

doi : 10.52485/19986173_2022_3_70

УДК 616-001.33-547.99

Шперлинг И.А., Шулепов А.В., Шперлинг Н.В., Ростовцев С.О.

ВЛИЯНИЕ ПЕРИФОКАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ГЕЛЯ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ДИНАМИКУ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ У КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЗРЫВНОЙ РАНЕ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, ул. Лесопарковая 4, 195043, Санкт-Петербург, Россия

Цель исследования. Оценка динамики содержания про- и противовоспалительных цитокинов в плазме крови экспериментальных животных с взрывной раной бедра после раннего локального введения гиалуроновой кислоты (ГК).

Материалы и методы. Исследование проведено на 106 крысах-самцах линии Вистар, разделенных по 32 животных в группы: основную, сравнения, контрольную. Под наркозом наносили взрывную рану бедра. Через 3 ч после повреждения всем крысам проводили первичную хирургическую обработку раны, стандартное лечение, локально вводили гиалуроновую кислоту (основная группа), 0,9% раствор натрия хлорида (группа сравнения), без локального лечения (контрольная). Оценивали динамику проявлений и сроки заживления раны, концентрацию миоглобина и калия в плазме крови, а также воспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, TNF- α и IL-10) на 3, 7, 14 и 28 сут после повреждения. Интактную группу составляли животные без повреждений ($n=10$). Полученные данные обработаны с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel 2013 в среде программы Statistica 10.0.

Результаты. Перифокальное введение ГК через 3 ч после взрывного повреждения в период первых 3-7 сут способствовало уменьшению концентрации миоглобина на 22,1-23,8% ($p<0,05$) и калия на 26,8% ($p<0,05$) в плазме крови, снижению уровня провоспалительных цитокинов: IL-1 β на 25,9 % ($p<0,05$), IL-6 – на 22,5 % ($p<0,05$), TNF- α – на 29,1 % ($p<0,05$) в сравнении с группой сравнения. В период 14-28 сут уровень провоспалительных цитокинов снижался, достигая значений интактных животных. Уровень IL-10 умеренно повышался (в 2,1-3,1 раза, $p<0,05$) в сравнении с интактными животными, преимущественно в период 14-28 сут после повреждения. Полное закрытие раневого дефекта после локального применения ГК наступало на 4-5 сут раньше, чем у животных из группы сравнения.

Заключение. Перифокальное введение ГК через 3 часа после взрывного повреждения мягких тканей бедра уменьшает выраженность посттравматического рабдомиолиза, снижает индуцированный травмой уровень циркулирующих провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α , IL-6) в фазу воспаления, повышает концентрацию противовоспалительных цитокинов (IL-10) в фазу регенерации и образования грануляционной ткани, сокращает сроки заживления на 19% ($p<0,05$).

Ключевые слова. Взрывная рана, гиалуроновая кислота, мягкие ткани, рабдомиолиз, системный воспалительный ответ, цитокины.

Shperling I.A., Shulepov A.V., Shperling N.V., Rostovtsev S.O.

THE EFFECT OF PERIFOCAL INTRODUCTION OF HYALURONIC ACID GEL ON THE DYNAMICS OF INFLAMMATORY CYTOKINES IN THE PLASMA OF BLOOD IN RATS IN AN EXPERIMENTAL EXPLOSIVE WOUND

State Scientific Research Test Institute of the military medicine of the Russian Federation defense Ministry, 4 Lesoparkovaya Str., 195043, Saint-Petersburg, Russian Federation

The aim of the research. Evaluation of the dynamics of the content of pro- and anti-inflammatory cytokines in the blood plasma of experimental animals with an explosive wound of thigh after early local injection of hyaluronic acid (HA).

Materials and methods. The study was carried out on 106 male Wistar rats, divided into 32 animals into groups: main, comparison, control. Under anesthesia, an explosive wound was inflicted on the thigh. 3 hours after the injury, all rats underwent primary surgical treatment of the wound, standard treatment, local injection of hyaluronic acid (main group), 0.9% sodium chloride solution (comparison group), without local treatment (control). The dynamics of manifestations and the timing of wound healing, the concentration of

myoglobin and potassium in blood plasma, as well as inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-10) were assessed on days 3, 7, 14, and 28 after injury. The intact group consisted of animals without injuries (n=10). The obtained data were processed using the Microsoft Excel 2013 application package in the Statistica 10.0 software environment.

Results. Perifocal administration of HA 3 hours after the explosive wound during the first 3-7 days contributed to a decrease in the concentration of myoglobin by 22.1-23.8% ($p<0.05$) and potassium by 26.8% ($p<0.05$) in blood plasma, a decrease in the level of pro-inflammatory cytokines: IL-1 β by 25.9% ($p<0.05$), IL-6 - by 22.5% ($p<0.05$), TNF- α - by 29.1 % ($p<0.05$) in comparison with the comparison group. In the period of 14-28 days, the level of pro-inflammatory cytokines decreased, reaching the values of intact animals. The level of IL-10 moderately increased (by 2.1-3.1 times, $p<0.05$) in comparison with intact animals, mainly in the period 14-28 days after injury. Complete closure of the wound defect after local application of HA occurred 4-5 days earlier than in animals from the comparison group.

Conclusion. Perifocal administration of HA 3 hours after an explosive injury to the soft tissues of the thigh reduces the severity of post-traumatic rhabdomyolysis, reduces the trauma-induced level of circulating pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6) in the inflammation phase, increases the concentration of anti-inflammatory cytokines (IL-10) in the phase of regeneration and formation of granulation tissue, reduces the healing time by 19% ($p<0.05$).

Keywords. Explosive wound, hyaluronic acid, soft tissues, rhabdomyolysis, systemic inflammatory response syndrome, cytokines.

Взрывная травма (МКБ-10: Y36.2, Y36.8) представляет собой тяжелую травму военного и мирного времени, которая возникает в результате воздействия на ткани различных факторов взрыва (взрывной волны, высокой температуры, вторичных ранящих элементов снаряда и др.) [1]. Высокая энергия взрывного воздействия и недостаточная прочность покровных тканей приводит к нарушению их целостности с формированием взрывной раны, которая характеризуется множественными разрывами фасции, нервов, сухожилий и мышц с участками кровоизлияний [2]. Любое повреждение тканей, в том числе и взрывная травма, сопровождается высвобождением хемокинов с развитием каскада локальных и системных молекулярных, клеточных, биохимических и гистоморфологических процессов [3]. Химические медиаторы воспаления способствуют усилению отека тканей, спазму сосудов и развитию тромбоза, что вызывает развитие стойких микроциркуляторных расстройств [4]. Присоединение бактериальной инфекции усугубляет течение раневого процесса с преобладанием воспалительной его фазы [5]. В ответ на повреждение эндогенные сигналы опасности (алармины) стимулируют синтез лейкоцитами провоспалительных цитокинов, а их выделение в кровь сопровождается развитием системной воспалительной реакции (SIRS) [6, 7]. Этот процесс может поддерживаться поступлением цитокинов из первичного очага повреждения, а при развитии SIRS и генерализации процесса – из органов, удаленных от первичного очага.

Уменьшение деструкции тканей и выраженности локального воспалительного ответа является одним из перспективных подходов восстановительного лечения механических повреждений [8]. В последние годы, для лечения различных травм стали часто использовать гидрогели гиалуроновой кислоты, которые обладают протективными и регенеративными свойствами [9]. Гиалуроновая кислота (ГК) представляет собой несulfатированный гликозаминогликан, который составляет гидрофильную основу внеклеточного матрикса и способен в зависимости от молекулярной массы проявлять различные иммунные свойства. Так, по данным А.С. Petrey, С.А. Motte (2014) высокомолекулярная ГК тормозит высвобождение провоспалительных цитокинов, уменьшает деструкцию тканей и выраженность воспалительной реакции, способствует регенерации [10]. Предполагается, что локальное применение ГК при таких обширных механических повреждениях, как взрывная рана, может уменьшить выраженность деструкции тканей, снизить уровень воспалительной реакции, предупредить генерализации воспалительного процесса.

Цель исследования – оценить динамику содержания про- и противовоспалительных цитокинов в плазме крови животных с взрывной раной мягких тканей бедра после локального перифокального введения геля гиалуроновой кислоты.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на 106 беспородных крысах-самцах линии Вистар массой 320 ± 20 г и возрастом 3,5-4,0 мес., полученных из питомника «Рапполово» (Ленинградская область, Россия). Исследование одобрено локальным Комитетом по этике ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации (протокол № 13 от 22.06.2020 г.). Исследования проводились с соблюдением требований приказа № 267 МЗ РФ, «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», «Правилами по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных», утвержденных МЗ СССР (1977) и МЗ РСФСР (1977), принципами Европейской конвенции (Страсбург, 1986) и Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996).

Все животные проходили 14-дневный карантин со свободным доступом к пище, воде. Перед исследованием все крысы были разделены на 4 группы: основную ($n=32$), группу сравнения ($n=32$), контрольную ($n=32$) и интактную ($n=10$). После предварительной наркотизации (смесь золетила и ксилазина по 10 мг/кг массы животного каждого препарата) крысам основной, группы сравнения и контрольной групп наносили взрывную рану бедра с использованием терочных петард, начиненных пиротехнической смесью по методике, описанной в предыдущих исследованиях [11]. Критерием включения в исследуемые группы служило наличие на наружной поверхности средней трети бедра животных взрывной раны мягких тканей: рана кожи и подкожно-жировой клетчатки размерами в среднем $3,0 \pm 0,5$ см и площадью – $6,9 \pm 0,3$ см², рана мышцы со средними размерами $1,2 \pm 0,2$ см, площадью – $1,1 \pm 0,2$ см², глубиной кожно-мышечной раны – $1,5 \pm 0,1$ мм. В исследование не включали животных с оскольчатым переломом бедренной кости, кровопотерей более 15% объема циркулирующей крови (ОЦК). Интактная группа была представлена животными без повреждений.

Через 3 ч после нанесения травмы всем животным проводили первичную хирургическую обработку, включающую в себя удаление нежизнеспособных тканей и инородных тел, однократно внутримышечно в здоровую конечность вводили антибактериальный препарат (гентамицина сульфат из расчета 3 мг/кг массы крысы). Затем животным основной группы перифокально в толщу мышц веерным способом вводили 1,75% раствор гиалуроновой кислоты в объеме 2,0 мл/кг, который готовили путем разбавления препарата Гиалифт 3,5 (Испания) водой для инъекций в соотношении 1:1; группы сравнения – локально вводили 0,9% раствор натрия хлорида в аналогичном объеме; животным контрольной группы локального лечения не проводили. Препарат Гиалифт 3,5 содержит нештитую нестабилизированную гиалуроновую кислоту, имеющую преимущественно высокую молекулярную массу. Сроки введения ГК и 0,9% раствора натрия хлорида обусловлены сроками оказания медицинской помощи пострадавшим с травмами. Далее на рану накладывали марлевую повязку и фиксировали её тканевым лейкопластырем. В течение последующих 7 сут ежедневно проводили перевязки с мазью «Левомеколь» и однократным введением антибиотика в суточной дозе 3 мг/кг массы крысы.

Динамическое наблюдение и оценку изучаемых показателей проводили через 3, 7, 14 и 28 сут после травмы, что соответствовало фазам течения раневого процесса: фазе воспаления (3-7 сут), фазе регенерации, образования и созревания грануляционной ткани (7-14 сут), фазе реорганизации рубца и эпителизации (14-28 сут). В ходе исследования проводили оценку внешнего вида раны, характера отделяемого из нее. Площадь раны рассчитывали по J. I. Kundin [11]:

$$S = L \times W \times 0,875, \quad (1)$$

где S (см²) – площадь раневого дефекта; L (см), W (см) – два перпендикулярных максимальных размеры раны.

Для оценки выраженности рабдомиолиза исследовали концентрацию миоглобина и калия в плазме крови. Содержание миоглобина (нг/мл) измеряли методом твердофазного ИФА с применением двух типов моноклональных антител (АО «Вектор-Бест», Россия) на автоматическом анализаторе ChemWell 2910 (Awareness Technology, США), концентрацию

калия (ммоль/л) – турбодиметрическим методом с использованием набора Калий-Ольвекс (ООО «Ольвекс Диагностикум», Россия).

Выраженность системного воспалительного ответа на фазах раневого процесса оценивали по динамике изменений содержания в плазме периферической крови про- (фактор некроза опухоли альфа (TNF- α), интерлейкин-1 β (IL-1 β), интерлейкин-6 (IL-6) и противовоспалительных (интерлейкин-10 (IL-10) цитокинов. Профиль циркулирующих цитокинов оценивали методом мультиплексного иммунного анализа на установке Bio-Plex (Bio-Rad Laboratories, США) с наборами реагентов Bio-Plex Pro™ Rat Cytokine Th1/Th2 Assay [13].

Для определения биохимических показателей и уровня цитокинов периферической крови животных выводили из эксперимента путем декапитации (по 8 животных из группы на каждый срок наблюдения).

Данные, полученные в эксперименте, вносились в карты для статистической обработки материала. Анализ полученной информации проводился на персональном компьютере Intel® Core™ i3-4160. Цифровая информация формировалась по группам, с данными которых проводился математико-статистический анализ. С учетом поставленных задач использовались методы, применяемые в среде программы Statistica 10.0 для Windows. Определение типа распределения данных проводили по критерию Колмогорова-Смирнова, Шапиро-Уилка. Непрерывные переменные в исследуемых выборках представлены в виде медианы (Me) с 1-м и 3-м квартилями [Q₂₅; Q₇₅]. Для определения статистической значимости различий между двумя независимыми выборками применяли критерий Манна-Уитни. Различие между выборками считали статистически значимыми, если вероятность их тождества оказывалась менее 5% ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение.

Динамика заживления взрывной раны. В начальную фазу (3-7 сут) из взрывной раны наблюдалось гнойное отделяемое, сначала обильное, а к 7 сут – в умеренном количестве. Площадь раны в эти сроки не имела существенных различий с её исходными значениями. Начиная с 14 сут (фаза регенерации), площадь раны уменьшилась на 44,6% ($p < 0,05$) относительно исходных значений, из раны сохранялось незначительное фибринозное отделяемое. К исходу периода наблюдения (28 сут), в активную фазу рубцевания, площадь раны составляла 1,2 [0,8; 1,6] см², при $p < 0,05$, на её поверхности располагался небольшой плотный струп. Полное заживление взрывной раны регистрировалось на 30-32 сут после травмы. Локальное введение 0,9% раствора натрия хлорида не вносило существенных изменений в динамику и сроки заживления раны. Перифокальное введение гиалуроновой кислоты способствовало уменьшению площади раны уже к исходу фазы воспаления (7 сут) на 26,2% ($p < 0,05$) по сравнению с начальной её площадью, из раны наблюдалось преимущественно серозно-гнойное или фибринозное отделяемое. В фазу регенерации продолжилось уменьшение площади раны. Так, на 14 сут рана уменьшилась на 66,2% ($p < 0,05$) от своей первоначальной площади, её покрывал плотный струп. Полное заживление раны с образованием рубца в группе животных, которым локально вводили гиалуроновую кислоту, отмечалось на 24-26 сут после травмы (табл. 1).

Таблица 1

Динамика показателей заживления экспериментальной взрывной раны мягких тканей бедра у крыс, Me [Q₂₅; Q₇₅]

Группы исследования	Сроки наблюдения сут	n	Показатели		
			Площадь раны, см ²	Характер отделяемого	Сроки заживления раны, сут
Контрольная (без локального лечения) n=32	Исходно	32	6,5 [5,7; 7,6]	–	31 [30; 33]
	3	32	5,9 [5,5; 6,8]	Гнойное отделяемое	
	7	24	5,6 [5,1; 6,3]	Гнойное отделяемое	
	14	16	3,6*, *** [3,3; 4,2]	Фибринозное отделяемое	
	28	8	1,2*, *** [0,8; 1,6]	Струп	

Сравнения (0,9% раствор натрия хлорида) n=32	Исходно	32	6,4 [6,0; 7,3]	–	30 [29; 32]
	3	32	6,2 [5,9; 7,0]	Гнойное отделяемое	
	7	24	5,7 [5,3; 6,5]	Гнойное отделяемое	
	14	16	3,7*, *** [3,3; 4,4]	Фибринозное отделяемое	
	28	8	1,0*, *** [0,7; 1,5]	Струп	
Основная (гель гиалуроновой кислоты) n=32	Исходно	32	6,5 [6,0; 7,2]	–	25 [24; 27]
	3	32	6,1 [5,3; 7,1]	Серозно-гнойное отделяемое	
	7	24	4,8* [4,5; 5,6]	Фибринозное отделяемое	
	14	16	2,2*, **, *** [1,9; 2,8]	Струп	
	28	8	–	Рубец	

Примечание: * – статистическая значимость различий по сравнению с животными интактной группы, $p < 0,05$; ** – статистическая значимость различий по сравнению с животными группы сравнения, $p < 0,05$; *** – статистическая значимость различий по сравнению с предыдущим сроком наблюдения, $p < 0,05$; Me [Q₂₅; Q₇₅] – медиана [нижний и верхний квартили]; n – количество животных в группе; различие представленных в таблице значений n в группах, на разных сроках исследования связано с выводением животных из эксперимента на предыдущих этапах исследования.

Содержание в плазме крови продуктов рабдомиолиза (миоглобин, калий) в плазме крови. Максимальное значение миоглобина в плазме крови после нанесения взрывной раны регистрировалось в фазу воспаления (3-7 сут), его уровень был в 2,4-2,6 раз ($p < 0,05$) выше показателя у интактных животных. В фазу формирования грануляционной ткани (14 сут) содержание сывороточного миоглобина снижалось, оставаясь повышенным на 62,8% ($p < 0,05$) относительно интактных крыс. К исходу периода наблюдения (28 сут), к началу формирования рубца в месте повреждения уровень миоглобина соответствовал значениям у животных интактной группы. Локальное введение 0,9% раствора натрия хлорида не вносило существенных изменений в динамику сывороточного миоглобина во все фазы раневого процесса.

Перифокальные внутримышечные инъекции геля гиалуроновой кислоты приводили к снижению содержания миоглобина в плазме крови на 22,1-23,8% ($p < 0,05$) относительно животных, получавших 0,9% раствор натрия хлорида, преимущественно в фазу воспаления (3-7 сут). В дальнейшем, в фазу регенерации и фазу формирования рубца (14-28 сут) концентрация миоглобина в плазме крови не имела существенных различий с его показаниями у интактных животных.

Сходная динамика наблюдалась в содержании в крови калия. Незначительное повышение калия в плазме крови на 26,8% ($p < 0,05$) наблюдалось в ранние сроки воспалительной фазы раневого процесса (3 сут). В дальнейшем, вплоть до 28 сут, уровень калия не отличался от его значений у интактных животных. Локальное введение 0,9% раствора натрия хлорида не оказывало влияние на показатели сывороточного калия по сравнению с животными без локального лечения (контрольная группа). Быстрое восстановление калия обусловлено важностью данного электролита для поддержания гомеостаза и участием нескольких систем регуляции его содержания в крови.

Перифокальное внутримышечное введение геля гиалуроновой кислоты (основная группа) приводило к снижению концентрации калия в плазме крови до значений у интактных животных уже к началу периода наблюдения (3 сут). В дальнейшем показатели калия в этой группе на всем протяжении периода наблюдения оставались в пределах значений интактных крыс (рис. 1).

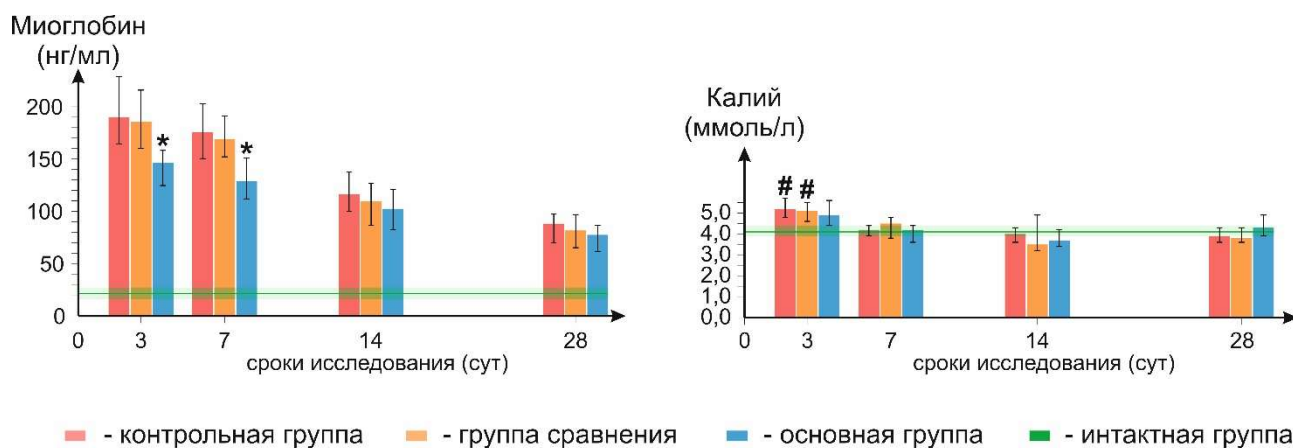


Рис. 1. Динамика содержания миоглобина (нг/мл) и калия (ммоль/л) в плазме крови у крыс с экспериментальной взрывной раной мягких тканей бедра, Ме [Q₂₅; Q₇₅]

Примечание: * – статистическая значимость различий ($p < 0,05$) относительно группы сравнения; # – статистическая значимость различий ($p < 0,05$) относительно интактной группы.

Уровень цитокинов в плазме крови. При взрывной травме наблюдалось изменение баланса циркулирующих про- и противовоспалительных цитокинов (рис. 2). В фазу воспаления (3-7 сут) регистрировался выраженный подъем уровня исследуемых провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α , IL-6) в циркуляторном русле травмированных животных, причем наиболее значительный прирост провоспалительных медиаторов характерен для IL-1 β . Так, содержание в плазме периферической крови этого цитокина в 3,1-3,5 раза ($p < 0,05$) превышало значения у интактных животных. Кроме того, регистрировалось повышение в плазме крови IL-6, который в фазу воспаления был повышен в 1,8-2,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению со значением у интактных животных. Пиковые значения уровня TNF- α в эти сроки были менее выраженными, чем содержание IL-1 β , однако в 2,6-2,8 раз ($p < 0,05$) превышали показатель у крыс интактной группы.

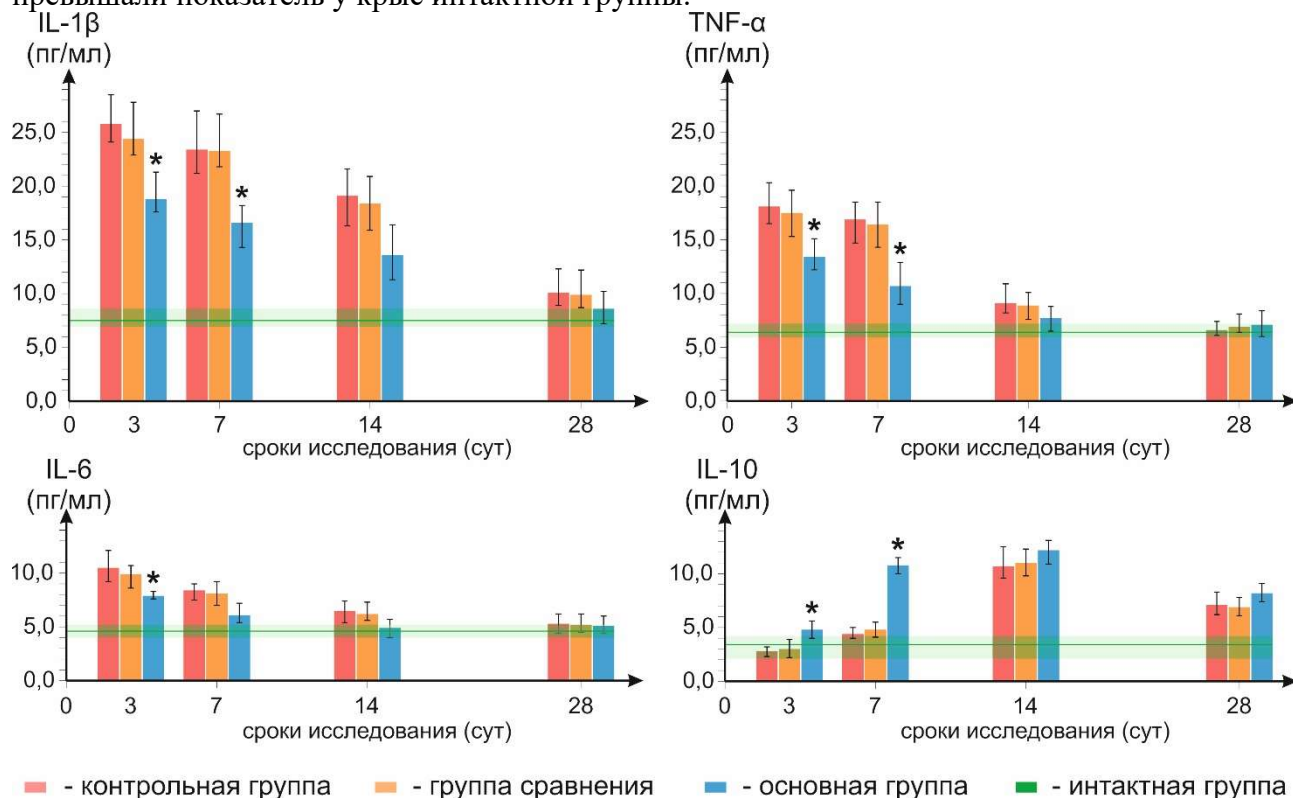


Рис. 2. Динамика концентрации цитокинов в плазме крови у крыс с экспериментальной взрывной раной мягких тканей бедра, Ме [Q₂₅; Q₇₅]

Примечание: * – статистическая значимость различий ($p < 0,05$) относительно группы сравнения.

В фазу регенерации (14 сут) уровень изучаемых провоспалительных медиаторов снижался, преимущественно за счет TNF- α и IL-6. Мониторинг уровня TNF- α показал снижение его содержания в плазме крови животных на 46,2-59,7 % ($p<0,05$) относительно предыдущего срока наблюдения (3-7 сут). Пиковые значения IL-6 в эти сроки также были на 22,6-38,1 % ($p<0,05$) меньше значений, которые наблюдались в более ранние сроки.

Тенденция к уменьшению уровня противовоспалительных цитокинов продолжилась и в фазу организации рубца и эпителизации (28 сут). Уровень IL-1 β был снижен на 47,1 % ($p<0,05$) по сравнению с его уровнем в предыдущий срок наблюдения (14 сут), оставаясь высоким (на 34,7 %, при $p<0,05$) относительно крыс интактной группы. В отличие от IL-1 β , содержание TNF- α и IL-6 в плазме крови к концу периода наблюдения не имело достоверных различий с их уровнем у интактных животных.

Локальное внутримышечное введение 0,9% раствора натрия хлорида не вносило значимых изменений в динамику провоспалительных цитокинов в различные фазы раневого процесса.

Перифокальное обкалывание мышц гелем гиалуроновой кислоты сопровождалось менее значимым приростом уровня провоспалительных цитокинов в плазме крови через 3-7 сут после нанесения повреждения. Так, уровень сывороточного IL-1 β в воспалительную фазу раневого процесса был снижен в среднем на 25,9 % ($p<0,05$), TNF- α – на 29,1 % ($p<0,05$), а IL-6 – на 22,5 % ($p<0,05$) относительно животных группы сравнения (0,9% раствор натрия хлорида). Несмотря на положительное протективное влияние гиалуроновой кислоты на местный окolorаневой воспалительный процесс области повреждения, содержание циркулирующих цитокинов в крови превышало их значение у интактных животных. Мониторинг содержания изучаемых провоспалительных медиаторов в плазме крови показал, что их уровень в фазу воспаления оставался достаточно высоким, превышая значения у интактных крыс (для IL-1 β в 2,2-2,5 раз, при $p<0,05$; для TNF- α в 1,7-2,1 раз, при $p<0,05$; для IL-6 на 71,7%, при $p<0,05$).

В фазе регенерации и образования грануляционной ткани уровень провоспалительной цитокинемии на фоне раннего применения гиалуроновой кислоты снижался. Так, средние значения IL-1 β после введения гиалуроновой кислоты незначительно уменьшались, сохраняя свой высокий уровень (на 81,3 %, при $p<0,05$) относительно интактных животных. Изменения коснулись и TNF- α , и IL-6, уровень которых снизился в эти сроки до уровня интактных животных.

В фазу образования рубца отмечалось уменьшение уровня изучаемых цитокинов в плазме крови до значений у животных интактной группы. Наиболее значительным было снижение уровня IL-1 β (на 36,8 %, при $p<0,05$) относительно предыдущего срока (фазы образования грануляций).

В отличие от профиля исследуемых циркулирующих провоспалительных цитокинов содержание противовоспалительного цитокина IL-10 в фазу воспаления (3-7 сут) у животных контрольной группы (без локального лечения) существенно не повышалось, оставаясь на уровне диапазона значений интактных животных. Повышенные уровни IL-10 в плазме крови регистрировались у животных этой группы не ранее фазы регенерации (14 сут), в 3,1 раза ($p<0,05$) превышая значения нетравмированных животных. В фазу образования рубца (28 сут) содержание циркулирующего IL-10 незначительно снижалось, оставаясь в 2,1 раза ($p<0,05$) выше значений интактных животных. Локальное введение 0,9% раствора натрия хлорида не вносило значимых изменений в динамику IL-10.

Раннее перифокальное введение в область повреждения геля гиалуроновой кислоты характеризовалось повышением уровня IL-10 (в 2,4-3,6 раз, при $p<0,05$) уже к исходу фазы воспаления (7 сут) относительно нетравмируемых животных и сохранялось до конца периода наблюдения (28 сут). Локальное применение гиалуроновой кислоты увеличивает концентрацию в плазме крови противовоспалительного IL-10 в фазу воспаления в 1,6-2,3 раза ($p<0,05$) по сравнению с его уровнем у животных группы контроля (0,9% раствор натрия хлорида).

Таким образом, взрывная рана мягких тканей конечности экспериментальных животных приводит к образованию дефекта кожи, скелетных мышц, повреждению сосудов, нервов. В результате разрушения скелетных мышц в системный кровоток поступают продукты клеточного распада (миоглобин, ионы калия), концентрация которых в плазме крови увеличивается [12]. Локальное повреждение сосудов способствует адгезии тромбоцитов на поверхности эндотелия с последующей их активацией и выбросом из альфа-гранул различных цитокинов, хемокинов и факторов роста [14]. Выделение тромбоцитами медиаторов воспаления (гистамин, калликренин, кинины и т.д.) повышает проницаемость сосудистой стенки и увеличивает транскапиллярную фильтрацию плазмы с развитием отека тканей в области повреждения. Образование тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов (ТЛА) в просвете сосудов приводит к их взаимной активации, локальному выделению цитокинов и привлечению в очаг повреждения нейтрофилов и моноцитов (макрофагов) [15]. Вокруг некротических тканей формируется лейкоцитарный воспалительный вал, отграничивающий область повреждения от здоровой ткани. Присоединение бактериальной флоры способствует нагноению раны с наличием серозного, гнойного или гнилостного отделяемого из нее. В результате возникает воспаление, которое как типовой патологический процесс может проявляться как местными, так и общими реакциями.

Наблюдаемое в ранние сроки после нанесения взрывной раны повышение концентрации циркулирующих цитокинов (IL-1 β , TNF- α и IL-6) с преимущественным увеличением уровня IL-1 β свидетельствует о выраженности воспалительной реакции и обусловлено выходом в периферическую кровь провоспалительных сигнальных молекул и формированием системного воспалительного ответа [7, 12]. Отражением выраженной ответной неспецифической реакции организма на травматическое повреждение мягких тканей служит повышение содержания TNF- α в крови, которое коррелирует с повышением уровня циркулирующего IL-6. Помимо провоспалительных цитокинов обязательными участниками воспалительного процесса являются противовоспалительные медиаторы (IL-10), которые за счет своего дистантного действия влияют на выраженность системной воспалительной реакции [6, 16]. Выраженный цитокиногенез может приводить к генерализации воспалительного процесса в органах и тканях, удаленных от первичного очага повреждения, с развитием полиорганной недостаточности [17]. Возможно, что именно дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов является свидетельством основных проявлений системного воспалительного ответа при взрывных повреждениях. Кроме того, прирост содержания изучаемых провоспалительных цитокинов соответствовал срокам формирования очагов некроза, нейтрофильной и макрофагальной инфильтрации, что может служить показателем прогрессии воспалительного процесса при взрывной ране.

Локальное применение геля гиалуроновой кислоты способствовало уменьшению выраженности отека тканей в области раны, менее выраженному приросту миоглобина и ионов калия в плазме крови, особенно в фазу воспаления раневого процесса. Эффекты гиалуроновой кислоты в раннем посттравматическом периоде обусловлены её структурной организацией, которая обеспечивает вязкоупругие и водоудерживающие свойства, позволяющие связывать и продолжительно удерживать большое количество молекул воды [10], снижая поступление токсических продуктов рабдомиолиза в кровяное русло. Трехмерные сетки гиалуроновой кислоты способствуют увеличению вязкоупругих свойств раствора [18]. Наличие полярных и неполярных структур в составе гиалуроновой кислоты облегчает взаимодействие с различными химическими агентами и белковыми субстанциями, а ионные связи образующихся солей гиалуроновой кислоты приводят к образованию раствора с выраженными гидрофильными свойствами [10].

Локальное внутримышечное введение в область повреждения мягких тканей конечности геля гиалуроновой кислоты сопровождалось в воспалительную фазу раневого процесса менее значимым увеличением в крови уровня IL-1 β , TNF- α , IL-6 на фоне умеренного прироста содержания IL-10, которое свидетельствовало о способности высокомолекулярной гиалуроновой кислоты снижать проявления системного дисбаланса

про- и противовоспалительных цитокинов, уменьшать первичные и вторичные повреждения скелетных мышц и выраженность рабдомиолиза. Гиалуроновая кислота высокой молекулярной массы действует не только как гидрофильный наполнитель внеклеточного пространства, но и способна оказывать противовоспалительное и антиангиогенное действие, что обеспечивает благоприятное течение процессов как в фазу острого воспаления, так и в фазу регенерации и формирования грануляционной ткани. Раннее применение высокомолекулярной гиалуроновой кислоты в фазу воспаления блокирует взаимодействие короткоцепочечной низкомолекулярной гиалуроновой кислоты с провоспалительными рецепторами клеточной поверхности, что снижает активность воспалительных клеток в ране, уменьшает в последующем фиброз и образование патологических рубцов [10]. Гиалуроновая кислота проявляет высокую аффинность связывания с CD44 в фибробластах и устойчивость к диссоциации по мере увеличения ее молекулярной массы [19]. Экзогенно введенная гиалуроновая кислота, связываясь с CD44 в эпидермальных или фибробластных клетках, приводит к генетической экспрессии, связанной с ускорением заживления ран, и, по-видимому, стимулируется сигнальной трансдукцией CD44. Снижение проявлений воспалительного ответа под влиянием высокомолекулярной гиалуроновой кислоты ассоциировано с ингибированием выработки макрофагами провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α , IL-6) посредством подавления транскрипционных факторов NF- κ B и I- κ B α через сайты связывания с молекулами межклеточной адгезии ICAM-1. Интраартикулярное введение высокомолекулярной гиалуроновой кислоты значительно снижало объем выпота и повышенное содержание IL-6 при остеоартрите коленного сустава, коррелируя с клиническим улучшением [10]. При местном применении в зону повреждения периферического нерва высокомолекулярная гиалуроновая кислота проявляла способность снижать индуцированную травмирующим воздействием экспрессию провоспалительных факторов (IL-1 β , TNF- α , Tol-подобных рецепторов, матриксных металлопротеиназ) [20].

Следовательно, оценка содержания циркулирующих провоспалительных и противовоспалительных цитокинов свидетельствует о возможности ослабления формирования системного воспалительного ответа в условиях локального введения геля высокомолекулярной гиалуроновой кислоты в область сдавления. Наиболее выраженная модификация воспалительного ответа цитокинов наблюдается в фазу воспаления раневого процесса после нанесения взрывной раны.

Результаты настоящего исследования соотносятся с существующими положениями о раневом процессе, роли биологических жидкостей (в частности, гиалуроновой кислоты) в регуляции гомеостаза на организменном и тканевом уровнях в рамках механизмов восстановления тканей после повреждения. Экстраполяция полученных данных на организм человека возможна относительно направленности развития патологических реакций при повреждении тканей и саногенетических механизмов их восстановления в условиях локального применения гиалуроновой кислоты.

Ограничения исследования определены форматом эксперимента (мелкие лабораторные животные, модель взрывной раны без перелома, проведение лечебных манипуляций в ранний период раневого процесса – через 3 ч после повреждения), что следует учитывать при воспроизведении аналогичных исследований для получения новых данных о направлениях разработки методов лечения повреждений мягких тканей.

Выводы

1. При повреждении мягких тканей бедра в результате взрывной раны у крыс в воспалительную фазу раневого процесса нарастает концентрация провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α , IL-6) в плазме крови, а в фазу регенерации, формирования и созревания грануляционной ткани доминирующую позицию занимает противовоспалительный цитокин IL-10.
2. Перифокальное введение ГК через 3 ч после взрывном повреждении мягких тканей бедра уменьшает выраженность посттравматического рабдомиолиза, снижает индуцированный травмой уровень циркулирующих провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α , IL-6) в

фазу воспаления и повышает концентрацию противовоспалительных цитокинов (IL-10) в фазу регенерации и образования грануляционной ткани, сокращает сроки заживления на 19% ($p < 0,05$), что может рассматриваться как перспективный подход к тканесберегающей тактике при лечении взрывной травмы.

Информация о финансировании. Авторы заявляют, что при подготовке статьи не использовались вневедомственные источники финансирования.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Сведения о вкладе каждого автора в работу:

Шперлинг И.А. – 30% (разработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, научное редактирование, утверждение окончательного текста статьи)

Шулепов А.В. – 30% (сбор данных, анализ и интерпретация данных, анализ литературы по теме исследования, написание текста статьи, техническое редактирование)

Шперлинг Н.В. – 20% (анализ и интерпретация данных, анализ литературы по теме исследования, научное редактирование, утверждение окончательного текста статьи)

Ростовцев С.О. – 20% (сбор данных, техническое редактирование, анализ литературы по теме исследования)

Список литературы:

1. Liu G.E., Tian Y., Zhao W.J., Song S.M., Li L. Annual review of Chinese Journal of Traumatology 2020. Ghin J Traumatol. 2021 24(1). 1-4. DOI: 10.1016/j.cjtee.2020.12.001
2. Rivedal D.D., Coon C., Sanger J.R., Hettinger P. Blast injury to the hand: assessing the injury pattern and functional outcome of the thumb. Plast Reconstr Surg Glob Open. 2021. 9(9). e3767. DOI: 10.1097/GOX.0000000000003767
3. Смирнов И.Е., Рошаль Л.М., Кучеренко А.Г., Карасева О.В., Понина И.В. Изменения содержания костных биомаркеров и цитокинов в сыворотке крови при сочетанной травме у детей. Российский педиатрический журнал. 2017. 20(6). 371-378. DOI: 10.18821/1560-9561-2017-20-6-371-378
4. Козлов В.И., Сахаров В.Н., Гурова О.А., Сидоров В.В. Оценка состояния микроциркуляции у детей 6–7 лет по данным лазерной доплеровской флоуметрии. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2021. 20(3). 46-53. DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-3-46-53
5. Petfield J.L., Lewandowski L.R., Stewart L., Murray C.K., Tribble D.R. IDCRP Combat-related extremity wound infection research. Mil Med. 2022. 187(2). 25-33. DOI: 10.1093/milmed/usab065
6. Relja B., Mörs K., Marzi I. Danger signals in trauma. Eur J Trauma Emerg Surg. 2018. 44(3). 301-316. DOI: 10.1007/s00068-018-0962-3
7. Xu P., Wang F., Zhou X.L., Li L., Xiong D., Yong Y.Q., Zhao Y., Jiang W.X. Systemic inflammatory response and multiple organ dysfunctions following crush injury: a new experimental model in rabbits. Inflammation. 2018. 41(1). 240-248. DOI: 10.1007/s10753-017-0683-5
8. Шулепов А.В., Шперлинг И.А., Юркевич Ю.В., Шперлинг Н. В., Васильев С. Б. Профиль циркулирующих цитокинов в аспекте системного воспаления при продолжительной статической компрессии мягких тканей в эксперименте. Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. 2022. 12(1). 61-68. DOI: 10.37279/2224-6444-2022-12-1-61-68
9. Taskan M.M., Balci Yuce H., Karatas O., Gevrek F., Isiker Kara G., Celt M., Sirma Taskan E. Hyaluronic acid with antioxidants improve wound healing in rats. Biotech Histochem. 2021. 96(7). 536-545. DOI: 10.1080/10520295.2020.1832255
10. Капулер О., Галеева А., Сельская Б., Камилов Ф. Гиалуронан: свойства и биологическая роль. Врач. 2015. 2. 25-27.

11. Шперлинг И.А., Ростовцев С.О., Шулепов А.В., Коуров А.С., Баженов М.В. Особенности микроциркуляции и метаболизма в коже и мягких тканях области повреждения при экспериментальной взрывной травме. Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2022. 24(1). 101-110. DOI: 10.17816/brmma71464
12. Wang W., Wang Yu., Yang J. Protective effects of ischemic postconditioning on skeletal muscle following crush syndrome in the rat. *Acta Cir Bras.* 2021. 36(7). e360701. DOI: 10.1590/ABC360701
13. Riteau N., Gombault A., Couillin I. Assessment of inflammasome activation by cytokine and danger signal detection. *Methods Mol Biol.* 2016. 14(17). 63-74. DOI: 10.1007/978-1-4939-3566-6_3
14. Qiu Y., Brown A.C., Myers D.R., Sakurai Y., Mannino R.G., Tran R., Ahn B., Hardy E.T., Kee M.F., Kumar S., Bao G., Barker T.H., Lam W.A. Platelet mechanosensing of substrate stiffness during clot formation mediates adhesion, spreading, and activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014. 111(40). 14430-14435. DOI: 10.1073/pnas.1322917111
15. Schrottmaier W.S., Kral J.B., Zeitlinger M., Salzmann M., Jilma B., Assinger A. Platelet activation at the onset of human endotoxemia is undetectable in vivo. *Platelets.* 2016. 27(5). 479-483. DOI: 10.3109/09537104.2015.1119814
16. Cheng A., Vantucci C.E., Krishnan L., Ruehle M.A., Kotanchev T., Wood L.B., Roy K., Guldberg R.E. Early systemic immune biomarkers predict bone regeneration after trauma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2021. 118(8). e2017889118. DOI: 10.1073/pnas.2017889118
17. Гусев Е.Ю., Зотова Н.В. Патогенез и прогноз критических осложнений политравмы с позиции общепатологических процессов. *Политравма.* 2021. 1. 97-116. DOI: 10.24411/1819-1495-2021-10014
18. Fallacara A., Baldini E., Manfredini S., Vertuani S. Hyaluronic acid in the Third Millennium. *Polymers (Basel).* 2018. 10(7). 701. DOI: 10.3390/polym10070701
19. Price Z.K., Lokman N.A., Ricciardelli C. Differing roles of hyaluronan molecular weight on cancer cell behavior and chemotherapy resistance. *Cancers (Basel).* 2018. 10(12). 482. DOI: 10.3390/cancers10120482
20. Jou I-M., Wu T-T., Hsu C-C., Yang C-C., Huang J-S., Tu Y-K., Lee J-S., Su F-C., Kuo Y-L. High molecular weight form of hyaluronic acid reduces neuroinflammatory response in injured sciatic nerve via the intracellular domain of CD44. *J Biomed Mater Res.* 2021. 109. 673-680. DOI: 10.1002/jbm.b.34731

References:

1. Liu G.E., Tian Y., Zhao W.J., Song S.M., Li L. Annual review of Chinese Journal of Travmatology 2020. *Ghin J Travmatol.* 2021. 24(1). 1-4. DOI: 10.1016/j.cjtee.2020.12.001
2. Rivedal D.D., Coon C., Sanger J.R., Hettinger P. Blast injury to the hand: assessing the injury pattern and functional outcome of the thumb. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 2021. 9(9). e3767. DOI: 10.1097/GOX.0000000000003767
3. Smirnov I.E., Roshal L.M., Kucherenko A.G., Karaseva O.V., Ponina I.V. Changes in The blood serum content of bone biomarkers and cytokines in children with combined trauma. *Russian pediatric journal.* 2017. 20(6). 371-378. in Russian. DOI: 10.18821/1560-9561-2017-20-6-371-378
4. Kozlov V.I., Sakharov V.N., Gurova O.A., Sidorov V.V. Laser doppler flowmetry assessment of microcirculation in children of 6–7 years old. *Regional blood circulation and microcirculation.* 2021. 20(3). 46-53. in Russian. DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-3-46-53
5. Petfield J.L., Lewandowski L.R., Stewart L., Murray C.K., Tribble D.R. IDCRP Combat-related extremity wound infection research. *Mil Med.* 2022. 187(2). 25-33. DOI: 10.1093/milmed/usab065
6. Relja B., Mörs K., Marzi I. Danger signals in trauma. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2018. 44(3). 301-316. DOI: 10.1007/s00068-018-0962-3

7. Xu P., Wang F., Zhou X.L., Li L., Xiong D., Yong Y.Q., Zhao Y., Jiang W.X. Systemic inflammatory response and multiple organ dysfunctions following crush injury: a new experimental model in rabbits. *Inflammation*. 2018. 41(1). 240-248. DOI: 10.1007/s10753-017-0683-5
8. Shulepov A.V., Shperling I.A., Yurkevich Yu.V., Shperling N.V., Vasil'ev S.B. Profile of circulating cytokines in the aspect of systemic inflammation with a prolonged static compression of soft tissue in the experiment. *Crimean journal of experimental and clinical medicine*. 2022. 12(1). 61-68. in Russian. DOI: 10.37279/2224-6444-2022-12-1-61-68
9. Taskan M.M., Balci Yuce H., Karatas O., Gevrek F., Isiker Kara G., Celt M., Sirma Taskan E. Hyaluronic acid with antioxidants improve wound healing in rats. *Biotech Histochem*. 2021. 96(7). 536-545. DOI: 10.1080/10520295.2020.1832255
10. Kapuler O., Galeeva A., Selskaya B., Kamilov F. Hyaluronan: properties and biological role. *Vrach*. 2015. 2. 25-27. in Russian.
11. Shperling I.A., Rostovtsev S.O., Shulepov A.V., Kourov A.S., Bazhenov M.V. Features of microcirculation and metabolism in the derma and soft tissues of the area of damage in experimental explosive trauma. *Bulletin of the Russian Military medical academy*. 2022. 24(1). 101-110. in Russian. DOI: 10.17816/brmma71464
12. Wang W., Wang Yu., Yang J. Protective effects of ischemic postconditioning on skeletal muscle following crush syndrome in the rat. *Acta Cir Bras*. 2021. 36(7). e360701. DOI: 10.1590/ABC360701
13. Riteau N., Gombault A., Couillin I. Assessment of inflammasome activation by cytokine and danger signal detection. *Methods Mol Biol*. 2016. 14(17). 63-74. DOI: 10.1007/978-1-4939-3566-6_3
14. Qiu Y., Brown A.C., Myers D.R., Sakurai Y., Mannino R.G., Tran R., Ahn B., Hardy E.T., Kee M.F., Kumar S., Bao G., Barker T.H., Lam W.A. Platelet mechanosensing of substrate stiffness during clot formation mediates adhesion, spreading, and activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014. 111(40). 14430-14435. DOI: 10.1073/pnas.1322917111
15. Schrottmaier W.S., Kral J.B., Zeitlinger M., Salzmann M., Jilka B., Assinger A. Platelet activation at the onset of human endotoxemia is undetectable in vivo. *Platelets*. 2016. 27(5). 479-483. DOI: 10.3109/09537104.2015.1119814
16. Cheng A., Vantucci C.E., Krishnan L., Ruehle M.A., Kotanchek T., Wood L.B., Roy K., Guldberg R.E. Early systemic immune biomarkers predict bone regeneration after trauma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2021. 118(8). e2017889118. DOI: 10.1073/pnas.2017889118
17. Gusev E.Yu., Zotova N.V. Pathogenesis and prediction of critical complications of polytrauma from the position of common pathological processes. *Polytrauma*. 2021. 1. 97-116. in Russian. DOI: 10.24411/1819-1495-2021-10014
18. Fallacara A., Baldini E., Manfredini S., Vertuani S. Hyaluronic acid in the Third Millennium. *Polymers (Basel)*. 2018. 10(7). 701. DOI: 10.3390/polym10070701
19. Price Z.K., Lokman N.A., Ricciardelli C. Differing roles of hyaluronan molecular weight on cancer cell behavior and chemotherapy resistance. *Cancers (Basel)*. 2018. 10(12). 482. DOI: 10.3390/cancers10120482
20. Jou I-M., Wu T-T., Hsu C-C., Yang C-C., Huang J-S., Tu Y-K., Lee J-S., Su F-C., Kuo Y-L. High molecular weight form of hyaluronic acid reduces neuroinflammatory response in injured sciatic nerve via the intracellular domain of CD44. *J Biomed Mater Res*. 2021. 109. 673-680. DOI: 10.1002/jbm.b.34731