического исследования определить влияние культуры аллофибробластов на течение раневого процесса в ожоговых ранах. Выполнено исследование мазков отпечатков из ожоговых 14 пострадавших в результате взрывов метано-угольной смеси, которые находились на лечении в Донецком ожоговом центре в период с 2009 по 2012 год. В хирургическом лечении данных пострадавших с обширными ожогами применялась клеточная культура аллофибробластов. Выявлено, что смена воспалительного типа цитограммы на регенераторно-воспалительный происходит на исследуемом участке на $7,14 \pm 0,61$ сутки после некрэктомии, на контрольном – на $11,79 \pm 0,62$ сутки. Благодаря использованию культуры аллофибробластов после выполнения некрэктомии при глубоком дермальном ожоге удалось подготовить рану к аутодермотрансплантации в 1,65 раза быстрее, в сравнении со стандартными способами послеоперационного ведения ожоговой раны.

Ключевые слова: ожог, раневой процесс, цитологическое исследование, аллофибробласты.

V.V. SOLOSHENKO

INFLUENCE OF ALLOGENEIC FIBROBLASTS ON THE DYNAMICS CYTOLOGICAL PICTURE IN BURN WOUND

*Department of thermal injuries and plastic surgery
Institute Urgent and Recovery Surgery after Gusak,
Donetsk People's Republic, 2830045, Donetsk, Leninsky avenue, 47.
Tel. +380622665010. E-mail: burncenter.vs@gmail.com*

The aim of the study was to investigate the influence of allogeneic fibroblasts on during wound healing process in burn wound on the basis of cytology data. Achieved smear prints of burn in 14 victims of explosions of methane-coal mixture, which were treated in the Donetsk burn center in the period from 2009 to 2012. In the surgical treatment of these patients with extensive burns used cell culture allogeneic fibroblasts. It was found that the change of inflammatory type prints on the regenerator to the study site occurs at $7,14 \pm 0,61$ days after escharectomy, the control – at $11,79 \pm 0,62$ per day. Through the use of allogeneic fibroblasts after the escharectomy with deep dermal burns were able to prepare a wound to skin grafting 1,65 times faster when compared to standard methods of postoperative management of burn wounds.

Key words: burn, wound process, cytology, allogeneic fibroblasts.

Введение

Впервые о создании раневых покрытий на основе живых клеток стало известно из работ Rheinwald J. в 1975 году. С каждым годом совершенствовались технологии культивирования клеток человека, расширялись показания к использованию. Высокая стоимость культивирования кератиноцитов, чувствительность культуры к внешним воздействиям не позволяет широко применять их в лечении ожоговых ран. Поэтому одновременно велись разработки более надёжных и относительно дешёвых раневых покрытий, состоящих из трёхмерного коллагенового геля и аллофибробластов [1, 6, 7, 9, 11, 12]. Доказано, что при сопоста-

вимой клинической эффективности использования эмбриональных фибробластов более целесообразно по экономическим соображениям [8, 10].

В Институте неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака, г. Донецк, культура аллофибробластов используется в лечении ожогов с 2003 года. В хирургическом лечении обожжённых клеточные технологии использовались как для закрытия ожоговых ран после выполнения некрэктомии, так и для стимуляции пролиферативных процессов в ожоговой ране с целью подготовки к аутодермотрансплантации и ускорения процессов краевой эпителизации. У пострадавших при шахтных авариях наблюдалась комбинированная

термомеханическая травма. Тяжесть состояния у данного контингента была обусловлена развитием синдрома взаимного отягощения на фоне обширного ожога пламенем, термоингаляционного поражения, отравления угарным газом и механической травмы. Нарушение регенераторных процессов в ожоговой ране в условиях развития синдрома взаимного отягощения потребовало применения современных методов воздействия на пролиферативные процессы в ожоговой ране. Наиболее клинически эффективным и доступным методом воздействия на раневой процесс была культура аллогенных фибробластов. В данной работе ставилась задача: определить влияние культуры аллофибробластов на течение раневого процесса в ожоговых ранах у пострадавших с комбинированной и сочетанной травмой в условиях развития синдрома взаимного отягощения.

Цель исследования: на основании цитологического исследования определить влияние культуры аллофибробластов на течение раневого процесса в ожоговых ранах.

Материалы и методы исследования

В лечении данных пострадавших использовалась культура фетальных аллофибробластов на коллагеновом носителе, приготовленная к моменту оперативного вмешательства в лаборатории клеточного и тканевого культивирования Института неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака. После подписания информированного согласия выполнено исследование мазков отпечатков из ожоговых ран 14 пострадавших в результате взрывов метано-угольной смеси, которые находились на лечении в Донецком ожоговом центре в период с 2009 по 2012 год. Общая площадь поражения у данных пострадавших составляла $59,29 \pm 5,26$ % п.т. поверхности тела, в том числе глубокого – $14,07 \pm 4,51$ % п.т. У всех пострадавших было термоингаляционное поражение, отравление угарным газом, присутствовала механическая травма в виде ушибленных и рубленых ран, гематом, диагностирована черепно-мозговая травма лёгкой и средней степени тяжести.

Для исследования выбраны два визуально одинаковых участка глубокого ожога, расположенных на контрлатеральных сегментах верхних конечностей. Глубина поражения на контрольном и исследуемом участке была одинакова, что было подтверждено с помощью лазерной доплеровской флоуметрии. Размер исследуемого и контрольного участка составлял 9 см^2 ($3 \times 3 \text{ см}$). Все

участки ран были расположены в средней трети плеча по передне-латеральной поверхности на контрлатеральных конечностях. Методом случайного выбора один участок обозначался как исследуемый, а другой как контрольный. На 7-е сутки после травмы выполнялась некрэктомия, в том числе в изучаемых зонах, при этом выполнялась трансплантация культуры фетальных аллофибробластов на исследуемый участок и на остальные послеоперационные раны, кроме контрольного участка.

Цитологическое исследование выполнялось по методике Покровской М.П. и Макарова М.С. (1942 г.). При оценке типа цитограммы пользовались классификацией Кузина М.И., Костюченка Б.Н. (1990 г.) [4]. Авторы выделяли некротический, дегенеративно-воспалительный, воспалительный, воспалительно-регенераторный (или регенераторно-воспалительный в зависимости от преобладания того или иного компонента) и регенераторный тип.

В процессе исследования изучались особенности раневого процесса в ожоговой ране на основании клеточного состава раневой поверхности, фиксировались сроки появления однотипных изменений в клеточном составе раны в исследуемом и контрольном участке для последующей статистической обработки и время выявления регенераторно-воспалительного типа мазка-отпечатка из контрольного и исследуемого участка. Данную цитологическую картину из ожоговой раны считали наиболее приемлемой для аутодермотрансплантации. Затем проводился расчёт групповых показателей суммарной статистики, определяли среднюю арифметическую величину и ошибку средней. Так как выборки были малыми – 14 пострадавших, для выявления различий между средними значениями использовали U-критерий Манна – Уитни для независимых переменных. Различия признавались значимыми при $p < 0,05$.

Клеточный состав раневой поверхности исследовался шесть раз в процессе лечения. Выполнение мазков отпечатков из раневой поверхности проводилось непосредственно после некрэктомии, затем на 5, 7, 9, 11 и 14-е сутки после некрэктомии во время выполнения перевязок и повторных трансплантаций культуры аллофибробластов на ожоговые раны (кроме контрольного участка).

Раневая поверхность на исследуемых участках после выполнения некрэктомии на 7-е сутки после травмы была закрыта культурой аллофибробластов на коллагеновом носителе (в виде

сетки). Важным условием данного исследования было создание на контрольном участке влажной среды, аналогичной исследуемому участку. Для этого использовали гидрофобное сетчатое покрытие. Далее на 5-е сутки после некрэктомии (12-е сутки после травмы) во время перевязки изучали мазки-отпечатки из исследуемых и контрольных участков ожоговых ран. После этого проводилась повторно трансплантация культуры аллофибробластов на исследуемую рану, а для лечения контрольного участка использовали водорастворимые мази согласно стадии раневого процесса и гидрофобное сетчатое покрытие. В последующем на все раны по мере готовности выполнялась свободная аутодермопластика расщеплённым перфорированным трансплантатом.

Результаты исследования

В мазках-отпечатках, полученных из ожоговых ран сразу после выполнения некрэктомии, нейтрофильные лейкоциты покрывали все поля зрения, находясь рядом с различным числом макрофагов и гистиоцитов. Общий фон препаратов был представлен бесструктурным детритом или фибрином. Также в мазках-отпечатках присутствовала бактериальная флора ожоговой раны. Цитологических различий между контрольным и исследуемым участком обнаружено не было ни в одном случае на данном этапе исследования.

При повторном исследовании на 5-е сутки после некрэктомии и ведения раны под культурой аллофибробластов на исследуемом участке ожоговой раны получена картина, значительно отличающаяся от контрольного участка. На исследуемых участках у большинства пострадавших шахтёров обнаружены изменения, характерные для нормального течения воспалительного процесса, наблюдающегося при ограниченных дермальных ожогах, которые характеризовались последовательной сменой фаз воспалительного процесса. По данным цитограммы, в ране присутствовали хорошо сохранённые нейтрофилы, которые покрывали всё поле зрения и формировали основную массу клеточных элементов. В некоторых мазках-отпечатках из исследуемой зоны нейтрофилы расположены группами среди нитей фибрина. В цитоплазме некоторых сегментоядерных нейтрофилов содержатся бактерии. Кроме того, в общей картине присутствуют и тканевые макрофаги, которые находятся на разной степени фагоцитарной активности. В мазках-отпечатках из контрольных участков (рис. 1) были обнаружены признаки хро-

низации раневого процесса. В поле зрения было видно много мелких участков клеточного распада с оксифильными остатками и нитями фибрина. Нейтрофилы, которые найдены в препарате, имели признаки дистрофических изменений, что свидетельствует о замедлении очищения раны, более медленном репаративном процессе.

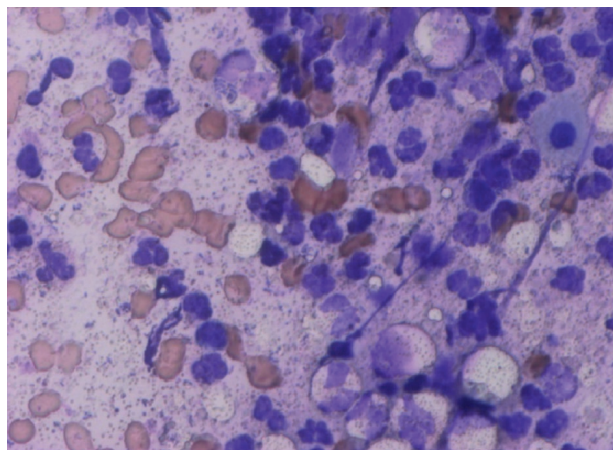


Рис. 1. Микрофотография мазка-отпечатка контрольного участка (5-е сутки после некрэктомии). Признаки хронизации раневого процесса. Дегенеративно-воспалительный тип мазка-отпечатка. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 100.

Часть нейтрофилов и макрофагов имели практически лизированные клетки, кроме того, в микроскопической картине присутствовали гигантские клетки хронического воспаления. Отмечен дегенеративно-воспалительный тип мазков отпечатков.

В то же время в некоторых полях зрения при просмотре мазков-отпечатков из исследуемых участков были обнаружены молодые клетки соединительной ткани, а именно фибробласты и фиброциты, что свидетельствует о переходе к воспалительно-регенераторному типу цитограммы, что изображено на рисунке 2. Фибробласты присутствовали в отпечатках в виде единичных экземпляров или небольших групп, имели небольшие овальные ядра, чаще всего удлинённую в две стороны форму, голубую или базофильную цитоплазму. Они находились среди других элементов воспаления – макрофагов, плазматических клеток, нейтрофилов. В случае преобладания фибробластов в клеточном составе раны определяли как регенераторно-воспалительный тип мазков отпечатков.

При обработке данных цитологического исследования, полученных из исследуемого и контрольного участка у 14 обожжённых пострадавших, получены следующие результаты: на 7-е сутки после некрэктомии у 9 обожжённых определён регенераторно-воспалительный тип мазка-отпечатка из ис-

следуемого участка. На контрольном участке ожоговая рана у этих же 9 пострадавших на 7-е сутки была представлена гнойным отделяемым и фибрином, что соответствует воспалительному типу мазков-отпечатков. На 14-е сутки различия были менее чёткими, так как на контрольном участке отмечался регенераторно-воспалительный и регенераторный тип мазка-отпечатка.

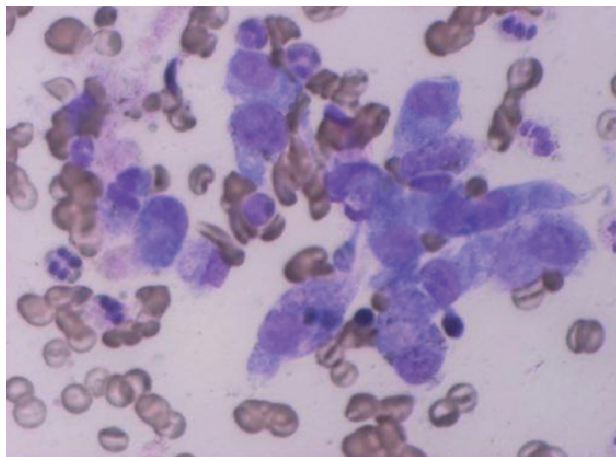


Рис. 2. Микрофотография мазка-отпечатка исследуемого участка на 5-е сутки после применения культуры аллофибробластов. Нормальное течение раневого процесса. Воспалительно-регенераторный тип мазка-отпечатка. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 100.

У 2 обожжённых на 7-е и 9-е сутки отмечалась одинаковая смешанная картина – воспалительно-регенераторный тип мазка-отпечатка: единичные фибробласты и присутствие элементов гнойного воспаления в исследуемом и контрольном участках. На 11-е и 14-е сутки на исследуемом и на контрольном участке зафиксирован регенераторно-воспалительный тип мазка-отпечатка.

У 1 обожжённого на 5-е и 7-е сутки после некрэктомии, по данным цитологического исследования, на исследуемом и контрольном участке картина была одинаковой – гнойное воспаление (воспалительный тип мазка-отпечатка), на 14-е сутки различий также не было, отмечен регенераторно-воспалительный тип мазка-отпечатка. Ещё у 2 пострадавших отмечен воспалительно-регенераторный тип мазка-отпечатка на 7-е и 9-е сутки после некрэктомии как на контрольном, так и на исследуемом участке. Однако при последующем исследовании на 14-е сутки после некрэктомии у этих обожжённых на контрольном участке сохранялся воспалительно-регенераторный тип мазка-отпечатка, в то время как в исследуемом отмечен регенераторный тип.

Макроскопически на исследуемых участках у большинства пострадавших к 7-м суткам в ожо-

говых ранах была сформирована полноценная грануляционная ткань, пригодная к аутодермотрансплантации. Оптимальным для выполнения аутодермотрансплантации был регенераторный и регенераторно-воспалительный тип мазка-отпечатка. Появление регенераторно-воспалительного типа мазка-отпечатка на исследуемом участке под воздействием клеточной культуры происходило в среднем на $7,14 \pm 0,61$ сутки после некрэктомии и на $11,79 \pm 0,62$ сутки после некрэктомии на контрольном участке. Различия между цифровыми значениями достоверны, $p=0,001$.

Обсуждение

В работах авторов описано, что трансплантированные аллогенные фибробласты оказывают позитивное влияние на цитологическую картину ожоговой раны, что выражается в смене воспалительного типа цитограммы на воспалительно-регенераторный [5]. В данной статье рассматривались возможности воздействия на раневую процесс в ожоговых ранах клеточной культуры аллогенных фибробластов в условиях тяжёлой сочетанной и комбинированной термической травмы. В работах военных медиков детально описаны механизмы, приводящие к замедлению репаративных процессов в ожоговой ране в условиях развития синдрома взаимного отягощения [3]. Оценивая полученные данные цитологического исследования, следует считать, что культура аллофибробластов при трансплантации на ожоговую рану после выполнения некрэктомии позволяет закрыть рану временным биологическим покрытием и одновременно подготовить раневую поверхность к выполнению аутодермотрансплантации с высоким коэффициентом приживления. В работах российских комбустиологов отражён накопленный за два десятилетия опыт лечения тяжелообожжённых с помощью клеточных технологий, что подтвердило правильность выбранной нами тактики [2, 6, 7]. Именно при обширных глубоких термических поражениях кожи, сопровождающихся дефицитом донорских ресурсов, использование культуры аллофибробластов для временного закрытия ожоговой раны следует считать методом выбора, так как выполняются две задачи – рана находится под временным биологическим покрытием после некрэктомии и одновременно происходит стимуляция репаративных процессов, что даёт возможность эффективно выполнять оперативное лечение на большей площади.

Таким образом, благодаря использованию культуры аллофибробластов после выполнения

некрэктомии при обширном глубоком дермальном ожоге, подготовка раны к аутодермотрансплантации происходит в 1,65 раза быстрее, в сравнении со стандартными способами послеоперационного ведения ожоговой раны. Данное положение подтверждается более быстрой сменой типа цитогаммы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев А.А., Салахитдинов К.З., Гаврилюк Б.К., Тюриков Ю.И. Комплексное лечение глубоких ожогов на основе применения хирургической некрэктомии и современных биотехнологических методов // *Анналы хирургии*. – 2012. – № 2. – С. 41–45.
2. Алексеев А.А., Кашин Ю.Д., Яшин А.Ю., Рахаев А.М. Тактика лечения тяжелообожжённых на основе применения культивированных аллофибробластов // *Новые методы лечения ожогов с использованием культивированных клеток кожи: Материалы науч. конф.* – Саратов, 1998 – С. 9–12.
3. Иванцов В.А., Шанин Ю.И., Сидельников В.О. [и др.]. Комбинированные ожоговые поражения. – СПб.: Сотис, 2004. – 142 с.
4. Кузин М.И., Костюченко Б.Н. Раны и раневая инфекция. 2-е изд. – М.: Медицина, 1990. – 592 с.
5. Расулов М.Ф., Василенко В.Т., Зайденов В.А. Клеточная трансплантация подавляет воспалительную реакцию и стиму-

лирует репаративные процессы в ожоговой ране // *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. – 2006. – № 142, Т.1. – С. 112–115.

6. Саркисов Д.С., Глуценко Е.В., Гуруков Ш.Р. Аллотрансплантация культивированных фибробластов на незаживающие раны после аутодермопластики // *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. – 1991. – № 5. – С. 542–544.

7. Туманов В.П. Морфологический анализ клеточного состава ожоговой раны при трансплантации культивированных аллофибробластов // *Новые методы лечения ожогов с использованием культивированных клеток кожи: Материалы науч. конф.* – Саратов, 1998. – С. 40.

8. Böttcher-Haberzeth S., Biedermann T., Reichmann E. Tissue engineering of skin // *Burns*. – 2010. – Vol. 36, № 4. – P. 450–460.

9. Matouskova E., Broz L., Pokorna E. Prevention of burn wound conversion by allogeneic keratinocytes cultured on acellular xenodermis // *Cell and Tissue Banking*. – 2002. – V. 3, № 1. – P. 29–35.

10. Nedelec B., De Oliveira A., Saint-Cyr M., Garrel D. Differential effect of burn injury on fibroblasts from wounds and normal skin // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2007. – Vol. 119, № 7. – P. 2101–2109.

11. Paeura M., Kaartinen I., Suomela S. Improved skin wound epithelialization by topical delivery of soluble factors from fibroblast aggregates // *Burns* – 2012. – V. 38, № 4. – P. 541–550.

12. Wong T., McGrath J.A., Navsaria H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration // *Br. J. Dermatol.* – 2007. – Vol. 156. – P. 1149–1155.

Поступила 13.08.2016

**В.А. ТАРАКАНОВ¹, Е.Г. КОЛЕСНИКОВ¹, О.А. ТЕРЕЩЕНКО², А.Е. СТРЮКОВСКИЙ¹,
И.С. ЛЕВЧЕНКО², Н.В. ПЕЛИПЕНКО², А.В. ШАТОВ², Р.В. МОРОЗОВА²**

СВЕЧЕНИЕ БИОПТАТОВ УЧАСТКОВ ТОНКОЙ КИШКИ НОВОРОЖДЁННОГО В ВЫСОКОЧАСТОТНОМ ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ПОЛЕ

¹*Кафедра хирургических болезней детского возраста ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,*

Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4. Тел. 8 (928) 423-55-23. E-mail: hirurgia@inbox.ru

²*ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» Министерства здравоохранения Краснодарского края,
Россия, 350007, г. Краснодар, площадь Победы, 1*

С целью определения объёма резекции участка тонкой кишки ребёнка с некротическим энтероколитом были изучены параметры свечения в высокочастотном поле биоптатов участка здоровой ткани, участка с паранекрозом и с некробиозом тонкой кишки. Во всех биоптатах получено краевое свечение (эффект Кирлиан). В участках паранекроза и некробиоза имело место внутреннее свечение ткани. На более поздней стадии некроза внутреннее свечение отсутствовало. Яркость свечения, диапазон длины волн на начальных стадиях некроза превышал таковые параметры при паранекрозе. Это является дифференциальными признаками в оценке состояния участков тонкой кишки.

Ключевые слова: некротический энтероколит, новорождённые, свечение участков кишечника в высокочастотном электрическом поле.

**V.A. TARAKANOV¹, E.G. KOLESNIKOV¹, O.A. TERESHCHENKO², A.E. STRYUKOVSKY¹,
I.S. LEVCHENKO², N.V. PELIPENKO², A.V. SHATOV², R.V. MOROZOVA²**

IMMER LAND INTESTINAL BIOPSY SPECIMENS OF NEWBORNS IN HIGH-FREQUENCY ELECTRIC
FIELD SHOW ORIGINAL