

SERUM PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES AND CHEMICAL ACID BURNS IN RATS

Cavallini M.,¹ de Boccard F.,² Corsi M.M.,² Fassati L.R.,³ Baruffaldi Preis F.W.¹

¹ Unit of Plastic Surgery, Galeazzi Hospital, Milan, Italy

² Laboratory of Clinical Pathology, Institute of General Pathology, University of Milan, Milan

³ Institute of Experimental Surgery, University of Milan

SUMMARY. This experimental study measures the evolution of the concentration of interleukin-6 and the tumour necrosis factor \cdot in rats, after a chemical burn with hydrochloric acid (0.5 ml, 52% for 15 sec), comparing the results between saline solution, calcium gluconate, and an amphoteric solution called Diphoterine[®].

Introduction

After chemical burns many products are used in clinical practice to wash the damaged skin.¹

In this study we compare the effects on wound healing and immunological responses of saline solution (0.9%), calcium gluconate, and an amphoteric solution (Diphoterine[®]) after burns on rats induced by hydrochloric acid (0.5 ml, 52% for 15 sec.²

Diphoterine[®], an amphoteric rinse, is used in the emergency treatment of serious ocular burns.^{3,4}

In this particular case we studied the plasma level of two inflammatory cytokines, interleukin-6 (IL-6) and the tumour necrosis factor \cdot (TNF- \cdot), which have been shown to induce production of a series of acute phase proteins.

TNF- \cdot is an activator of the vascular endothelium that provokes an enhancement of permeability, with systemic effects such as fever and shock.⁵ TNF- \cdot also increases lymphatic drainage. IL-6 activates the lymphocytes in acute inflammation and is an important cytokine in the production of the protein in the acute phase.⁶

Acids are entities that can release H⁺ ions or fix OH⁻ ions.

When many H⁺ ions come into contact with the skin, penetration happens quickly through the inter- and intracellular space. We can observe the direct effect on the cell membrane, where the cell membrane breaks and the cells burst.⁷ The interruption of the osmotic balance plays an important role, but the breaking and the crossing of the H⁺ ions are not always systematic. Inside the tissues, the H⁺ ions will react essentially with the proteins and produce irreversible structural changes.⁸ These changes are reflected in the coagulation phenomenon, and come at the same time as heat production. This phenomenon provokes the cell's death, with a high lev-

el of cytokines. Cytokines are immunoregulatory proteins and glycoproteins that go through specific receptors on target cells in a paracrine, autocrine, or endocrine manner.⁹ These molecules are produced by a variety of cells, including those of the epidermis, and include interleukins, TNFs, and others. Cytokines are involved in the differentiation, activation, and proliferation of both immune and non-immune cells involved in immuno-inflammatory reactions.

Materials and methods

We took 20 male Sprague-Dawley CD rats (250 to 300 g), which received a standardized burn with 52% hydrochloric acid (0.5 ml) for 15 sec. The cutaneous area was prepared beforehand by shaving the skin over the scapula-humeral articulation.

The animals were anaesthetized with 30 mg/kg ketamine. All procedures involving animals and their care were conducted in conformity with Institutional Guidelines in compliance with National (Italian Law Decree no. 116, Official Gazette Suppl. 40, 18 Feb. 1992) and International Laws and Policies (EC Council Directive 86/609, OJL 358, 1, 12 Dec. 1987; NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication No. 85-23, 1985).

The burned rats were divided into four treatment groups.

Group 1 animals received no treatment. Group 2 animals were washed with saline solution (0.9% NaCl), group 3 animals with calcium gluconate, and group 4 animals with Diphoterine[®]. The wash lasted 30 sec.

Blood samples for measurement of plasma levels of IL-6 and TNF- \cdot were taken at different moments - after 6 h, 48 h, and 7 days. The samples were taken from the caudal vein using a butterfly needle.

Cytokine assays

For IL-6, the assay uses the quantitative sandwich enzyme immunoassay technique (R&D System Inc., MN, USA). A monoclonal antibody specific for rat IL-6 is pre-coated onto a microplate. Standards, controls, and samples are pipetted into the wells and any rat IL-6 present is bound by the immobilized antibody. After washing away any unbound substances, an enzyme-linked polyclonal antibody specific for rat IL-6 is added to the wells. Following a wash to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate solution is added to the wells. The enzyme reaction yields a blue product that turns yellow when the stop solution is added. The intensity of the colour measured is in proportion to the amount of rat IL-6 bound in the initial step. The sample values are then read off the standard curve.

For the TNF- α assay (R&D System Inc., MN, USA), the technique used was exactly the same as for IL-6, except naturally for the antibodies and standards.

Statistical methods

The differences between data were studied using analysis of variance (ANOVA) and Bartlett's test. Tukey's multiple comparison test was applied as needed. Statistical significance was taken as $p < 0.05$.

Results are shown as the mean \pm standard deviation.

Results

The results of the plasma assays for the immunological parameters are shown in *Figs. 1* and *2*.

Regarding TNF- α (*Fig. 1*), there was a decrease of this cytokine after 6 h, 48 h, and 7 days in all of

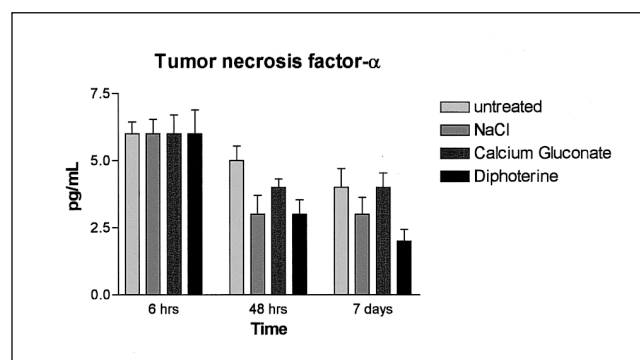


Fig. 1 - Tumour necrosis factor- α .

the treatments, but there was no significant difference between the single treatment at the different times (6 h, 48 h, and 7 days).

For IL-6 (*Fig. 2*), the acute phase protein, there was, as with TNF- α , a decrease of the cytokine at

the different periods. Unlike TNF- α , for IL-6 there were significant differences between the different treatments.

At 6 h we can see Untreated vs NaCl with $p < 0.01$. NaCl was diminished; Untreated vs Diphoterine[®] and calcium gluconate vs Diphoterine[®] with p

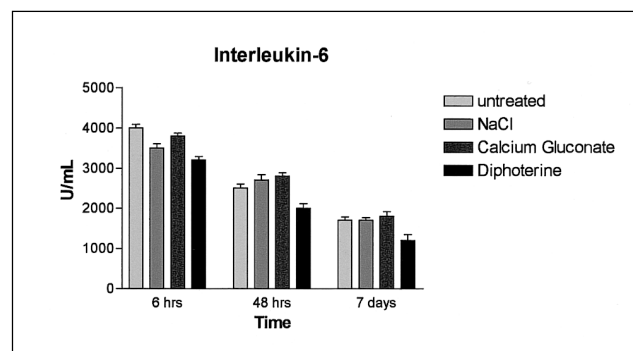


Fig. 2 - Interleukin-6.

< 0.001 considered extremely significant. In both, Diphoterine[®] was diminished.

At 48 h we have Untreated vs Diphoterine[®] with $p < 0.05$; NaCl vs Diphoterine[®] with $p < 0.01$ and calcium gluconate vs Diphoterine[®] with $p < 0.001$. In both, Diphoterine[®] was diminished.

At 7 days we observe Untreated vs Diphoterine[®] with $p < 0.05$; NaCl vs Diphoterine[®] with $p < 0.05$ and calcium gluconate vs Diphoterine[®] with $p < 0.01$. In both, Diphoterine[®] was diminished.

Discussion

IL-6 and TNF- α production is enhanced during inflammation and following burns.⁵ In this study, the use of Diphoterine[®] was associated with decreased plasma levels of these parameters at 6 h, 48 h, and 7 days after experimental hydrochloric acid skin burns, as compared to untreated controls and following decontamination with either normal saline or 10% calcium gluconate solution. We suggest that a decrease in IL-6 serum levels could better explain the continued good health of the rats burned with hydrochloric acid throughout the treatment. We can affirm that Diphoterine[®] works as well as calcium gluconate, in the modulation of IL-6 serum levels. Our data suggest that Diphoterine[®] can in part modulate inflammatory promoters by limiting the enhancement of IL-6, an important inducer of the acute phase during inflammation.⁶

Contact with hydrochloric acid for 15 sec caused a deep burn of 20 mm on the back of the rats, showing the final result after 24 h. The rats were washed with three different solutions, and one group was un-

treated. The rats that were locally untreated were covered only with sterile gauze.

After 48 h we saw no particular differences in wound healing in all the treated groups.

After 7 days we noted the following results:

- * The untreated group still showed a deep burn of 12 mm with the presence of necrotic tissue and an inflammatory area around the wound.
- * The group treated with calcium gluconate showed a residual burned area of 9 mm with a central presence of necrotic tissue.
- * The groups treated with NaCl solution (Fig. 3) and Diphoterine® (Fig. 4) showed the best results: there was a considerable contraction, with a residual burned zone of 5 mm, with the presence of central tissues showing progressive and spontaneous re-epithelialization. The Diphoterine®-treated group showed better re-epithelialization than the NaCl group, with a residual wound of 4 mm for Diphoterine® vs 6 mm for NaCl.

Improved wound healing in the Diphoterine® de-

contamination group compared with undecontaminated controls or animals decontaminated with either normal saline or 10% calcium gluconate was evidenced by a more rapid resolution of the necrotic area and better healing of the burned tissue, starting from the external margin of the burn.

Conclusion

Decontamination with Diphoterine® modulated the pro-inflammatory plasma cytokine IL-6 in this experimental hydrochloric acid dermal burns model and promoted better wound healing compared with non-decontamination or decontamination with either normal saline or 10% calcium gluconate solution.

Our results suggest that Diphoterine® could be a more effective means of active decontamination of acid dermal splashes.

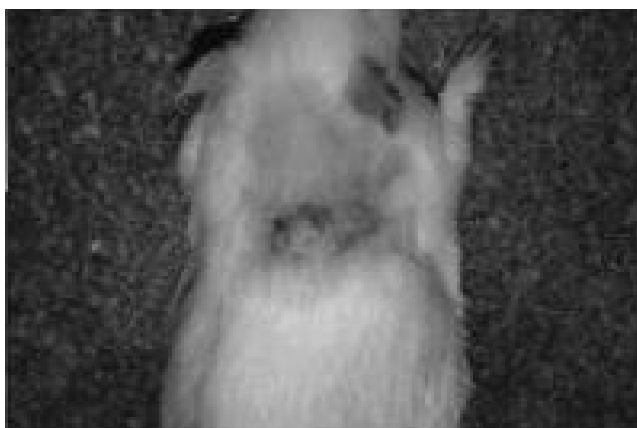


Fig. 3 - Burned rat treated with NaCl after 7 days.



Fig. 4 - Burned rat treated with Diphoterine® after 7 days.

RÉSUMÉ. Cette étude expérimentale considère l'évolution des mesures de concentration de l'interleukine-6 et le facteur de nécrose de la tumeur dans le rat, après une brûlure chimique avec acide chlorhydrique (0,5 ml, 52% pendant 15 sec), et présente une comparaison des résultats avec une solution saline, le gluconate de calcium et une solution amphotérique appelée Diphotérine®.

BIBLIOGRAPHY

1. Beiran I., Miller B., Bentur Y.: The efficacy of calcium gluconate in ocular hydrofluoric acid burns. *Human and Experimental Toxicology*, 16: 223-8, 1997.
2. Hojer J., Personne M., Hulsten P., Ludwigs U.: Topical treatment for hydrofluoric acid burns. A blind controlled experimental study. *J. Clin. Toxicol.*, 40: 861-6, 2003.
3. Gerard M., Merle H., Chiambretta F., Rigal D., Schrage N.F.: An amphoteric rinse used in the emergency treatment of a serious ocular burn. *Burns*, 28: 670-3, 2002.
4. Schrage N.F., Kompa S., Haller W., Langefeld S.: Use of an amphoteric lavage solution for emergency treatment of eye burns. First animal experimental clinical considerations. *Burns*, 28: 782-6, 2002.
5. Caldwell F.T., jr, Graves D.B., Wallace B.H.: Pathogenesis of fever in a rat burn model: The role of cytokines and lipopolysaccharide. *J. Burn Care Rehabil.*, 186: 525-30, 1997.
6. Van Gool J., van Vugt H., Helle M., Aarden L.A.: The relation among stress adrenalin interleukin-6 and acute phase proteins in the rat. *Clin. Immunology Immunopathology*, 57: 200-10, 1990.

7. Kirkpatrick J.J.R., Burd D.A.R.: An algorithmic approach to the treatment of hydrofluoric acid burns. *Burns*, 21: 495-9, 1995.
8. Kirkpatrick J.J.R., Enion D.S., Burd D.A.R.: Hydrofluoric acid burns: A review. *Burns*, 21: 483, 1995.
9. Ohzato H., Monden M., Yoshizaki K., Ogata A., Nishimoto N., Gotoh M., Kishimoto T., Mori T.: Systemic production of IL-6 following acute inflammation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 197: 1556-62, 1993.

This paper was received on 12 January 2004.

Address correspondence to: Dr M. Cavallini, Unit of Plastic Surgery, Viale Lombardia 18, 20131 Milan, Italy. Tel.: 390270638009; e-mail: maurizio.cavallini@libero.it

COMPTE RENDU DE CONGRES CHIRURGIE PLASTIQUE ET BRULURES - TRIPOLI - 17 AU 20 OCTOBRE 2002

Du 17 au 20 octobre 2002, s'est tenue à Tripoli la réunion commune de la Société Libyenne de Chirurgie Plastique (5ème meeting), de la Société Panafricaine de Chirurgie Plastique (3ème conférence) et du Mediterranean Burns Council (MBC 12ème réunion).

L'arrivée sur le sol libyen par voie aérienne se fait de manière plus aisée depuis la levée de l'embargo, puisqu'on atterrit directement sur l'aéroport international, après une durée de vol n'excédant pas 4 heures (nous avions fait il y a trois ans le trajet Paris-Tripoli en deux étapes: Paris-Djerba en avion, puis Djerba-Tripoli par la route en 6 h, avec des contrôles répétés, policiers et douanes tout le long de la route, ce qui avait été fastidieux). Il nous a fallu cependant cette fois supporter une interminable attente, plus de deux heures, pour la vérification de nos passeports et de nos visas sur l'aéroport.

L'accueil par nos confrères libyens sur les lieux du congrès, dans un bel hôtel au bord de la mer et un centre de congrès confortable, nous a fait vite oublier ce dysfonctionnement.

Organisée par le Professeur Mustafa Zaïdi, président de la Société Libyenne de Chirurgie Plastique, Chef de Service de Chirurgie Plastique et de son adjoint le Docteur Reda Franka, le congrès a été un succès tant par le nombre de ses participants (450) que par la qualité des interventions.

Mustafa Zaïdi nous accueillait en soulignant l'importance des liens afro-européens, avec le rôle important que jouait la Libye dans ces relations et dans la promotion de la chirurgie plastique entre l'Afrique et les zones méditerranéennes. La plupart des pays africains et européens étaient représentés:

- * *Europe*: Angleterre, Allemagne, Autriche, Belgique, Chypre, Espagne, France, Grèce, Italie, Malte, Pays-Bas, Slovaquie, Suisse
- * *Afrique du Nord*: Algérie, Maroc, Tunisie
- * *Moyen Orient*: Egypte, Koweït, Liban, Irak, Qatar, Syrie, Yémen
- * *Afrique Noire*: Côte d'Ivoire, Ghana, Kenya, Nigeria, Sénégal, Zambie, Zimbabwe
- * *Afrique du Sud*

La représentation française était conséquente: Marchac, Romana, Delarue, Belhaouari, Lafitte, Teot, Gilbert, Schoof, Guimbertaud et moi-même.

Jean-Marie Servant, qui devait participer à la réunion, avait raté l'avion, pris dans un embouteillage avant Roissy.

La première journée a été entièrement consacrée à une conférence sur les plaies et les cicatrisations, avec des exposés sur les escarres de décubitus, le pied diabétique et la cicatrisation en général.

Puis, pour la séance inaugurale, le Professeur Zaki du Caire, nous rappelait l'histoire de la chirurgie plastique dans le monde arabe, alors que le Professeur John Ioannovich nous traçait un remarquable tableau de la chirurgie plastique en Méditerranée.

Une journée entière a été consacrée aux brûlures, où la plupart des thèmes ont été évoqués: brûlures des mains, substituts cutanés, banque de peau, cicatrisation hypertrophique, etc. Michele Masellis, présidait une excellente table ronde sur les catastrophes par incendie.

Dans deux salles en parallèle ont été évoqués les principaux problèmes de chirurgie plastique, un survol de la chirurgie crânio-faciale et ses résultats à long terme par Daniel Marchac, les lambeaux pré-fabriqués par Holle, mais la reconstruction mammaire, grand dorsal, grand droit, les lambeaux des membres inférieurs et les lambeaux fascio-cutanés ont été également à l'honneur. La rhinoplastie et les fentes labio-palatines ont été également des sujets très suivis et la chirurgie esthétique n'a pas été négligée: nez, sein, greffe de cheveux, lipoaspiration, lifting, blépharoplastie, rien ne fut oublié.

Au total, sur le plan scientifique, toutes les questions de chirurgie plastique et esthétique ont été évoquées et ont donné lieu à des confrontations intéressantes, soulignant que des deux côtés de la Méditerranée ces sujets ne laissent personne indifférent.

Pendant le congrès s'est tenue une réunion du Comité Exécutif du Mediterranean Burns Council, où Michele Masellis insistait sur l'importance du projet Burnet, projet qui doit paraître *in extenso* dans les colonnes de la revue, en insistant encore sur le rapprochement tellement important entre l'Afrique, le Moyen-Orient et l'Europe grâce à la Méditerranée.

L'accueil a été très amical, et une fois de plus on a pu noter la grande hospitalité de nos collègues libyens. Le livre vert de Moamar El Kadhafi, omniprésent par ses portraits sur les murs du Palais des Congrès, nous a été offert dans la langue que nous souhaitons, ce qui nous a permis de réfléchir sur "la conception de la démocratie et le pouvoir du peuple et sur la seule solution du problème économique: le socialisme", sans être convaincus cependant.

Nous avons relu à l'occasion le livre de Guy Geogry, ancien ambassadeur de France à Tripoli: *Khadafi, le berger des Syrtes* (Flammarion): "On reste confondu par l'étonnante ascension de cet homme qui naquit au foyer d'un bédouin, qui en quelques années provoqua l'Occident, inquiéta l'Orient et se joua de l'Afrique. La Libye ou Jamahirya, pays transformé, sans opposant, est actuellement d'un calme et d'une sérénité surprenante, apôtre ou démon, poète ou demiurge, vers quel destin Mohamar El Kadhafi, le berger des Syrtes conduit-il son troupeau?"

Mais n'oublions pas l'intérêt touristique de ce pays. Tripoli reste la plus grande cité de la Jamahirya, que nous visitons pour la troisième fois. Elle garde quelques vestiges de la colonisation italienne, notamment belles rues avec arcades, mais ses souks ne nous ont pas enthousiasmés.

La plus grande partie du pays est désertique, mais il existe des sites exceptionnels comme Leptis Magna, ruines romaines stupéfiantes, avec ses arcs de triomphe, ses colonnes, ses forums, ses agoras. Un excellent travail de reconstitution a été réalisé par les archéologues avec cette vue magnifique sur la campagne environnante et la mer.

Sabratha, située plus à l'ouest de Tripoli, avec des ruines remontant au premier et deuxième siècles avant Jésus Christ, est également remarquable.

Enfin, notre séjour se terminera par une escapade vers Ghadames, surnommée la perle du désert ou la porte du Sahara, oasis aux confins de la Libye, de l'Algérie et de la Tunisie, avec l'architecture particulière de ses toits en arc pointu et en fer à cheval, endroit remarquable avec sa place de la Liberté et l'ancienne mosquée, construite au début de l'Islam sur une superficie de 5000 m², que nous n'avons pas eu la possibilité de visiter, n'étant pas musulmans. A midi, une excellente chorba et un superbe ragout de mouton nous ont été servis arrosés évidemment par du coca-cola. En fin d'après-midi, nous avons rejoint le désert avec un remarquable coucher de soleil sur ces dunes étonnantes, que certains gravirent non sans mettre leurs muscles à dure épreuve, et, comme il se doit, une rencontre avec Touaregs (le peuple le plus vêtu du monde à part l'ouverture pour les yeux) et chameaux, certes "folklorique" mais de belle allure cependant.

Au total, nous garderons un excellent souvenir de ce voyage en Libye et sur le plan professionnel et sur le plan touristique.

Michel Costagliola
Coordinateur scientifique des activités de l'MBC