© А.Б.Ларичев, В.К.Шишло, А.В.Лисовский, М.М.Рябов, 2014
УДК 616-001.4-003.93

А.Б.Ларичев[1], В.К.Шишло[2], А.В.Лисовский[3] и М.М.Рябов[1]

ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ АСЕПТИЧЕСКОЙ РАНЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ПОДГОТОВКИ ОПЕРАЦИОННОГО ПОЛЯ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА

[1] Кафедра общей хирургии (зав. — проф. А.Б.Ларичев), Ярославская государственная медицинская академия; [2] научный отдел клинической лимфологии (зав. — проф. Ю.Е.Выренков), Российская медицинская академия последипломного образования, Москва; [3] хирургическое отделение (зав. — А.В.Лисовский), Военный клинический госпиталь № 1586, г. Ярославль

На белых крысах (n=24) проведено исследование особенности репаративной регенерации после нанесения асептической раны в зависимости от способа профилактики раневой инфекции. Иммуногистохимически установлено, что в отличие от заживления раны после подготовки операционного поля по Гроссиху—Филончикову при использовании с этой целью экзогенного монооксида азота (NO) на протяжении эксперимента наблюдается статистически значимое увеличение (к 7-м суткам в 2 раза) количества эндотелиоцитов. К этому же сроку суммарная протяжённость микрососудистого русла также двукратно увеличивается. Криофрактографическая идентификация кавеол на сколах эндотелиоцитов свидетельствует о повышении плотности расположения плазмолеммальных пузырьков в эндотелии на 6,9%. Кроме того, в условиях NO-обработки значимо возрастает пролиферативная активность клеток базального слоя эпидермиса кожи, которая достигает максимума к 3-м суткам заживления раны и сохраняется на высоком уровне до конца исследования. Эти результаты указывают на позитивное влияние экзогенного NO на течение раневого процесса.

Ключевые слова: *асептическая рана, раневой процесс, обработка NO, эндотелий*

Позитивное влияние экзогенного монооксида азота (NO) на течение осложнённого раневого процесса послужило основанием для расширения спектра его использования, в том числе с целью профилактики послеоперационной раневой инфекции и при лечении ран огнестрельного происхождения [7, 11]. Вместе с тем, многочисленные публикации содержат настойчивые призывы к его потенцированию средствами типа антиоксидантов, фотодинамического воздействия, антибиотиков [5, 9]. В этой связи практически важным становится объективная доказательность целебных свойств экзогенного NO в превентивной хирургии. Комплексная морфологическая оценка особенностей развития раневого процесса в подобных условиях позволяет получить аргументированные ответы на вопросы о патогенетической целесообразности использования тех или иных средств в лечении асептических ран [3, 4, 8]. В связи с этим целью работы явился сравнительный анализ структурной перестройки тканей после нанесения операционной раны при использовании традиционных мер и NO-терапии для профилактики раневой инфекции.

Материал и методы. Исследование выполнено на 24 белых крысах линии Вистар с исходной массой 200–250 г в возрасте от 10 до 12 мес. Эксперимент проведён в соответствии с правилами лабораторной практики (Приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.). Обезболивание осуществляли эндоплевральным введением тиопентал-натрия (1% раствор 1,0 мл/кг массы тела), а также использовали эфирный наркоз, прибегая к передозировке наркотического вещества при выведении животного из эксперимента. Полнослойную рану размером 30×10 мм и глубиной 2–4 мм наносили скальпелем путём рассечения тканей передней брюшной стенки. Исследовали материал, взятый из краёв раны на 1-, 3-, 5-е и 7-е сутки после её нанесения. Сравнивали результаты, полученные в 2 сериях опыта: после подготовки операционного поля по Гроссиху—Филончикову (3-кратная обработка зоны образования раневого дефекта 5% спиртовым раствором йода после сбривания волос сухим способом — I серия) и его обработки NO-содержащим газовым потоком 300 ppm, создаваемым с помощью аппарата Плазон-ВП (Центр высоких технологий при МГТУ им. Н.Э.Баумана, Россия), с экспозицией в пределах 10–15 с на 1 см^2 (II серия).

Сведения об авторах:

Ларичев Андрей Борисович (e-mail: larich-ab@mail.ru), *Рябов Михаил Михайлович* (e-mail: mihail_ryabov@mail.ru), кафедра общей хирургии, Ярославская государственная медицинская академия, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5;

Шишло Владимир Константинович (e-mail: kisa0303@yandex.ru), научный отдел клинической лимфологии, Российская медицинская академия последипломного образования, 125284, Москва, ул. Поликарпова, 10/12;

Лисовский Александр Валерьевич (e-mail: doclife@yandex.ru), хирургическое отделение, Военный клинический госпиталь № 1586 г. Ярославля, 150000, г. Ярославль, ул. Андропова, 3/11

При морфологическом исследовании использовали методику сканирующей электронной микроскопии нативных препаратов с более детальным их изучением методом криофрактографии [1, 6, 10]. Для приготовления препаратов мягкие ткани отмывали от крови с помощью гепаринизированной среды 199, фиксировали перфузией 2,5% раствором глутаральдегида, обрабатывали 1% раствором четырехокиси осьмия и обезвоживали в этаноле восходящей концентрации. Полученные образцы замораживали в жидком азоте и раскалывали. После оттаивания в 96% этаноле препараты высушивали путем перехода через критическую точку в CO_2 и напыляли золотом или платиной. Анализ препаратов проводили в сканирующем электронном микроскопе PSEM–500-х (Philips, Нидерланды) со съемкой на широко- и узкоформатную коммерческую пленку.

При иммуногистохимическом исследовании фиксированные в метакарне (метанол : ингибисол : ледяная уксусная кислота=60:30:10) образцы отмывали в метаноле, хлороформе и заливали в парапласт (Polysciens Inc, США). Полутонкие срезы толщиной от 0,5 до 2 мкм получали с помощью микротома Autocut (Reichert-Jung, Австрия), депарафинировали в толуоле и регидратировали в метаноле нисходящей концентрации и воде. Затем для инактивации эндогенной пероксидазы проводили их обработку 3% перекисью водорода и промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) (0,1 М при pH 7,4) с 0,05% Tween-20. На приготовленные срезы наносили раствор первых моноклональных антител к ядерному антигену пролиферирующих клеток (анти-PCNA, Fremont, США). Для уменьшения их неспецифической сорбции срезы обрабатывали 2% неиммунной сывороткой животного, от которого были получены биотинилированные антитела, и трижды промывали 0,1% раствором бычьего сывороточного альбумина (Reanal, Венгрия) на 0,1 М ФСБ. Затем срезы обрабатывали стрептавидинбиотиновым комплексом, связанным с пероксидазой хрена (Amersham International, Великобритания), и наносили на них хромогенный субстрат, состоящий из 1 части 3% перекиси водорода и 100 частей 0,05% раствора 3,3-диаминобензидина (Serva, ФРГ) на 0,1 М ФСБ. Затем срезы промывали дистиллированной водой, докрашивали метиленовым зеленым, обезвоживали, просветляли в толуоле и заключали в бальзам (Histomouth, Merck, ФРГ).

Полученные препараты изучали на светооптическом уровне с помощью микроскопа Биолам-И (ЛОМО, Россия). Подсчет иммунопозитивных эндотелиоцитов и клеток базального слоя эпидермиса края раны проводили в 10 полях зрения при об.40, ок.6 и вычисляли среднее их количество в 1 поле зрения [6, 10]. Оценку статистической значимости полученных данных проводили по t-критерию Стьюдента и считали значимыми при $P<0,05$.

Результаты исследования. При традиционной профилактике хирургической инфекции иммуногистохимический анализ свидетельствовал о том, что по сравнению с результатами, полученными в 1-е сутки существования раны, в течение 3 сут эксперимента происходило постепенное увеличение числа PCNA-позитивных эндотелиоцитов до 7,62±1,4 клеток ($P<0,05$). В дальнейшем этот показатель возрастал более стремительными темпами до максимума на 7-е сутки заживления раны — 19,7±1,2 клеток ($P<0,05$; *рис. 1, а*).

У животных, которым с превентивной целью проводили обработку операционного поля экзогенным NO, спустя 1 сут с момента нанесения раны количество иммунопозитивных эндотелиоцитов достигало 10,0±1,4. На протяжении следую-

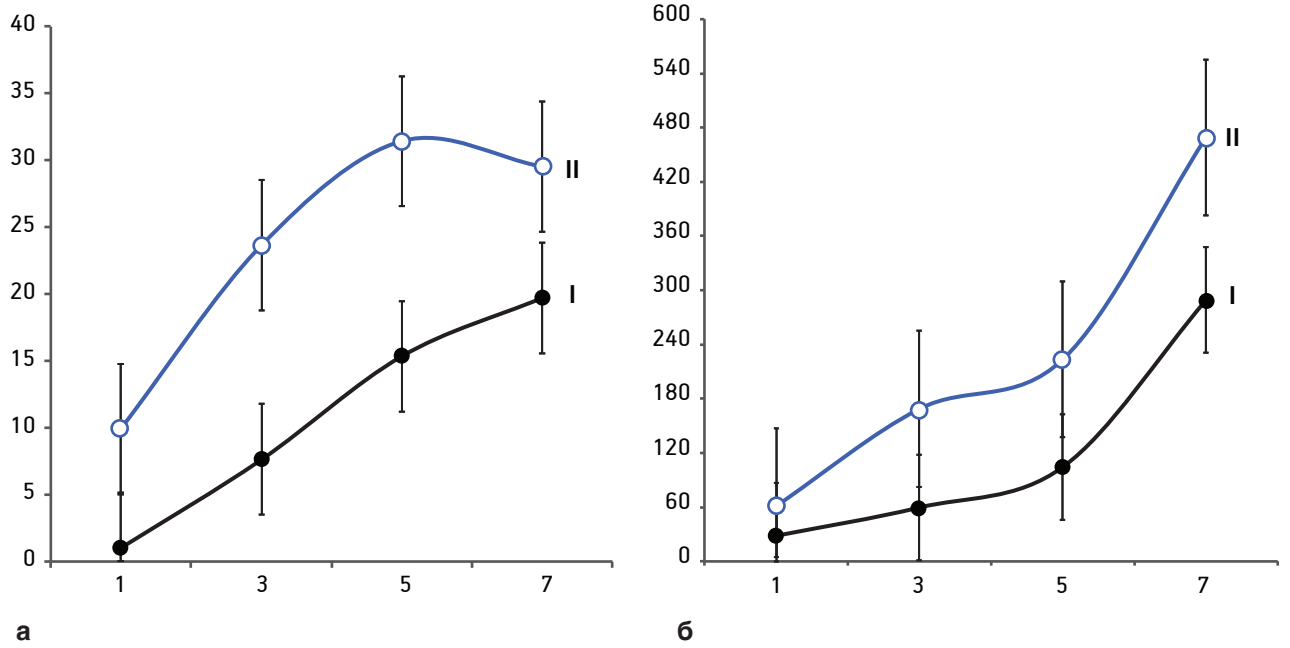

Рис. 1. Пролиферативная активность эндотелия кровеносных микрососудов (а) и динамика развития капиллярной сети (б) при заживлении асептической раны у крыс в зависимости от способа профилактики раневой инфекции.

I — при традиционной подготовке операционного поля; II — после его обработки монооксидом азота (NO). По оси абсцисс — срок от начала опыта (сут); по осям ординат: а — число иммунопозитивных эндотелиоцитов в поле зрения при об.40, ок.6; б — длина капиллярной сети (мкм, в 1 мм^2 среза). Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки

щих 3–5 сут число этих клеток возрастало более чем в 3 раза. К исходу недельного срока (5-, 7-е сутки) их количество приобретало устойчивый характер и держалось на уровне 29,5±1,1 клеток (см. рис. 1, а). На всех этапах исследования количество пролиферирующих эндотелиоцитов статистически значимо превышало число аналогичных клеток в ране, нанесенной при традиционной обработке кожи ($P<0,05$). При электронно-микроскопическом исследовании было обнаружено, что раневая поверхность почти полностью покрыта слоем эндотелиальных клеток.

Криофрактографически установлено, что профилактика раневой инфекции по Гроссиху — Филончикову сопровождалась низкой удельной (объёмной) плотностью кавеол на сколах эндотелиоцитов образующейся грануляционной ткани. Спустя 1 сут от начала опыта она составляла 2,9%, сокращаясь в 2 раза в течение следующих 2 сут и оставаясь далее на этом минимуме. Напротив, при превентивном использовании экзогенного NO уже в ближайшие сутки удельная плотность кавеол эндотелия кровеносных микрососудов возрастала. К 5-м суткам она достигала максимальной величины — 6,9% и в дальнейшем стабилизировалась в пределах 6,4%.

Результаты сканирующей электронной микроскопии свидетельствуют о том, что независимо от способа превентивного воздействия на рану в течение 3 сут эксперимента отдельные капилляры встречались только в области дна раны, они были расширенными, базальная мембрана — разрыхлённой, а в периваскулярной зоне наблюдалось полнокровие. Далее происходило прогрессивное нарастание суммарной длины микрососудов. На фоне традиционной обработки операционного поля этот процесс характеризовался умеренным развитием капилляров. Они формировали выросты и эндотелиальные тяжи, образовавшиеся сосудистые петли располагались перпендикулярно поверхности раны. На полутонких срезах были видны признаки застоя плазмы крови в верхних петлях капиллярной сети, непосредственно под полинуклеарным валом появились «монетные» столбики из эритроцитов. Только к 7-м суткам эксперимента длина капиллярной сети достигала 104±4 мкм в 1 мм^2 среза (см. рис. 1, б).

В ране, которая была нанесена после обработки операционного поля NO, развитие грануляционной ткани отличалось более положительными качественными и количественными характеристиками. Уже на 3–5-е сутки была обнаружена пролиферативная активность эндотелия с интенсивным почкообразованием, что сопровождалось структуризацией капиллярной сети, протяженность которой достигала 223±10 мкм в 1 мм^2. По истечении 7 сут опыта на фоне смешанного полнокровия наблюдалось активное митотическое деление эндотелиоцитов. Суммарная протяжённость микрососудистого русла вдвое увеличивалась и достигала 469±12 мкм в 1 мм^2, статистически значимо отличаясь от длины капилляров, формировавшихся при традиционных мерах профилактики раневой инфекции ($P<0,05$; см. рис. 1, б).

Пролиферативная активность клеток базального слоя эпидермиса в области нанесенной раны у животных при традиционной профилактике хирургической инфекции на протяжении 3 сут эксперимента возрастала в 2 раза, а затем также стремительно уменьшалась, вплоть до полного исчезновения PCNA-позитивных клеток. Напротив, в условиях обработки зоны нанесения раны NO-пролиферативная активность базальных клеток эпидермиса уже в 1-е сутки от начала опыта была статистически значимо выше. Своего максимума она достигала к 3-м суткам заживления раневого дефекта и сохранялась на высоком уровне до конца исследования ($P<0,05$; *рис. 2*).

Обсуждение полученных данных. Результаты морфологического исследования свидетельствуют о том, что вне зависимости от используемых средств профилактики раневой инфекции

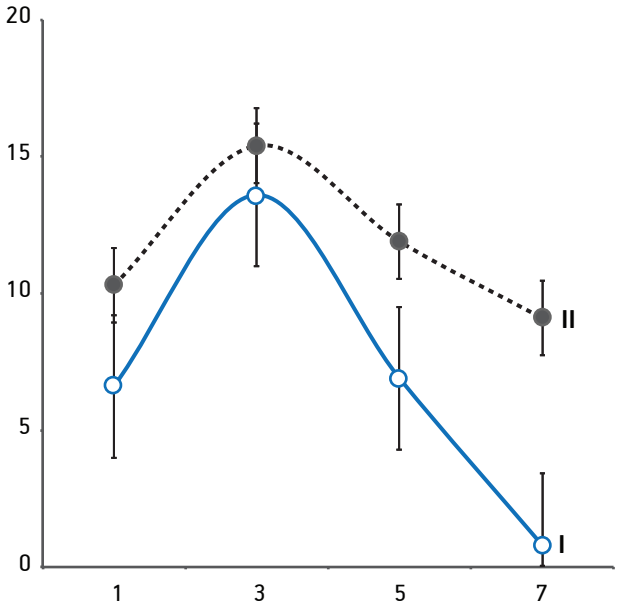

Рис. 2. Пролиферативная активность базальных клеток эпидермиса кожи у крыс в околораневой зоне при различных способах профилактики раневой инфекции.

По оси абсцисс — срок от начала опыта (сут); по оси ординат — число иммунопозитивных клеток в поле зрения при об.40, ок.6. Вертикальные отрезки — значение стандартной ошибки. Остальные обозначения те же, что на рис. 1

в условиях экспериментального моделирования заживление хирургической раны характеризуется биологически запрограммированной последовательной сменой процессов воспаления, регенерации и эпителизации. Иммуногистохимически доказано, что предварительная обработка операционного поля с помощью аппарата «Плазон» вносит коррективы в формирование эндотелия за счет интенсивной его пролиферации. Это можно связать с потенцированием действия эндогенного (вырабатываемого в эндотелиоцитах) NO, дополнительно поступающим в ткани раны биологически активным аналогом экзогенного происхождения. В таких условиях к 7-м суткам процесс неоангиогенеза становится не только желаемым, но и объективно заметным явлением.

Морфологический статус эндотелия капилляров дополняется активным развитием кавеол, которые обеспечивают эндоцитоз, а также принимают участие в регуляции сигнальных каскадов, способствуя пролиферации клеток или окончательной их дифференцировке в зависимости от типа и композиции матрикса [13–15]. Согласно теории сигналосомы посредством связи сигнальных молекул с базовой белковой структурой — кавеолином-1, кавеолы регулируют взаимодействие избранных сигнальных каскадов [13]. Криофрактографически подтверждается активное влияние экзогенного NO на этот процесс в виде значительного повышения плотности расположения кавеол на сколах эндотелиоцитов капилляров в раневой зоне. Надо полагать, усиленное образование плазмолеммальных пузырьков представляет собой стимулированное формирование дополнительных трансэндотелиальных каналов, определяющих активизацию процессов дегидратации. Интенсивное микровезикулообразование, которое связано с действием экзогенного NO, позволяет подавить воспалительную реакцию, создавая условия для активной пролиферации эндотелиоцитов и повышая скорость репаративной клеточной регенерации.

По данным сканирующей электронной микроскопии, на фоне превентивной обработки операционного поля NO в ране потенцируются процессы ангиогенеза. Стремительное возрастание суммарной длины микроциркуляторного русла соотносится с активным образованием грануляционной ткани — обязательного и необходимого условия ликвидации раневого дефекта. При этом электронно-микроскопически выявлено, что вновь образованные эндотелиоциты участвуют в формировании грануляций и выстилают раневую поверхность [9].

В заживлении раны важная роль отводится эпителизации, обеспечивающей восстановление физиологически адаптированного кожного покрова в зоне повреждения. Этот процесс во многом зависит от активности клеток базального слоя эпителия, многослойный статус которого поддерживается посредством феномена межклеточного контакта в виде плотного, адгезивного (сплошного) и щелевого типа морфофункциональных проявлений. Плотные контакты обусловливают так называемое контактное торможение, сдерживая излишнее образование клеточной массы [2, 12]. При повреждении эпидермиса в ответ на возрастающую потребность в репаративной регенерации усиливается пролиферативная активность эпителиоцитов базального слоя. В силу того, что их питание осуществляется диффузно со стороны подлежащих тканей, эти процессы в ране определяются выраженностью неоангиогенеза, которая в условиях превентивной обработки кожного покрова в зоне нанесения раны NO нарастает.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атлас сканирующей электронной микроскопии клеток, тканей и органов. Под ред. О.В.Волковой, В.А.Шахламова и А.А.Миронова. М., Медицина, 1987.
2. Банин В.В. Механизмы обмена внутренней среды. М., Изд-во РГМУ, 2000.
3. Боровая Т.Г., Данилов Р.К. и Клочков И.Д. Экспериментально-гистологический анализ гистогенеза и регенерации тканей (некоторые итоги XX в. и перспективы дальнейших исследований). Морфология, 2000, т. 119, вып. 4, с. 7–16.
4. Брайловская Т.В. и Федорина Т.А. Морфологическая характеристика течения раневого процесса при экспериментальном моделировании резаных и рвано-ушибленных кожных ран. Биомедицина, 2009, т. 1, № 9, с. 68–74.
5. Выренков Ю.Е., Москаленко В.И. и Шишло В.К. Экспериментальное обоснование возможности применения комплексного лечения огнестрельных ран с использованием монооксида азота и лимфогенной терапии. Хирург, 2009, № 9, с. 5–12.
6. Караганов Я.Л., Миронов А.А. и Миронов В.А. Сканирующая электронная микроскопия нативных препаратов сосудистого эндотелия. Арх. пат., 1986, т. 48, № 1, с. 93–105.
7. Кабисов Р.К., Соколов В.В., Шехтер А.Б. и др. Первый опыт применения экзогенной NO-терапии для лечения послеоперационных ран и лучевых реакций у онкологических больных. Росс. онкол. журн., 2000, № 1, с. 24–29.
8. Ларичев А.Б., Шишло В.К., Лисовский А.В. и др. Профилактика раневой инфекции и морфологические аспекты заживления асептической раны. Вестн. клин. и экспер. хир., 2011, т. 4, № 1, с. 728–733.
9. Ларичев А.Б., Шишло В.К., Лисовский А.В. и Чистяков А.Л. Возможности экзогенного монооксида азота в предупреж-

дении послеоперационной раневой инфекции. Хирургия, 2011, № 7, с. 32–35.

10. Микроскопическая техника: Руководство для врачей и лаборантов. Под ред. Д. С. Саркисова и Ю. Л. Петрова. М., Медицина, 1996.
11. Решетов И. В., Кабисов Р. К., Шехтер А. Б. и др. Применение воздушно-плазменного аппарата «Плазон» в режиме коагуляции и NO-терапии при реконструктивно-пластических операциях у онкологических больных. Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии, 2000, № 4, с. 24–39.
12. Шехтер А. Б., Грачев С. В., Милованова З. П. и др. Применение экзогенного монооксида азота в медицине: медико-биологические основы, клинико-морфологические аспекты, механизмы, проблемы и перспективы. В кн.: NO-терапия: теоретические аспекты, клинический опыт и проблемы применения экзогенного оксида азота в медицине. М., Издательский дом «Русский врач», 2001, с. 3–16.
13. Nassoy P. and Lamaze C. Stressing caveolae new role in cell mechanics. Trends Cell Biol., 2012, v. 22, № 7, p. 381–389.
14. Quest A. F., Leyton L. and Parraga M. Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. Biochem. Cell Biol., 2004, v. 82, № 1, p. 129–144.
15. Razani B., Woodman S. E. and Lisanti M. P. Caveolae: from cell biology to animal physiology. Pharmacol. Rev., 2002, v. 54, № 3, p. 431–467.

Поступила в редакцию 21.05.2014
Получена после доработки 22.07.2014

PECULIARITIES OF THE REPARATIVE REGENERATION DURING THE HEALING OF ASEPTIC WOUND USING DIFFERENT METHODS OF THE SURGICAL FIELD PREPARATION OF IN THE EXPERIMENT

A. B. Larichev, V. K. Shishlo, A. V. Lisovskiy and M. M. Ryabov

The peculiarities of the reparative regeneration after aseptic wound infliction were studied on albino rats (n=24), to detect the effect of the method of prevention of wound infection. Immunohistochemically it was found that unlike the healing of the wounds after treatment of the surgical field by Grossich-Filonchikov method, the application of the exogenous nitric monoxide (NO) for this purpose during the experiment resulted in a statistically significant increase of the number of endothelial cells (2-fold by Day 7). By the same date, the total length of the microvascular bed vessels was also duplicated. Cryofracture identification of caveoli on endotheliocyte replicas indicated the increase in plasmalemmal vesicle density in the endothelium by 6.9%. Additionally, under the condition of NO treatment, the proliferative activity of the cells in the basal layer of the epidermis of the skin was significantly increased, d reaching a maximum by Day 3 days of wound healing and remaining at a high level until the end of the study. These results indicate the positive effect of exogenous NO on the course of the wound process.

Key words: *aseptic wound, wound process, NO-treatment, endothelium*

Department of General Surgery, Yaroslavl' State Medical Academy; Scientific Department of Clinical Lymphology, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow; Division of Surgery, Military Clinical Hospital № 1586, Yaroslavl'