

Влияние экстракта кожи новорожденных поросят на заживление ожоговых ран

Н.Ю. ШКОДОВСКАЯ, С.Е. ГАЛЬЧЕНКО, А.В. МАМОНТОВА, Б.П. САНДОМИРСКИЙ
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Newborn Piglet's Skin Extract on Burn Wound Healing

N.YU. SHKODOVSKAYA, S.E. GALCHENKO, A.V. MAMONTOVA, B.P. SANDOMIRSKY
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy
of Sciences of the Ukraine, Kharkov

На крысах проведено сравнительное изучение влияния экстракта кожи новорожденных поросят (ЭКНП) и экстракта плаценты (ЭПл) на заживление ожоговых ран. Показано, что введение подкожно в область раны ЭКНП уменьшает клеточную инфильтрацию раны, ускоряет образование грануляционной ткани, что приводит к быстрейшему заживлению ожоговых ран по сравнению с контролем (без введения ЭКНП) и с введением подкожно ЭПл. Изучение особенностей процесса заживления ран при использовании ЭКНП и ЭПл выявило более высокий темп регенерации под воздействием ЭКНП.

Ключевые слова: ожоговая рана, экстракт кожи новорожденных поросят, заживление.

На щурах проведено порівняльне вивчення впливу ЕШНП і ЕПл на загоєння опікових ран. Показано, що введення підшкірно в область рани ЕШНП зменшує клітинну інфільтрацію рани, прискорює утворення грануляційної тканини, що приводить до швидкого загоєння опікових ран в порівнянні з контролем (без введення ЕШНП) і з введенням підшкірно ЕПл. Вивчення особливостей процесу загоєння ран при використанні ЕКНП і ЕПл виявило вищий темп регенерації під впливом ЕШНП.

Ключові слова: опікова рана, екстракт шкіри новонароджених поросят, загоєння.

A comparative study of the effect of newborn piglet's skin extract (NPSE) and placenta extract (PE) on the burn healing has been carried-out in rats. A subcutaneous NPSE injection into the wound area was shown to reduce the wound cell infiltration, to accelerate the granular tissue formation, resulting in quicker wound healing in comparison with the control (without NPSE) and with subcutaneous PE introduction. Studying the peculiarities of wound healing process with applying NPSE and PE revealed a higher rate in regeneration under NPSE effect.

Key-words: burn wound, newborn piglet's skin extract, healing.

Проблема лечения ран, в том числе и термических, была и остается одной из актуальных проблем современной медицины [1, 3]. Наряду с традиционными методами лечения ожоговых ран были предложены методы клеточной терапии, направленные на стимуляцию репаративных процессов: трансплантация ауто- и аллогенных кератиноцитов, аллогенных фибробластов [2, 4] и т. д. Одним из направлений клеточной терапии может быть использование экстрактов нормальной кожи, содержащих пептиды, обладающие регуляторным влиянием как на эпителиальную, так и на соединительную ткань [6, 7].

Цель работы – изучение эффективности применения ЭКНП при термических ожогах кожи.

Материалы и методы

Термический ожог кожи моделировали на 30 белых крысах линии Вистар массой 100-120 г. Под поверхностным эфирным наркозом эпилировалась шерсть в области спины. Ожог вызывали прикладыванием медного аппликатора диаметром 10 мм при температуре 100°C в течение 40 с.

Адрес для корреспонденции: Шкодовская Н.Ю., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 770-29-35, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

The problem of healing the wounds, including the thermal ones, has remained an actual one in modern medicine [1, 3]. Along with traditional methods for burn wound healing there were proposed the methods of cell therapy, targeted to stimulate the reparative processes: transplantation of auto- and allogenic keratinocytes, allogenic fibroblasts [2, 4] etc. The usage of normal skin extracts, containing peptides with a regulatory effect on both epithelial and connective tissues, can be one of the directions in cell therapy [6, 7].

The aim of the work was to study the efficiency of NPSE application for thermal skin burns.

Materials and methods

Thermal burn of skin was modelled in 30 white Wistar rats of 100-120 g weight. The hair in back area was epilated under a slight ether narcosis. The burn was caused by laying over a 10 mm diameter copper applicator under 100°C with 40 sec exposure.

The animals were decapitated under narcosis. Skin was dissected in 5-10 mg fragments and was thrice washed-out in 10-fold volume of physiological solution. PEO-1500 under 10% concentration was used as a

Address for correspondence: Shkodovskaya N.Yu., Institute for Problems of Cryobiology&Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 770 2935, fax: +380 57 772 0084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

Животных декапитировали под наркозом. Кожу иссекали на фрагменты массой 5-10 мг и три раза отмывали в 10-кратном объеме физиологического раствора. В качестве криопротектора использовали ПЭО-1500 в 10%-й концентрации. Все манипуляции проводили при 4°C. Фрагменты кожи замораживали со скоростью 1°C/мин. Деконсервированный материал отогревали на водяной бане при 40°C. Криопротектор отмывали в 10-кратном объеме физиологического раствора. Экстракт получали, инкубируя фрагменты кожи в физиологическом растворе (рН 7,4) в соотношении 1:10 при температуре 20-23°C, затем центрифугировали в течение 15 мин при 1500 об/мин. Надосадок процеживали через бумажный фильтр; для удаления белка экстракт кипятили на водяной бане 15 мин и снова фильтровали [6].

Животные были разделены на три равноценных группы: 1-я – контрольная; 2-я – животные с термическим ожогом и введением ЭПл; 3-я – животные с ожоговой раной и введением ЭКНП.

Экстракт плаценты аптечный (Р 12/9901311) и ЭКНП вводили от периферии к центру подкожно по 0,5 мл один раз в сутки на протяжении всего эксперимента. Контроль эффективности препаратов осуществляли визуальным, планиметрическим и гистологическим методами [3, 5]. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином, исследовали на микроскопе "Jenaval". Увеличение 10×10.

При статистической обработке результатов использовали t-критерий достоверности Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В результате динамического визуального контроля состояния ожоговой раны было установлено, что на 1-е сутки с момента травмы отмечаются резкая гиперемия и отек кожи по периферии к центру.

После введения ЭПл (2-я группа, 3-и сутки) на поверхности раны появлялись сосудистые звездочки розоватой окраски, одновременно возникали островки тонкой пленки, в результате чего снижалась плазморрея. В этот же срок при введении ЭКНП (3-я группа) поверхность раны была розовой из-за выраженного развития сосудистой сети, ожоговая поверхность раны покрывалась более выраженной пленкой, исчезала плазморрея.

На 7-е сутки (рис. 1, а) в 1-й группе ожоговая рана представляла собой бледную, изрытую, некротизированную ткань, покрытую фибрином, имела место плазморрея по всей ожоговой поверхности. У животных 2-й группы (рис. 1, б) грануляционная ткань приподнималась (в некоторых местах) до уровня эпидермиса краев раны. У жи-

cryoprotectant. All manipulations were performed at 4°C. Skin fragments were frozen with 1°C/min rate. The frozen-thawed material was thawed on water bath at 40°C. The cryoprotectant was washed out in 10-fold volume of physiological solution. The extract was obtained when incubating the skin fragments in physiological solution (pH 7.4) in 1:10 ratio at 20-23°C, then it was centrifuged within 15 min under 1500 rpm. A supernatant was passed through a paper filter; the extract was boiled on water bath during 15 min for protein removal and refiltered [6].

The animals were divided in three equal groups: 1st one was the control; 2nd one comprised the animals with thermal burn and PE introduction; 3rd one consisted of those with a burn wound and NPSE introduction.

Placenta pharmaceutical extract (P 12/9901311) and NPSE were subcutaneously introduced from the periphery towards the center by 0.5 ml once a day within the whole experiment. The control for preparation efficiency was performed using a visual, planimetric and histological methods [3, 5]. Histological preparations were stained with hematoxylin and eosin and studied with "Jenaval" microscope with 10×10 magnification.

The Student t-test was used for statistical processing of results.

Results and discussion

As a result of the dynamic visual control for the burn wound state there were established that to the 1st day since the trauma moment a sharp hyperemia and skin oedema at the periphery to the center were noted.

After PE introduction (the 2nd group, the 3rd day) the pinky vascular spiders appeared on a wound surface, simultaneously with thin coat islets, resulting in a plasmorrhea decrease. At the same term when introducing NPSE (3rd group) the wound surface was pink because of a manifested development of vascular net, a burn wound surface was covered with a more marked coat, plasmorrhea disappeared.

To the 7th day (Fig.1, a) in the 1st group a burn wound represented a pale, pitted, necrotised fibrin-covered tissue with plasmorrhea all over the burn surface. In the 2nd group animals (Fig. 1, b) a granulated tissue was slightly raised (in some sites) up to the epidermis level of wound edges. In the 3rd group animals (Fig. 1, c) the wound gained a uniform pink staining, the granulations expanded all over the wound square up to the level of epidermis and a burn surface considerably decreased.

To the 14th day (Fig. 2) the differences in wound healing between the 1st, 2nd and 3rd groups of animals became more distinct. Thus, in the 2nd group of animals (Fig. 2, b) the square of burn surface reduced due to an edge epithelisation in comparison with the wounds

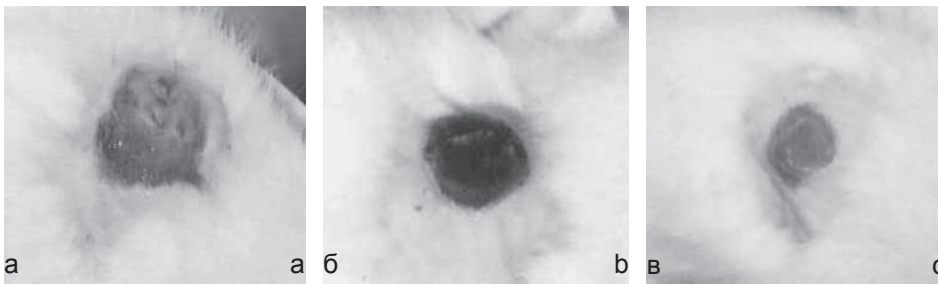


Рис. 1. Ожоговая рана на 7-е сутки после нанесения травмы: а – без лечения; б – введение ЭПл; в – введение ЭКНП.

Fig. 1. Burn wound to the 7th day after causing the trauma: а – without treatment; б – PE introduction; в – NPSE introduction.

вотных 3-й группы (рис. 1, в) рана приобретала равномерно розовую окраску, грануляции разрастались на всей площади раны до уровня эпидермиса, а ожоговая поверхность значительно сокращалась в размерах.

На 14-е сутки (рис. 2) различия в заживлении ран между 1-, 2- и 3-й группами животных становились еще более отчетливыми. Так, во 2-й группе животных (рис. 2, б) площадь ожоговой поверхности сокращалась из-за краевой эпителизации по сравнению с ранами у животных 1-й группы (рис. 2, а). В 3-й группе (рис. 2, в) гранулирующая поверхность была более гладкой, площадь ожоговой поверхности значительно меньше, чем в остальных группах животных. В то же время в 1-й группе животных ожоговая поверхность местами оставалась бледной с редкими грануляциями, на ней появлялись сосудистые звездочки, имелись островки фибринозного налета, продолжалась умеренная плазморрея по всей ожоговой поверхности, местами сохранялся трудно отделяемый струп. В целом у животных 1-й группы уменьшались размеры раны, но края раны оставались подрывными.

Доказательством более высокого темпа заживления ожоговой поверхности при введении экстрактов могут служить результаты динамической планиметрии ран в трех группах наблюдений.

Из рис. 3 видно, что темп спонтанного заживления ожоговых ран без использования ЭПл и ЭКНП довольно низкий. После введения ЭПл и ЭКНП темп заживления ран увеличивается на 7-е сутки по сравнению с контролем ($p < 0,05$), однако на 14-е сутки при введении ЭПл отстает от темпа заживления ран при введении ЭКНП ($p < 0,05$).

in the 1st group animals (Fig. 2, а). In the 3rd group (Fig. 2, в) a granulating surface was smoother, the square of a burn surface was considerably smaller than in other animals. At the same time in the 1st group of animals a burn surface remained pale here and there with a rare granulations, with vascular spiders on it, there were the islets of fibrinous deposit, a moderate plasmorrhea all over a burn surface was in a progress, a hardly removable eschar was kept here and there. Generally in the 1st group animals there was the reduction in wound size, but the edges remained pitted-up.

The results of dynamic wound planimetry in three observation groups can be the proof for a higher rate in burn surface healing during the extract introduction.

The Fig. 3 shows that the rate of a spontaneous healing in burn wounds without PE and NPSE usage is quite low. After PE and NPSE introduction the wound healing rate increases to the 7th day in comparison with the control ($p < 0.05$), however to the 14th day during PE introduction it decelerates that under NPSE introduction ($p < 0.05$).

Thus, at a comparative study of wound healing rates under therapy absence and when introducing PE and NPSE we have noted a higher rate in a burn wound healing during the NPSE introduction, that was manifested in the acceleration of the regenerative process phase turn: there was the reduction in terms for cell infiltration period and the acceleration of granulation formation rate. A regenerative process in burn wounds without PE and NPSE introduction occurred as well, but its rate was sharply slowed down.

When investigating histological preparations to the 14th day in the 1st group of animals there were noted the infiltration of lympho-leukocyte cells and a slightly manifested vascular net (Fig. 4, а).



Рис. 2. Ожоговая рана на 14-е сутки после нанесения травмы: а – без лечения; б – введение ЭПл; в – введение ЭКНП.

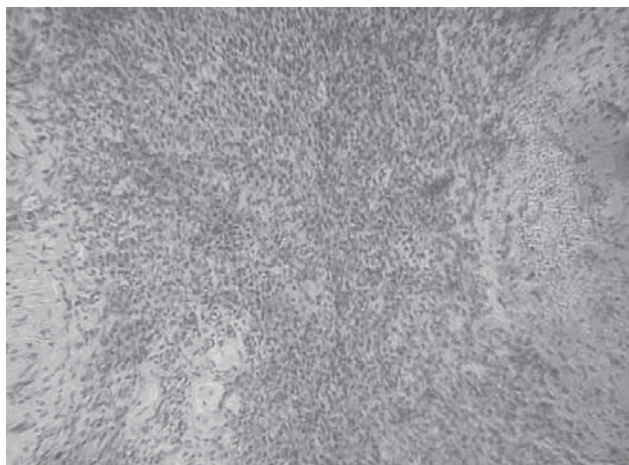
Fig. 2. Burn wound to the 14th day after causing the trauma: а – without treatment; б – PE introduction; в – NPSE introduction.

Таким образом, при сравнительном исследовании темпов заживления ран при отсутствии терапии и при введении ЭПл и ЭКНП нами отмечен более высокий темп заживления ожоговой раны при введении ЭКНП, что выразилось в ускорении смены фаз регенераторного процесса: сокращались сроки периода клеточной инфильтрации и ускорялся темп образования грануляций. Регенераторный процесс в ожоговых ранах без введения ЭПл и ЭКНП также имеет место, но темп его был резко замедлен.

В исследовании гистологических препаратов на 14-е сутки в 1-й группе животных отмечались инфильтрация лимфо-лейкоцитарными клетками и слабо выраженная сосудистая сеть (рис. 4, а).

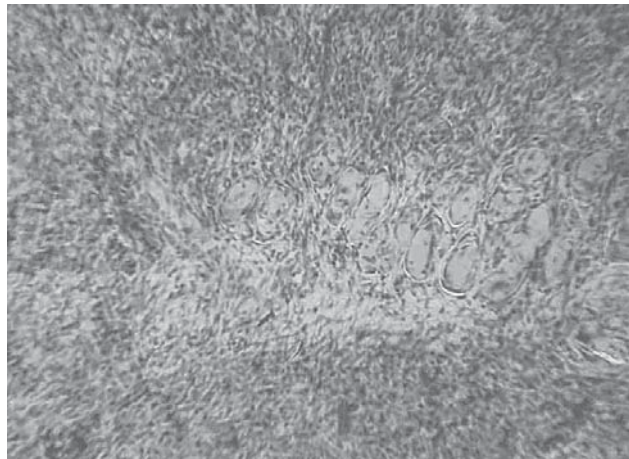
Во 2-й группе (введение ЭПл) отмечалось снижение клеточной инфильтрации, центральная часть раны занята образованием грануляционной ткани. В глубоких слоях имеется рубцовая ткань, по периферии идет подрастание эпидермального пласта. В собственной мышце кожи контуры пучков сохранены (рис. 4, б).

В 3-й группе наблюдалось снижение клеточной инфильтрации, признаки регенераторного процесса были более выражены, чем у животных 1- и 2-й



а

а



б

б

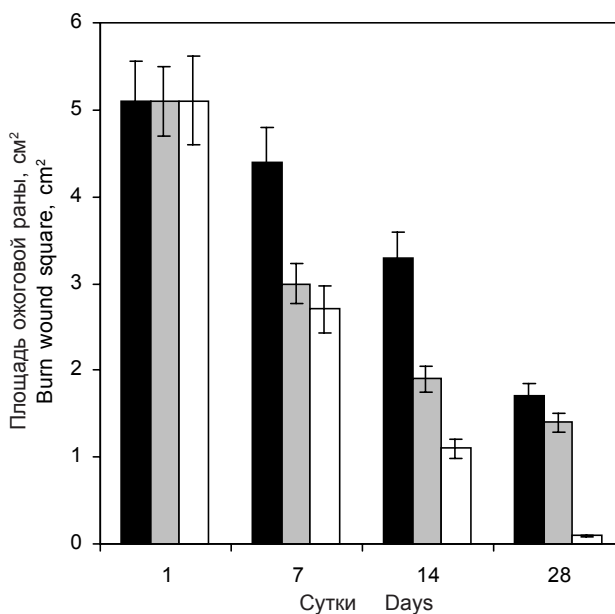


Рис. 3. Площадь ожоговой раны в зависимости от способа лечения: ■ – контроль; □ – ЭПл; □ – ЭКНП.

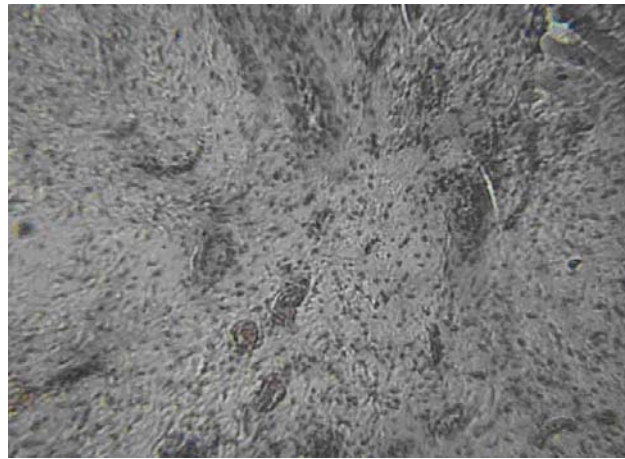
Fig. 3. Burn wound square depending on the treatment method: ■ – control; □ – PE; □ – NPSE.

In the 2nd group (PE introduction) a decrease in cell infiltration was noted and a central wound part was filled with a granular tissue formation. A scar tissue was in deep layers, there was a growing up of epidermal layer over the periphery. The contours of fascicles were kept in the own skin muscle (Fig. 4, b).

In the 3rd group there was observed a decrease in cell infiltration, the signs of a regenerative process were

Рис. 4. Ожоговые раны на 14-е сутки после нанесения травмы. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 10x10: а – без лечения; б – введение ЭПл; в – введение ЭКНП.

Fig. 4. Burn wounds to the 14th day after causing the trauma, stained with hematoxylin and eosin, 10x10 magnification: а – without treatment; б – PE introduction; в – NPSE introduction.



в

в

групп (рис. 4,в). Следует отметить, что центральная часть раны занята грануляционной тканью. В глубоких слоях уже имеется организация соединительно-тканых структур. По периферии идет подрастание эпидермального пласта под некротические участки.

Выводы

Ускорение процесса заживления ран под влиянием введения ЭПл и ЭКНП происходит за счет уменьшения выраженности воспалительной инфильтрации, а также существенного увеличения темпов формирования грануляционной ткани. При использовании ЭКНП наблюдается более высокий темп регенерации ожоговых ран.

Литература

1. Жилина Н.М., Иванов В.Б., Корень Н.Н. и др. Сравнительный анализ кожной аутопластики традиционными методами и с использованием клеточной культуры фибробластов // Вестник новых мед. технологий.– 1997.– Т. 4.– №1.– С. 88
2. Малахов С.Ф., Парамонов Б.А., Емельянов А.В. и др. Новые подходы к лечению тяжелых ожогов: трансплантация выращенных в культуре кератиноцитов // Военно-мед. журнал.– 1997.–Т. 318, №9.– С. 16-19.
3. Путилин А.А., Самсонов А.В., Денисов И.А. Сравнительная оценка эффективности применения биологически активных покрытий, созданных на основе ксено- и аллотканей в местном лечении глубоких ожогов // Комбустиология на рубеже веков: Материалы Конгресса.– М., 2000.– С.128.
4. Сологуб В.К., Донецкий Д.А., Борисов В.Я. и др. Клиническое применение консервированных биопокровов для ран и ожогов. – М., 1990.– С.8.
5. Чадаев А.П., Климиашвили А.Д. Современные методики местного медикаментозного лечения инфицированных ран // Хирургия.– 2003.– N1.– С.20.
6. Пат. 64381 А Україна, МПК⁷ А61К35/12. Спосіб отримання екстрактів ксеногенних органів/ С.Є. Гальченко, Н.Ю. Шкодовська, Б.П. Сандомирський, В.І. Грищенко. Заявлено 22.05.2003; Опубл. 16.02.2004; Бюл. Промисл. власність, 2004.– №2.– С. 4.41.
7. Flint I. What new in trauma and burns // J. Am. Cool. Surg.– 1996.– Vol. 182, N2.– P. 177-184.
8. Clarke D. Late management of burns // Surgery.– 1997.– Vol.38.– P. 137.

Поступила 20.04.2004

more manifested than in animals of the 1st and 2nd groups (Fig. 4, c). It should be noted that a central part of the wound is filled with a granulation tissue. In deep layers there is even the organisation of connective-tissue structures. There is a growing up of epidermal layer under necrotic sites over the periphery.

Conclusions

The acceleration of the wound healing process under the effect of PE and NPSE introduction occurs due to a decrease in the manifestation of inflammatory infiltration, as well as a considerable increase in rates of granulation tissue formation. A higher regeneration rate in burn wounds was observed when using NPSE.

References

1. Zhilina N.M., Ivanov V.B., Koren N.N. et al. Comparative analysis of skin autoplasty by traditional methods and with using fibroblast cell culture // Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologij.– 1997.– Vol. 4.– N1.– P. 88.
2. Malakhov S.F., Paramonov B.A., Emel'yanov A.V. etc. New approaches to severe burn treatment: transplantation of cultured keratinocytes // Voenno-meditsinskij zhurnal.– 1997.– Vol. 318, N9.– P. 16-19.
3. Putilin A.A., Samsonov A.V., Denisov I.A. Comparative estimation of application efficiency of biologically active covers, created on the base of xeno- and allotissues during a local treatment of deep burns // Combustiology at the turn of the century: Congress Materials.– Moscow, 2000.– P. 128.
4. Sologub V.K., Donetskij D.A., Borisov V.Ya. et al. Clinical application of preserved biocovers for wounds and burns.– Moscow, 1990.– P. 8.
5. Chadayev A.P., Klimiashvili A.D. Current methods for local medicament treatment of infected wounds // Khirurgiya.– 2003.– N1.– P.20.
6. Patent 64381 A Ukraine, IPC⁷ A61K35/12. Way for procuring the extracts of xenogenous organs / Galchenko S.E., Shkodovskaya N.Yu., Sandomirsky B.P., Grischenko V.I. Applied 22.05.2003; Published 16.02.2004. Bull. Industrial property, 2004.– N2.– P.4.41.
7. Flint I. What new in trauma and burns // J. Am. Cool. Surg.– 1996.– Vol. 182, N2.– P. 177-184.
8. Clarke D. Late management of burns // Surgery.– 1997.– Vol.38.– P. 137.

Accepted in 20.04.2004