

Гистохимический анализ репаративных процессов в асептических экспериментальных ранах при использовании гидроимпульсной санации и тромбоцитарного концентрата

А.А.ГЛУХОВ, С.Н.СЕМЕНОВ, Н.Т.АЛЕКСЕЕВА, А.П.ОСТРОУШКО

Histochemical analysis of the reparative processes in the aseptic experimental wounds under hydroimpulse renovation and the platelet concentrate usage

A.A.GLUKHOV, S.N.SEMENOV, N.T.ALEXEEVA, A.P.OSTROUSHKO

НИИ хирургической инфекции Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н.Бурденко

С помощью гистохимических методов проводилась оценка эффективности применения гидроимпульсной санации и обогащенной тромбоцитами аутоплазмы крови (тромбоцитарного концентрата) при лечении асептических ран. Установлено, что лечение с помощью обогащенной тромбоцитами аутоплазмы крови оказывает стимулирующее воздействие на регенерацию эпидермиса, что проявляется не только сокращением сроков реэпителизации раневого дефекта, но и ускорением стратификации, характерной для интактного эпителия. Активизация метаболических процессов, что проявляется при данном методе лечения увеличением содержания РНК и SH-групп, обеспечивает мобилизацию клеток росткового слоя эпидермиса и повышение сопротивляемости тканей к повреждающему фактору.
Ключевые слова: асептическая рана, гидроимпульсная санация, тромбоцитарный концентрат

By using of histochemical methods, the effectiveness of hydroimpulse sanation and enriched by platelets blood autoplasm (platelet concentrate) application in the treatment of aseptic wounds was evaluated. Established that treatment with fortified by platelets blood autoplasm stimulates the regeneration of the epidermis, which is manifested not only reduction of wound defect reepithelization terms, but also accelerated the stratification characteristic of the intact epithelium. Revitalization of the metabolic processes, which is manifested in this method of treatment by increase of RNA and SH-groups content, mobilizes sprout layer cells of the epidermis and the resilience of tissues to the damaging factor.

Key words: aseptic wound, hydroimpulse renovation, platelet concentrate

Эффективность лечения ран определяется качественными и количественными характеристиками, которые включают в себя оценку функционально активного эпителиального покрова и глубже лежащих тканей, состоятельность и сроки формирования рубца, особенности и продолжительность периода заживления [1, 2].

В связи с этим, большое значение при проведении количественного и структурного анализа процессов заживления приобретают гистохимические исследования метаболических процессов в клетках росткового слоя эпидермиса.

Целью настоящей работы явилось исследование динамики изменений распределения и содержания РНК и сульфгидрильных групп (SH-групп) в пределах росткового слоя эпидермиса при естественном заживлении экспериментальных асептических ран, а также после применения гидроимпульсной санации (ГИС) и тромбоцитарного концентрата (ТК).

Материалы и методы

Исследования выполнены на белых крысах самцах массой 250-300 г. Животным под наркозом на передней поверхности бедра в асептических условиях наносили стандартную линейную рану длиной 1,0

см и глубиной 0,5 см. Выделены три экспериментальные группы: контрольная и две опытные. В первой опытной группе (48 животных) при лечении ран использовали ГИС с помощью оригинального модифицированного устройства «УГОР-01м», позволяющего формировать микродисперсный поток жидкости. Для обработки ран использовали 0,9% раствор хлорида натрия. Во второй опытной группе (48 животных) при лечении ран применяли ТК с концентрацией тромбоцитов не менее 1 млн/мкл. Лечение ран у животных контрольной группы (48 крыс) не проводили. На 1, 3, 5 и 7-е сутки от начала опыта осуществляли забор материала для морфологического исследования.

Все исследования проводили со строгим соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (г. Страсбург, Франция, 1986) и согласно правилам лабораторной практики Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.).

Для гистохимического анализа репаративных процессов в эпидермисе в области раневого дефекта определяли показатели метаболической активности клеток – содержание РНК и сульфгидрильных групп белков.

Для выявления РНК использовали методику с Азуром В по S. Shea (1970), которая обеспечивает селективное выявление ядрышковой и цитоплазматической РНК и дает возможность количественной обработки микропрепаратов. Отличительная особенность применяемой методики состояла в блокировании потенциально реакционно-способных аминогрупп белка путем ацетилирования в 100% уксусном ангидриде при комнатной температуре, а также дифференцировке в третичном бутиловом спирте для удаления молекул Азура В, не связанных с РНК.

Для оценки процессов созревания эпидермиса проводили выявление сульфгидрильных групп феррицианидным методом, так как с активностью SH-групп связаны основные процессы жизнедеятельности – проницаемость мембран, энергетический обмен, формирование вторичной и третичной структур белковых молекул, процессы кератинизации. Наряду с визуальной топохимической характеристикой РНК и SH-групп проводилась количественная цитофотометрическая оценка их содержания в клетках базального и шиповатого слоев эпидермиса в области раневого дефекта с помощью анализатора изображений «Видеотест».

Для анализа данных использовались статистические пакеты Statistica 6.0 фирмы StatSoft и S-PLUS 7.0 PROFESSIONAL фирмы MathSoft. Для статистической обработки данных применяли одномерный и многомерный дисперсионный анализ, как наиболее адекватный с математической точки зрения, исходя из ограниченных объемов анализируемых экспериментальных групп животных ($n < 30$) [3, 4]. Использовались дисперсионный анализ (ANOVA и MANOVA) с поправкой Даннетта, критерий Шеффе (как более строгий) и двухсторонний критерий Стьюдента с поправкой Ньюмана-Кейлса. В качестве критериальной статистики для обеспечения большей точности оценок использовалась верхняя область 5% F-распределения, как более жесткая по сравнению с t-распределением.

Необходимость использования дисперсионного анализа обусловлена тем, что при применении традиционного для биомедицинских работ критерия Стьюдента (t-критерий) при попарном сравнении выборок возникает прогрессивно нарастающая ошибка. Практически это означает, что при выбранном 5% уровне значимости вероятность отклонения верной гипотезы равна 5% в каждом из сравнений. При серии сравнений суммарная вероятность ошибки значительно превышает заранее определенный пороговый уровень. Кроме того, применение указанных методик позволяет не только установить факт наличия различий между группами, но и в условиях сравнения ряда признаков выявить, какие именно из них вносят статистически значимые эффекты.

Результаты и их обсуждение

Анализ гистохимических изменений у животных контрольной группы на 1-е сутки после моделирова-

ния раны в пределах росткового слоя Мальпиги, который включает в себя базальный и шиповатый слои, дает возможность оценить процессы регенерации в эпидермисе. Визуальная оценка содержания РНК в цитоплазме клеток эпидермиса позволяет отметить, что в большинстве клеток цитоплазма прокрашивается равномерно интенсивно. Встречаются клетки, в которых на фоне равномерного прокрашивания цитоплазмы определяются гранулы, размещенные вблизи ядерной мембраны или по периферии цитоплазмы. Топохимия РНК имеет особенности в пределах слоев эпидермиса – более выраженная реакция характерна для базального и шиповатого слоев, что подтверждает функциональные особенности этих клеток.

По данным микрофотометрии средняя оптическая плотность РНК в клетках базального и шиповатого слоев составила $0,27 \pm 0,06$ усл. ед.

Определение SH-групп в пределах эпидермиса показало разнообразие картины их распределения на уровне различных слоев. В пределах базального и шиповатого слоев не обнаруживаются значительных вариаций реакций смежных клеток. В вышележащих слоях определяется окрашивание плазматических и, в меньшей степени, ядерных мембран. Поверхностные слои – блестящий и роговой – содержат значительное количество сульфгидрильных групп, на что указывает более интенсивное отложение продукта реакции в поверхностных слоях. Характерна более высокая реакционная способность поверхностных клеток морфологически неизменного эпителиального пласта по сравнению с эпидермисом вблизи раневого дефекта. Определение средней оптической плотности выявленных SH-групп в цитоплазме клеток росткового слоя с помощью анализатора «Видеотест», позволило установить низкий уровень этой реакции ($0,27 \pm 0,06$), что соответствует первой фазе раневого процесса – травматического воспаления [5]; это связано с преобладанием на данном сроке наблюдения компонентов повреждения тканей [6].

На 3-и сутки у животных контрольной группы отмечается пролиферация эпителиальных клеток, что обуславливает изменение гистохимических показателей. Оценка внутриклеточного распределения РНК показывает, что сохраняется равномерно интенсивная базофилия цитоплазмы и лишь в отдельных клетках отмечается парануклеарная локализация базофильного материала. Средняя оптическая плотность РНК в клетках базального и шиповатого слоев составляет $0,29 \pm 0,07$ усл. ед., что достоверно ($p < 0,05$) превышает уровень предыдущего экспериментального срока.

Качественная и количественная оценка реакции выявления сульфгидрильных групп в пределах слоев эпидермиса в области раневого дефекта не позволила выявить особенности их содержания и распределения по сравнению с контрольной группой, что сочетается с сохранением уровня среднего значения оптической плотности.

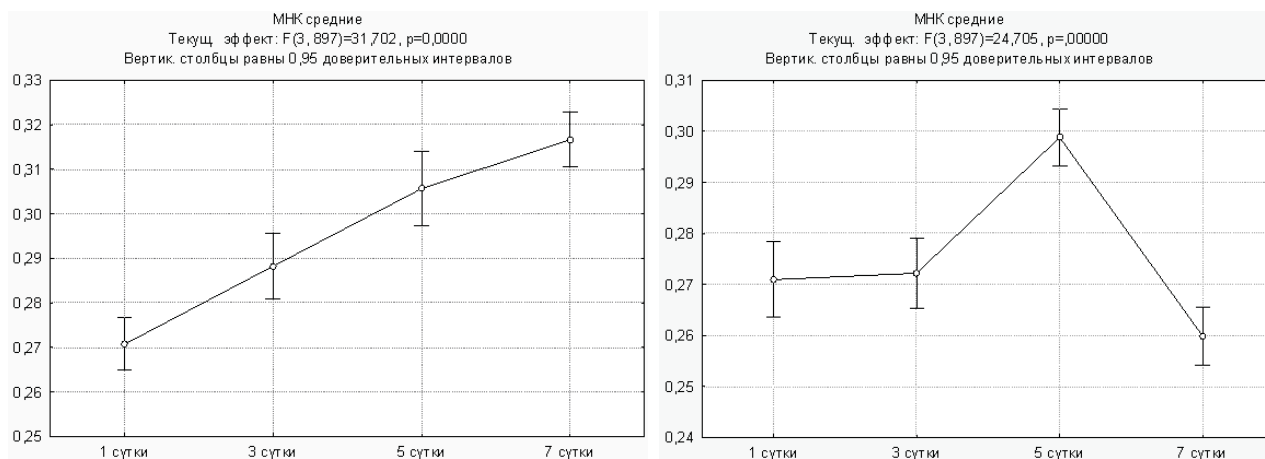


Рис. 1. Динамика изменений содержания ($M \pm 1.96 \delta$) РНК (А) и SH-групп (Б) в клетках базального и шиповатого слоев эпидермиса в процессе заживления у животных контрольной группы.

На 5-е сутки морфологические изменения в пределах раны характеризуются увеличением толщины и протяженности эпителиального пласта, покрывающего раневой дефект. Эпителизация характеризуется интенсификацией метаболических процессов, что подтверждается количественными оценками – увеличивается среднее значение оптической плотности РНК ($0,31 \pm 0,07$ усл. ед., $p < 0,05$).

На активизацию процессов кератинизации указывает повышение среднего значения оптической плотности сульфгидрильных групп в пределах росткового слоя ($0,30 \pm 0,05$ усл. ед., $p < 0,05$) по сравнению с 3-ми сутками после моделирования раны. Визуально определяется возрастание реакционной способности SH-групп в поверхностных слоях эпидермиса, что определяет созревание эпителиального пласта.

На 7-е сутки в препаратах контрольной группы толщина эпидермиса приближается к уровню интактных тканей. В герминативных слоях наблюдается активизация синтетических процессов, что проявляется увеличением уровня РНК ($0,32 \pm 0,06$ усл. ед., $p < 0,05$), на фоне существенного снижения оптической плотности SH-групп ($0,26 \pm 0,05$ усл. ед., $p < 0,05$) при относительно низком градиенте распределения интенсивности реакции в направлении от базального слоя к поверхности. Это косвенно указывает на незавершенность процессов стратификации эпидермиса.

Таким образом, заживление эпителиального пласта у животных контрольной группы в первые семь суток характеризуется прогрессирующим увеличением содержания РНК в клетках базального и шиповатого слоев эпидермиса (рис. 1А). Неоднозначная динамика реакционной способности SH-групп в герминативных слоях эпителиального пласта (рис. 1Б) с достоверным увеличением их содержания на 5-е сутки отражает активацию процессов дифференцировки эпителиальных клеток с последующим смещением кератинизации эпителия в поверхностные слои клеток. Поиски методов, оказывающих положительное влияние на процессы заживления, связаны с определенными

трудностями, так как необходимо создать оптимальные условия для пролиферативно-репаративных процессов в организме, а любое внешнее воздействие имеет отрицательную составляющую. В комплексной оценке методов лечения ран необходим глубокий дифференцированный подход с целью минимизации возможного дисбаланса в процессе заживления.

На 1-е сутки после лечения ГИС клетки эпидермиса в области раневого дефекта при выявлении цитоплазматической РНК характеризовались умеренной базофилией с более выраженной реакцией в пределах базального и шиповатого слоев, где среднее значение оптической плотности составило $0,28 \pm 0,05$ усл. ед., незначительно отличаясь от контрольных значений. Выявление гистохимических особенностей функциональных групп белков показало, что краевая зона раны характеризуется низким уровнем средней оптической плотности SH-групп в области росткового слоя ($0,27 \pm 0,06$ усл. ед.), не отличающейся от контрольного уровня.

На 3-и сутки после лечения отмечается снижение синтетических процессов в пределах эпителиального пласта, формирующегося в области раневого дефекта, по сравнению с контрольной группой, о чем свидетельствует невысокий уровень гистохимических показателей – среднее значение оптической плотности РНК составляет $0,28 \pm 0,07$ усл. ед. Среднее значение оптической плотности при выявлении SH-групп составляет $0,28 \pm 0,06$ усл. ед., что не превышает контрольный уровень.

5-е сутки экспериментального исследования характеризуются замедлением процессов регенерации, о чем свидетельствует снижение величины оптической плотности РНК ($0,30 \pm 0,08$ усл. ед., $p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. Скорость созревания эпидермиса понижена, на что указывает низкая средняя оптическая плотность SH-групп в пределах росткового слоя ($0,29 \pm 0,07$ усл. ед.).

На 7-е сутки после проведения ГИС процессы регенерации характеризуются наличием вариальности

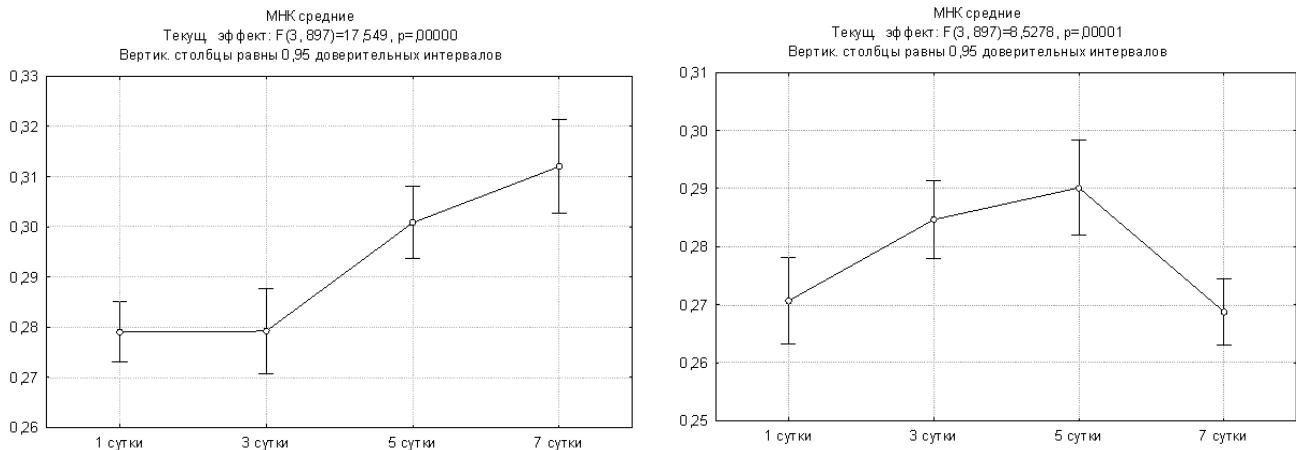


Рис. 2. Динамика изменений содержания ($M \pm 1.96\sigma$) РНК (А) и SH-групп (Б) в клетках базального и шиповатого слоев эпидермиса в процессе заживления у животных при применении гидроимпульсной санации (первая опытная группа).

базофилии цитоплазмы в слоях эпидермиса, покрывающего раневой дефект. Сохраняется большая интенсивность реакции в пределах росткового слоя по сравнению с вышележащими слоями. Базофилия сильнее выражена в перинуклеарной зоне, в некоторых клетках окрашивание преобладает под плазматической мембраной. Среднее значение оптической плотности РНК составляет $0,31 \pm 0,06$ усл. ед. На фоне происходящей реэпителизации раны процессы формирования слоев эпидермиса замедлены, что подтверждается невысоким уровнем средней оптической плотности сульфгидрильных групп ($0,27 \pm 0,05$ усл. ед.). Таким образом, результаты количественной оценки содержания РНК и SH-групп, представленные в обобщенном виде на рисунке 2 показали, что их содержание в клетках ростковых слоев эпидермиса при использовании ГИС ран практически не отличается от значений контрольной группы.

На первые сутки после применения ТК наблюдались гистохимические изменения, которые выражались в повышении среднего значения оптической плотности ($0,31 \pm 0,08$ усл. ед.) по сравнению с контрольным уровнем ($p < 0,01$). Базофилия относительно равномерно распределена в перинуклеарной зоне, но встречаются клетки, содержащие гранулярный базофильный материал. Величина средней оптической плотности SH-групп ($0,29 \pm 0,05$ усл. ед.) также превысила контрольный уровень ($p < 0,01$), что может рассматриваться как показатель различной интенсивности процессов обмена на фоне применения ТК.

На 3-и сутки в результате перестройки и повышения пролиферативной активности эпителий начинает восстанавливать целостность кожных покровов от периферии к центру; эти процессы характеризуются усилением гистохимических реакций. Среднее значение оптической плотности РНК превышает все предыдущие экспериментальные показатели ($0,33 \pm 0,05$ усл. ед.). Наряду с этим, уровень оптической плотности SH-групп сохраняется на прежнем уровне ($0,28 \pm 0,06$ усл. ед.).

На 5-е сутки после применения ТК усиливаются процессы регенерации эпителия. Края раны сближаются за счет закрытия эпидермисом раневого дефекта. Гистохимические изменения подтверждают, что в результате перестройки клетки росткового слоя оказываются в состоянии осуществить потенцию роста и участвовать в восполнении дефекта тканей: среднее значение оптической плотности РНК составляет $0,35 \pm 0,06$ усл. ед., достигая максимального уровня на протяжении всего эксперимента.

Для данной экспериментальной группы характерно также наиболее значительное содержание SH-групп, среднее значение оптической плотности которых составляет $0,39 \pm 0,08$ усл. ед. Визуальный анализ свидетельствует о том, что возрастание реакционной способности сульфгидрильных групп идет по направлению к поверхности, что определяется процессами стратификации эпидермиса.

На 7-е сутки после применения ТК отмечается усиление метаболических процессов, что приводит к полной эпидермизации почти у всех животных. Толщина слоев приближается к уровню интактного эпидермиса. Среднее значение оптической плотности РНК в клетках базального и шиповатого слоев составляет $0,35 \pm 0,07$ усл. ед., что достоверно превышает аналогичный показатель у животных контрольной группы.

Выявление содержания и распределения сульфгидрильных групп в клетках базального и шиповатого слоев показало, что среднее значение оптической плотности SH-групп также превышает контрольные значения, но по сравнению с предыдущим экспериментальным сроком наметилась тенденция к снижению, что указывает на стабилизацию процессов кератинизации с ее смещением к поверхности. В соответствии с этим наблюдается восходящий градиент распределения интенсивности реакции от базального слоя к поверхностному.

Анализ результатов определения содержания РНК и SH-групп, в обобщенном виде представленных на рисунке 3, показал, что при применении ТК в ле-

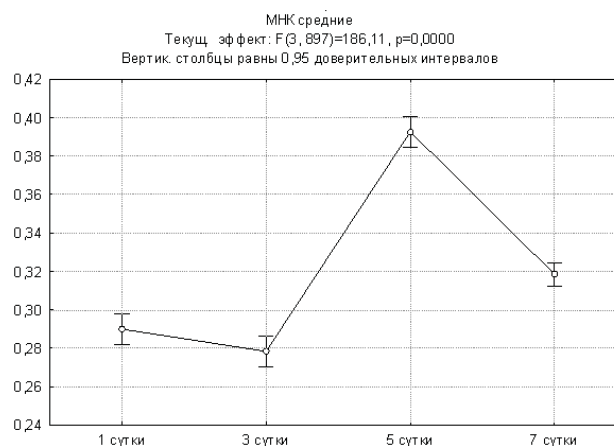
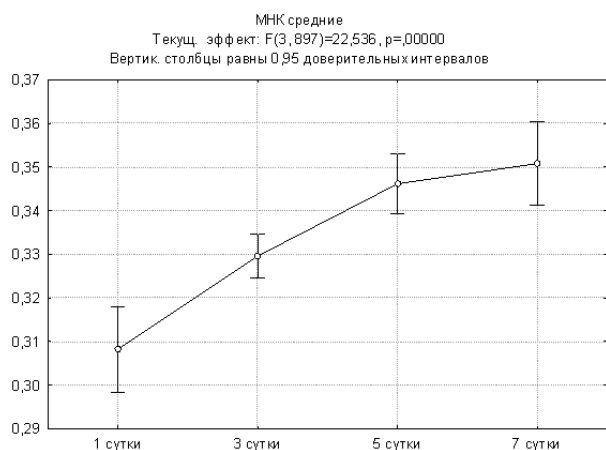


Рис. 3. Динамика изменений содержания ($M \pm 1.96\delta$) РНК (А) и SH-групп (Б) в клетках базального и шиповатого слоев эпидермиса в процессе заживления у животных при применении ОТАПК (вторая опытная группа).

чении асептических ран мягких тканей сохраняется динамика, сопутствовавшая процессам заживления у животных контрольной группы: прогрессирующее накопление РНК в процессе заживления, повышение содержания SH-групп на 5-е сутки с последующим снижением на 7-е сутки эксперимента.

Выводы

1. Для достижения максимальной эффективности лечения ран и активизации репаративных процессов следует подходить дифференцированно к выбору метода санации раневой поверхности, в зависимости от объема гнойно-некротических тканей и степени микробного загрязнения; не использовать без необходимости эффективные, но травматичные методы воздействия.

Список литературы

1. Глухов А.А., Остроушко А.П., Семенов С.Н., Алексеева Н.Т. и др. Структурно-функциональные особенности заживления асептических ран мягких тканей при использовании обогащенной тромбоцитами плазмы крови. Вестник экспериментальной и клинической хирургии 2010; 3: 3: 210-213.
2. Мяделец О. Д. Морфофункциональная дерматология. М.: Медлит 2006; 752.

Информация об авторах

1. Глухов Александр Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей хирургии, директор научно-исследовательского института хирургической инфекции Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н.Бурденко; e-mail: surgery-v@yandex.ru
2. Семенов Сергей Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной анатомии человека Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н.Бурденко; e-mail: sns7250@rambler.ru

2. При лечении ран, характеризующихся минимальным некротическим компонентом и низким уровнем бактериального обсеменения, применение метода гидроимпульсной санации, отличающегося высокой механической очищающей способностью нецелесообразно из-за повышенной травматизации тканей.

3. Наибольшая эффективность лечения асептических ран, в сравнении с контрольной и первой опытной группами, наблюдается при использовании тромбоцитарного концентрата. Данный метод лечения оказывает стимулирующее воздействие на регенерацию эпидермиса, что проявляется не только сокращением сроков реэпителизации раневого дефекта, но и ускорением стратификации, характерной для интактного эпителия.

3. Орлов А.И. Прикладная статистика. Учебник. М.: Экзамен 2004; 656.
4. Поллард Дж. Справочник по вычислительным методам статистики М.: Финансы и статистика 1982; 344.
5. Серов В.В. Соединительная ткань: функциональная морфология и общая патология. М. Медицина 1981; 312.
6. Чернух А.М. Воспаление М. Медицина 1979; 448.

Поступила 19.09.2010 г.

3. Алексеева Наталия Тимофеевна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры нормальной анатомии человека Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н.Бурденко; e-mail: sns7250@rambler.ru
4. Остроушко Антон Петрович – заместитель директора научно-исследовательского института хирургической инфекции Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н.Бурденко по инновационным проектам; e-mail: 516753@gmail.com