УДК 616-001.4-089.819.84; 616-003.93

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ТЕЧЕНИЯ ФАЗЫ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ РАНЫ, ЗАШИТОЙ С ПОМОЩЬЮ НОВОГО БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ШОВНОГО МАТЕРИАЛА

Петрова М.Б., Мохов Е.М., Жеребченко А.В.

ГБОУ ВПО «Тверская государственная медицинская академия» Минздрава России, Тверь, e-mail: pmargo-2612@mail.ru

В эксперименте изучено влияние новой биорезорбируемой биологически активной (антимикробной) нити на течение раневого процесса в полнослойных линейных ранах кожи. Объектом исследования послужили 60 белых нелинейных крыс-самцов средней массой 145 ± 3,5 грамма. Животным наносили раны кожи и зашивали их новым антимикробным или инертным в биологическом отношении (контроль) биорезорбируемыми шовными материалами. Спустя 6, 12 и 24 часа с поверхности ран путем взятия мазков-отпечатков получали раневой экссудат и проводили его цитологическое исследование. Использование нового шовного материала активизировало течение фазы воспаления раневого процесса. Это проявлялось ускорением выселения нейтрофилов и макрофагов из кровеносного русла в область повреждения, ранним появлением макрофагов и повышением их функциональной активности. По данным проведенного исследования, применение нового шовного материала положительно сказывается на ходе раневого процесса, что может быть обусловлено действием входящих в состав этого материала антибактериальных препаратов, ускоряющих осуществление воспалительной реакции тканей в области экспериментальной раны.

Ключевые слова: раневой процесс, биологически активные шовные материалы, биорезорбируемый антимикробный шовный материал

MORPHOLOGICAL ASSESMENT DURING THE PHASE OF INFLAMMATION IN HEALING EXPERIMENTAL WOUNDS ARE SEWN USING A NEW BIOLOGICALLY ACTIVE SUTURE

Petrova M.B., Mokhov E.M., Zherebchenko A.V.

Tver State Medical Academy, Tver, e-mail: pmargo-2612@mail.ru

The experiment studied the effect of the new bioresorbable biologically active (antimicrobial) thread on the wound process in linear skin wounds. The object of the study were 60 white male rats nonlinear average weight 145 ± 3,5 grams. Animal applied to skin the wound and sutured their new antimicrobial inert or biologically (control) bioresorbable sutures. After 6, 12 and 24 hours from the surface wounds by taking impression smears prepared wound exudate and conducted its cytology. Using the new suture intensified during the inflammatory phase of wound healing. This became apparent acceleration eviction of neutrophils and macrophages from the bloodstream into the damaged area, the early appearance of macrophages and increase their functional activity. According to studies conducted by applying a new suture positive effect on the course of wound healing process that may be due to the action of members of the material of antibacterial agents that accelerate the implementation of the inflammatory response in tissues of experimental wounds.

Keywords: wound's process, biologicalactive sutural materials, bioreabsorbable antibacterial sutural material

Известно, что характер и полнота восстановительного процесса в различных тканях и органах животных и человека определяются влиянием внешней и внутренней среды организма. Предупреждение вторичного инфицирования области травмы или хирургического вмешательства является одним из необходимых условий нормального течения репаративного процесса ран поверхностных слоев кожи [3, 5].

Основным способом соединения краев раны является наложение шва с помощью нитей, причем свойства использующегося с этой целью шовного материала не могут не влиять на характер морфологических изменений в зоне соединяемых тканевых структур [1, 10].

Положительные результаты использования местной антибактериальной терапии при инфекции области хирургического вмешательства послужили основанием для разработки хирургических шовных материалов, обладающих биологической (главным образом, антимикробной) активностью [2].

В настоящее время актуальным и перспективным является исследование применения хирургических нитей, оказывающих на окружающие их ткани организма антибактериальное, протеолитическое, гемостатическое, цитостатическое или местное обезболивающее действие [8, 10].

Целью нашего исследования послужило изучение влияния нового биорезорбируемого антимикробного шовного материала (двух его разновидностей) на процесс заживления экспериментальных ран кожи.

Материал и методы исследования

Материалом для исследования послужили 60 самцов белых нелинейных крыс средней массой 145 ± 3,5 грамма, на которых проводилось изучение

репаративных процессов в ране в фазу воспаления. Все эксперименты проводились в операционной вивария ТГМА. Исследования выполнены в соответствии с международными рекомендациями с соблюдением принципов гуманного отношения к лабораторным животным [7].

Исследовались лабораторные образцы биорезорбируемых биологически активных (антимикробных) нитей, полученные во Всероссийском научно-исследовательском институте синтетических волокон (ФГУП ВНИИСВ).

В зависимости от вида используемого шовного материала в ходе эксперимента животные были разделены на 3 серии (по 20 особей в каждой): 1 серия (контроль) – ИБН (интактная биорезорбируемая нить); 2 серия – АБН 1 (антимикробная биорезорбируемая нить, содержащая препарат из группы антисептиков); 3 серия – АБН 2 (антимикробная биорезорбируемая нить, содержащая препарат из группы антибиотиков).

Эксперименты проводились под эфирным наркозом после предварительной подготовки операционного поля. На спине животного параллельно позвоночнику с определенной стороны (как правило, слева) формировали линейную рану длиной 5 см на глубину кожи и подкожной клетчатки. Края раны сшивали внутрикожным непрерывным швом с помощью исследуемых нитей. Спустя 6, 12 и 24 часа с поверхности ран получали раневой экссудат путем взятия мазков-отпечатков по методу М.П. Покровской и М.С. Макарова. Отпечатки окрашивали по Романовскому и подвергали цитологическому анализу под световым микроскопом с использованием объектива х40, х90 [6].

Результаты исследования и их обсуждение

Изучение мазков-отпечатков дало возможность выявить количественный и качественный состав клеточных элементов раневого экссудата у животных всех экспериментальных серий.

В цитограммах животных контрольной серии через 6 часов после операции наблюдалась характерная реакция выселения клеточных элементов, среди которых преобладали нейтрофильные лейкоциты, их количество составило 124,63 ± 6,4 в 10 полях зрения (таблица). Нейтрофилы имели четкие контуры с хорошо сегментированным ядром, состоящим из 3–6 фрагментов. Клетки в поле зрения располагались неравномерно, группами. Обнаруживались единичные лимфоциты с большим округлым ядром и узким ободком цитоплазмы, макрофаги не определялись.

Количество и диаметр ядер клеток раневого экссудата (в 10 полях зрения) в послеоперационном периоде (M ± m)

	6 часов				12 часов				24 часа			
	Нейтрофилы		Макрофаги		Нейтрофилы		Макрофаги		Нейтрофилы		Макрофаги	
	количество	Ø, мкм	количество	Ø, мкм	количество	Ø, мкм	количество	Ø, мкм	количество	Ø, мкм	количество	Ø, мкм
Контроль (ИБН)	124,63 ± 6,40	10,42 ± 0,4	0	0	256,38 ± 7,12	11,91 ± 0,6	9,0 ± 1,97	13,0 ± 0,1	73,1 ± 8,07	12,05 ± 0,1	11,45 ± 2,11	15,19 ± 0,4
АБН 1	136,25* ± 4,76	11,0* ± 0,7	11,9 ± 3,14	13,29 ± 0,3	271,7# ± 6,93	12,08# ± 0,1	24,75# ± 7,23	25,24# ± 0,4	0	0	0	0
АБН 2	168,5* ± 10,11	11,64* ± 0,9	13,05 ± 2,60	13,44 ± 0,2	332,4# ± 7,85	12,54# ± 0,9	25,3# ± 4,80	26,92* ± 0,4	0	0	0	0

Примечания: * – $p < 0,01$ (по сравнению с контролем);
– $p < 0,05$ (по сравнению с контролем).

Уже в этот срок выявлялись существенные отличия цитологического состава экссудата животных остальных серий.

В отпечатках с поверхности ран животных второй серии количество нейтрофильных лейкоцитов составило 136,25 ± 4,8, что оказалось достоверно выше ($p < 0,05$) значения в контрольной серии 124,63 ± 6,4 (таблица). Клетки, как правило, формировали отдельные скопления, четкая сегментация ядер отсутствовала, что может свидетельствовать о наличии в них дегенеративных изменений. В этот период отмечено появление макрофагов (11,9 ± 3,14 в 10 полях зрения), имеющих в цитоплазме большое количество пищеварительных вакуолей.

В третьей серии животных количество нейтрофильных лейкоцитов составляло 168,5 ± 10,11 в 10 полях зрения и было достоверно больше значения в контрольной серии ($p < 0,01$) того же срока наблюдения. Ядра нейтрофилов были увеличены в диаметре, утрачивали четкую сегментацию, функционально характеризовались высокой фагоцитарной активностью. В цитоплазме фагоцитирующих макрофагов определялись пищеварительные вакуоли с микробными телами на разных стадиях переваривания.

В следующий срок исследования, через 12 часов после нанесения травмы, выявились некоторые цитологические отличия у животных во всех трех сериях по сравнению с предыдущим сроком наблюдения.

В цитограммах животных контрольной серии количество выселившихся нейтрофильных лейкоцитов значительно возрос-

ло и составило 256,38 ± 7,12 в 10 полях зрения. В отпечатках нейтрофилы располагались достаточно равномерно. Диаметр их ядер имел большие значения по сравнению с предыдущим сроком наблюдения (11,91 ± 0,7 мкм). Наблюдалось явление физиологической дегенерации нейтрофилов, выражающееся в их гомогенизации, фрагментации и пикнозе ядер. Отмечалась типичная реакция фазы воспаления регенерации – появление относительно небольших (диаметр 13,0 ± 0,1 мкм) отдельно расположенных макрофагов. Клетки обнаруживали активную фагоцитарную деятельность, микроорганизмы в их пищеварительных вакуолях имели нечеткие контуры.

В реакции выселения клеток у животных второй и третьей серий, в тот же период наблюдения существенных цитологических отличий выявлено не было. Наблюдалось нарастание выселения клеточных элементов, которые располагались большими скоплениями. В цитограммах крыс второй и третьей серий обнаруживался активный диапедез клеток крови, что проявлялось количественным превалированием нейтрофилов по сравнению с аналогичным сроком контрольной серии (271,7 ± 6,9 и 332,4 ± 7,8 против 256,38 ± 7,1 в 10 полях зрения соответственно). Количество нейтрофильных лейкоцитов в цитограммах животных второй и третьей серий было достоверно больше ($p<0,05$) в сравнении с контрольной серией данного срока наблюдения. Подавляющее большинство клеток было увеличено в размерах, их структура характеризовалась нарушением ядерной сегментации, в результате ядро становилось рыхлым, гомогенным. Большинство нейтрофильных лейкоцитов находилось на различных стадиях физиологической дегенерации. В этот период проявлялась выраженная активность макрофагов, заключающаяся в увеличении их количества в экссудате по сравнению с контрольной серией. Диаметр ядер макрофагов был увеличен почти в два раза по сравнению с предыдущим сроком наблюдения в этой же серии животных.

Через 24 часа после операции получить мазок-отпечаток удалось только у животных контрольной серии, поскольку к этому сроку поверхность ран у крыс других серий была покрыта плотным струпом. В мазках-отпечатках животных контрольной серии количество нейтрофилов сократилось по сравнению с предшествующим сроком данной серии и составило 73,1 ± 8,07 в 10 полях зрения. Макрофагальная реакция еще более усиливалась: размеры макрофагов имели большие значения (15,19 ± 0,5 мкм) по сравнению с предыдущим сроком; возрастало количество вакуолей и фагоцитированных частиц в их цитоплазме.

Заключение

Проведенное исследование показало, что использование антимикробных шовных материалов активизировало течение фазы воспаления раневого процесса. Это проявлялось ускорением выселения нейтрофилов и макрофагов из кровеносного русла в область повреждения, ранним появлением макрофагов и повышением их функциональной активности. О более активном течении процессов экссудации и миграции лейкоцитов из кровеносного русла свидетельствует увеличение их количества в раневом отделяемом уже через 6 часов после нанесения повреждения. По нашему мнению, эта клеточная реакция определяется действием содержащихся в нити антибактериальных препаратов. Ранее был доказан подобный эффект антибиотика доксициклина, входящего в состав поликапроамидной нити [10]. Нейтрофильные лейкоциты, мигрировавшие в область повреждения, запускают каскад реакций клеточных взаимодействий, выделяя комплекс биологически активных веществ (цитокины – TNF-α и IL-1, агрессивные протеазы, свободные радикалы), которые создают благоприятные условия для хемотаксиса, дифференцировки макрофагов и усиления их функциональной активности, активируют фибробласты и эпителиальные клетки [4, 9, 12]. Раннее появление и фагоцитарная активность макрофагов указывают на выраженную лейкоцитарную реакцию, высокие темпы завершения фазы воспаления и перехода ее в фазу пролиферации регенерации [11]. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о положительном влиянии исследуемых шовных материалов на раневой процесс за счет введения в их состав антимикробных препаратов, которые значительно ускоряют осуществление воспалительной реакции в области травмы.

Список литературы

1. Данилов Р.К., Мурзабаев Х.Х., Морфологические основы посттравматической регенерации тканей // Морфология. – 2002. – Т.121. – № 2–3. – С. 45–46.

2. Ефименко Н.А. Профилактика инфекций области хирургического вмешательства в травматологии и ортопедии: использование антибиотиков в костном цементе // Инфекции в хирургии. – 2009. – № 2. – С. 15–17.

3. Заживление гнойных ран в условиях стимуляции препаратами гиалуроновой кислоты / Петрова М.Б. [и др.] // Современные проблемы биохимии и бионанотехнологии. Сборник трудов I Всероссийской интерактивной конференции. – Казань, 2010. – 126 с.

4. Морфологические реакции регенерата кожи в условиях применения цитокинов / М.Б. Петрова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 9. – Ч. 6. – С. 1102–1105.

5. О профилактике инфекционных осложнений в ургентной абдоминальной хирургии / Мохов Е.М. [и др.] // Материалы VI Всероссийской конференции общих хирургов, объединенной с VI Успенскими чтениями; под ред. академика РАМН проф. В.К. Гостищева и проф. Е.М. Мохова. – Тверь: ООО Изд. «Триада», 2010. – С. 50–51.

6. Покровская М.П., Макаров М.С. Цитология раневого экссудата как показатель процесса заживления ран. – М.: Медгиз, 1942. – 37 с.

7. Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных: приказ № 742 от 13 ноября 1984 г.

8. Современные тенденции в создании биологически активных материалов для лечения гнойных ран / Н.А. Ефименко [и др.] // Военно-медицинский журнал. – 2002. – № 1. – С. 48–52.

9. Ультраструктура фибробластов регенерата кожи в условиях использования геля L-цистеина нитрата серебра / М.Б. Петрова [и др.] // Морфология. – 2013. – № 5. – 105 с.

10. Экспериментальная разработка новых хирургических шовных материалов с комплексной биологической активностью / Е.М. Мохов [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – т. 153. – № 3. – С. 391–396.

11. Mechanisms of epithelial fusions and repair / Jacinto A. et al. // Nat. Cell Biol. – 2001. – Vol. 3. – P. 117–123.

12. Reparative histogenesis of skin: Reaction on the application of L-cysteine of argentum nitrate gel / M.B. Petrova [et al.] // Open Journal of Regenerative Medicine. – 2012. – Vol.1. – № 1. – P. 25–28.

References

1. Danilov R.K., Murzabaev H.H. Morphological basis of posttraumatic regeneration of tissues // Morphology. 2002, Vol. 121, no. 2–3, pp. 45–46.

2. Efimenko N.A. Prevention of surgical site infections in traumatology and orthopedics: use of antibiotics in the bone cement. // Infection in surgery. 2009, no. 2, pp. 15–17.

3. Healing wounds festering under stimulation with hyaluronic acid / Petrova M.B. [et al.] // Modern problems of biochemistry and bionanotechnology. Proceedings of the I All-Russian interactive conference – Kazan, 2010, pp.126.

4. Reparative histogenesis of skin: Reaction on the application of L-cysteine of argentum nitrate gel / M.B. Petrova [et al.] // Open Journal of Regenerative Medicine. 2012, Vol. 1, no. 1, pp. 25–28.

5. On the prevention of infectious complications in emergency abdominal surgery / E.M. Mokhov [et al.] // Proceedings of the VI All-Russian Conference of general surgeons, combined with V.I. Uspensky readings. Tver. 2010, pp. 50–51.

6. Pokrovskaya M.P., Makarov M.S. Cytology of wound exudate as an indicator wound healing process. M.: Medgiz, 1942, pp. 37.

7. Order no. 742 of 13 November 1984 «On Approval of the Rules of the work using experimental animals».

8. Modern trends in the creation of biologically active material for the treatment of septic wounds / N.A. Efymenko [et al.] // Military Medical Journal. 2002, no. 1, pp. 48–52.

9. Experimental development of new surgical suture material with a complex biological activity / E.M. Mokhov [et al.] // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2012, Vol. 153, no. 3, pp. 391–396.

10. Mechanisms of epithelial fusions and repair / Jacinto A. et al. // Nat. Cell Biol. 2001, Vol. 3, pp. 117–123.

11. Ultrastructure regenerate skin fibroblasts using conditions gel L-cysteine silver nitrate. M.B. / Petrova [et al.] // Morphology. 2013, no. 5, pp. 105.

12. Morphological reactions regenerate skin for applications cytokines. / Petrova M.B [et al.] // Fundamental research. 2013, no. 9, pp. 1102–1105.

Рецензенты:

Сентюрова Л.Г., д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологии, ГБОУ ВПО «Астраханская медицинская академия» Минздрава России, г. Астрахань;

Цай Г.Е., д.м.н., профессор кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии, ГБОУ ВПО «Тверская медицинская академия» Минздрава России, г. Тверь.

Работа поступила в редакцию 30.04.2014