

ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ КОНТАМІНОВАНОЇ РАНИ У КРОЛІВ

Бурковський М.І., Желіба М.Д., Чонопищук Р.М., Бевз В.О.*

Кафедра загальної хірургії, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, Вінниця, Україна
*Патолого-анатомічне відділення, Військово-медичний клінічний центр Центрального регіону, Вінниця, Україна

Features Of An Experimental Contaminated Wound In Rabbits

M.I. Burkovskiy, M.D. Zheliba, R.M. Chornopyschuk, V.O. Bevz*

Department of General Surgery, Vinnytsia National Pirogov Memorial Medical University, Ukraine
*Pathological Department, Military Medical Clinical Center of the Central Region, Vinnytsia, Ukraine

Received: January 30, 2015
Accepted: March 24, 2015

Адреса для кореспонденції:
Хмельницьке шосе, 96,
Вінниця, 21029, Україна
тел.: +38-097-782-38-95
e-mail: burcov@gmail.com

Summary

The determination of risk factors of a contaminated wound infectious complications development and the prognosis of its further progression is impossible without the objective evaluation of the wound processes. The existing ways of wound progressing control cannot help the surgeon to choose a set of methods to cure a contaminated wound. Morphometric characteristics of neutrophilic granulocytes are becoming more and more common nowadays. The change of neutrophilic granulocyte form factor of these cells clearly depicts their functional activities. Thus, the purpose of our research is to study the neutrophilic granulocyte form factor (NGFF) index change of an experimental contaminated wound and compare it to the results based on the traditional ways of research. The experiment was been performed on eight mature Chinchilla rabbits by modelling of a contaminated wound. During 27 hours, the animals were been taken a smear-imprint from the wound surface, blood from the marginal auricular vein. A further laboratory, cytological, microbiological and morphological research was been conducted and NGFF index was determined. The results of the study showed a significant difference of the contaminated wound indices during the research. Herewith, the typical dynamics of the neutrophilic granulocyte form factor index change of wound content leads to the use of this index as diagnostic criteria to assess the wound progressing process and choose an appropriate surgical method for the first surgical treatment.

Key words: experimental contaminated wound, diagnostics, local immunity, neutrophilic granulocyte form factor.

Вступ

Рановий процес — це складний комплекс загальних та місцевих біологічних реакцій, які виникають у відповідь на пошкодження тканин і ураження інфекційними агентами, а перебіг його характеризується чіткою зміною стадій [1]. Не зважаючи на значний багаж теоретичних знань та практичних умінь, здобутих протягом багатьох років вивчення цього питання, проблема розвитку гнійних ускладнень «чистих» та «контамінованих» ран залишається актуальною [6]. Взагалі поділ післяопераційних ран на «чисті» та «контаміновані» носить досить умовний характер, адже навіть за умов суворого дотримання правил асептики уникнути мікробного забруднення операційного поля неможливо [4]. Так, уже після розрізу шкіри частота виявлення ранової хірургічної інфекції в рані становить 3–6%, а до кінця оперативного втручання може досягати 18%, із забрудненням країв рани у 80–90% випадків різноманітною мікрофлорою екзогенного чи ендогенного походження [11, 12, 14]. Виникнення інфекційних ускладнень у «випадковій» рані носить ще вищий ризик [8].

На сьогодні визначення факторів ризику розвитку інфекційних ускладнень при контамінованій рані та прогнозування її подальшого перебігу не можливо без об'єктивної оцінки процесів в рані.

Проведені з метою діагностики збір анамнезу, об'єктивна оцінка вогнища ураження, рутинні лабораторні дослідження крові та мікробіологічне дослідження ранового вмісту часто не можуть допомогти хірургу чітко визначитися із лікувальною тактикою при контамінованій рані, змушуючи покладатись виключно на власний досвід та майстерність.

Важливою умовою виникнення та прогресування ранової інфекції є пригнічення як різноманітних факторів природної резистентності так і потенційної здатності хворого до розвитку специфічного імунітету [11]. Найбільш значущим механізмом боротьби з інфекційним агентом є фагоцитарна система, до складу якої входять моноцити, гранулоцити та макрофаги [9]. При цьому першими на проникнення патогенного агента реагують нейтрофільні гранулоцити (НГ) — клітини, які чутливі до найменших змін гомеостазу і найпершими проникають у вогнище запалення [13]. Тому з-поміж численних факторів, які забезпечують неспецифічну резистентність організму при рановому процесі, важливим є саме показник функціонального стану НГ [5].

В нормі більшість НГ кров'яного руслу знаходяться в неактивному стані, мають невеликий розмір та округлу форму. Активация цих клітин супроводжується зміною розмірів цих клітин та будови мембранного апарату [3]. Відомі морфометричні показники оцінки НГ є недостатньо інформативними або ж складними у виконанні. Для підвищення точності об'єктивного світлооптичного аналізу НГ було використано показник фактору форми цих клітин, який чітко відображає їх функціональну активність.

Метою нашого дослідження стало вивчення змін показника фактору форми нейтрофільних гранулоцитів (ФФНГ) при експериментальній контамінованій рані та порівняння їх з результатами традиційних лабораторних, мікробіологічних та морфологічних досліджень.

Матеріали та методи

Для дослідження було використано 8 статевозрілих кролів породи *Shinshilla*, чоловічої статі, віком 1–1,5 роки, вагою $3,4 \pm 0,3$ кг, у яких моделювали контаміновану рану.

Спосіб моделювання контамінованої рани полягав у наступному. Міжлопаткову ділянку тварин дипилували, обробляли розчином антисептика та місцево знеболювали 0,25% *Sol. Novocaini* 10 мл. В межах контуру, нанесеного за допомогою трафарету, скальпелем висікали ділянку шкіри округлої форми разом з підшкірною клітковиною до поверхневої фасції діаметром 2 см. Затискачем Кохера розчавлювали прилегли м'які тканини в ділянці рани. В утворений

дефект піпеткою вносили 1 мл добової культури *Staphylococcus aureus ATCC 25923*, яка містила 10^5 мікробних тіл (концентрація визначалась за стандартом мутності). Після цього рану покривали поліетиленовою плівкою і фіксували останню клеолом. Через 3 години плівку видаляли і протягом 27 годин проводили лабораторні, цитологічні, мікробіологічні дослідження.

У дослідних тварин протягом 27 годин проводили забір крові з краєвої вусної вени з метою визначення кількості лейкоцитів і лейкоцитарної формули, ранового вмісту для цитологічного та бактеріологічного досліджень [4, 7, 10]; для визначення показника ФФНГ використовували мазки крові та ранового вмісту, зафарбовані за Романовським-Гімзою, мікроскоп “Микмед — 2” з *Medical image view station* і комп'ютерним аналізатором зображення *UNHSCSA ImageTool v.3.0* та спеціальну програму, розроблену фірмою “Ева” (Україна), “Factor M”) [2].

При гістологічному дослідженні тканин з рани використовували забарвлення зрізів гематоксиліном і еозином та світловий мікроскоп *Olympus BX-41* при збільшенні в 100 і 200 разів.

В якості вихідних рівнів для лабораторних показників були взяті результати дослідження крові цих тварин до проведення моделювання патологічного процесу. Статистичне опрацювання результатів дослідження проведене з використанням комп'ютерної програми *Statistica 6.1*.

Таблиця 1. Показники ФФНГ крові та ранового вмісту у тварин з контамінованою експериментальною ранною протягом доби

Терміни спостереження	Показники	
	ФФНГ крові	ФФНГ ранового вмісту
0 год	0,9585±0,0028	-
4 год	0,9330±0,0005	0±0
5 год	-	0,8284±0,0024
6 год	0,9427±0,0006	0,8662±0,0014
7 год	-	0,8818±0,0006
8 год	0,9628±0,0007	0,8832±0,0020
9 год	0,9508±0,0006	0,8798±0,0011
10 год	-	0,8766±0,0024
11 год	0,9318±0,0008	0,8810±0,0031
12 год	0,9259±0,0006	0,8911±0,0033
13 год	0,9213±0,0009	0,9171±0,0047
14 год	0,9006±0,0008	0,9072±0,0016
15 год	-	0,9158±0,0031
16 год	0,9031±0,0010	0,9120±0,0027
17 год	-	0,9217±0,0032
18 год	0,9002±0,0010	0,9181±0,0016
19 год	0,9060±0,0007	0,9178±0,0018
20 год	0,8949±0,0008	0,9268±0,0034
21 год	-	0,9329±0,0015
22 год	0,9004±0,0009	0,9353±0,0002
23 год	-	0,9251±0,0004
24 год	0,8885±0,0007	0,9292±0,0024
25 год	-	0,9323±0,0007
26 год	-	0,9242±0,0007
27 год	0,8839±0,0005	0,9359±0,0008

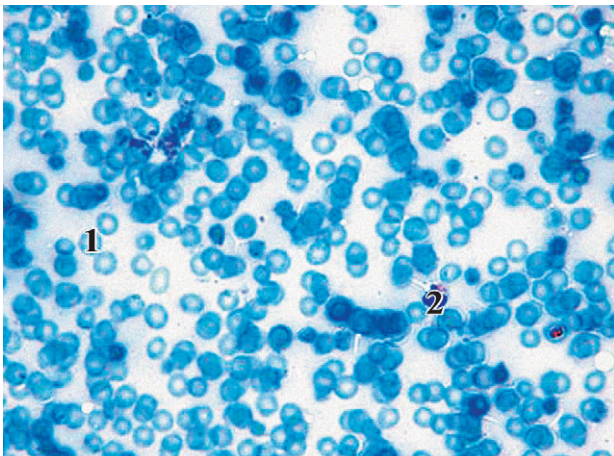


Рис. 1

Цитограма мазка-відбитка з контамінованої рани на 4 год її існування. Забарвлення за Романовським-Гімзою, збільшення $\times 1000$.

1 — еритроцит; 2 — нейтрофільний лейкоцит.

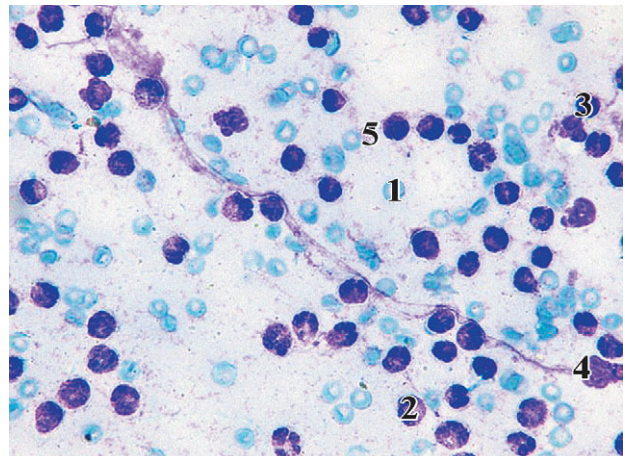


Рис. 2

Цитограма мазка-відбитка з контамінованої рани на 6 год її існування. Забарвлення за Романовським-Гімзою, збільшення $\times 1000$.

1 — еритроцит; 2 — нейтрофільний лейкоцит; 3 — лімфоцит; 4 — фібробласт, 5 — мікроорганізми.

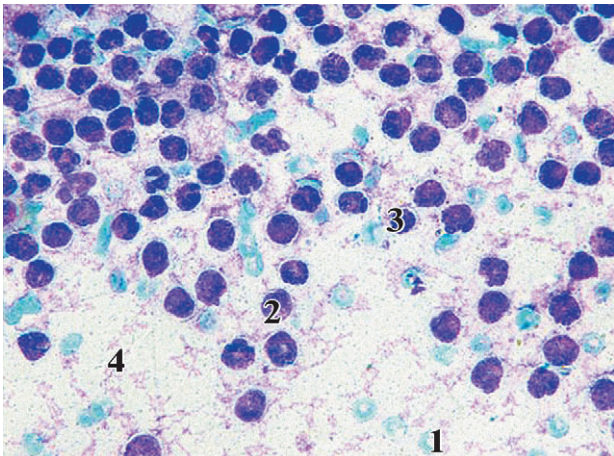


Рис. 3

Цитограма мазка-відбитка з контамінованої рани на 12 год її існування. Забарвлення за Романовським-Гімзою, збільшення $\times 1000$.

1 — еритроцит; 2 — нейтрофільний лейкоцит; 3 — лімфоцит; 4 — мікроорганізми.

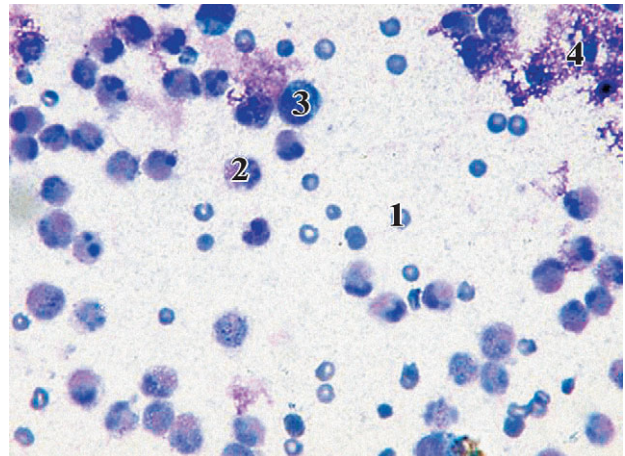


Рис. 4

Цитограма мазка-відбитка з контамінованої рани на 18 год її існування. Забарвлення за Романовським-Гімзою, збільшення $\times 1000$.

1 — еритроцит; 2 — нейтрофільний лейкоцит; 3 — полібласт; 4 — клітинний детрит.

Результати та обговорення

Результати динамічного дослідження показника ФФНГ крові та ранового вмісту у тварин з контамінованою раною представлено в таблиці 1.

У інтактних тварин цей показник в крові становив $0,9585 \pm 0,0028$. В подальшому він поступово знижувався і вже на 24 год становив $0,8885 \pm 0,0007$, достовірно відрізняючись від вихідного рівня, що свідчило про активацію неспецифічної ланки захисних сил організму. В рановому вмісті показник проявив протилежну залежність: на 5 год він становив $0,8284 \pm 0,0024$ з подальшим підвищенням до 13 години і подальшим незначним ростом до рівня $0,9292 \pm 0,0024$ на 24 год. На 27 год показник ФФНГ у рановому вмісті становив $0,9359 \pm 0,0008$. Такі зміни можуть вказувати на тимчасове виснаження локальної опірності.

При вивченні рівня лейкоцитів та лейкоцитарної формули периферичної крові у інтактних тварин були отримані наступні результати: рівень лейкоцитів — $10,4 \pm 0,7$ Г/л, еозинофілів — $0,08 \pm 0,3\%$, паличкоядерних нейтрофілів — $4,0 \pm 0,3\%$, сегментоядерних нейтрофілів $48,2 \pm 1,2\%$, лімфоцитів $44,5 \pm 1,4\%$, моноцитів $3,5 \pm 0,4\%$.

При аналізі змін цих показників в динаміці було встановлено, що протягом доби абсолютне число лейкоцитів та відносна кількість еозинофілів достовірно не змінювалась. Проте змінювалась структура нейтрофілів, зокрема кількість паличкоядерних протягом доби поступово зростала до показника $8,8 \pm 0,2\%$ на 24 год, а відносна кількість нейтрофільних гранулоцитів на 6 год зростала до рівня $60,0 \pm 1,2\%$ з подальшим зниженням цього показника до рівня $43,8 \pm 0,6\%$ на 24 год, що може свідчити про початок розвитку запального процесу. Відзначалась також

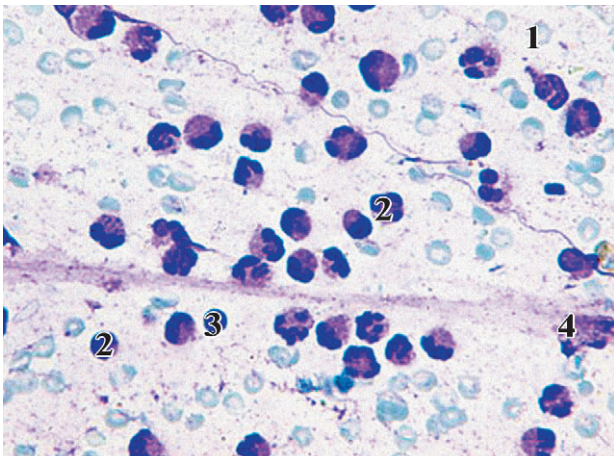


Рис. 5

Цитограма мазка-відбитка з контамінованої рани на 24 год її існування. Забарвлення за Романовським-Гімзою, збільшення $\times 1000$.

1 — еритроцит; 2 — нейтрофільний лейкоцит; 3 — лімфоцит; 4 — фібробласт.

тенденція до зростання кількості моноцитів до $7,2 \pm 0,6\%$ та поступового зниження рівня лімфоцитів до $40,2 \pm 0,6\%$ на 24 год, що може свідчити про відсутність ефективної специфічної відповіді імунної системи на цьому етапі. Між показниками ФФНГ, визначених в крові, та кількістю паличкоядерних нейтрофілів відзначений сильний непрямої кореляційний зв'язок ($r = -0,89$ ($p \leq 0,05$)), такий самий зв'язок виявлений з кількістю моноцитів ($r = -0,96$ ($p \leq 0,05$)), та прямий сильний зв'язок з кількістю сегментоядерних нейтрофілів ($r = 0,93$ ($p \leq 0,05$)). Між показниками ФФНГ, визначеними у рановому вмісті, та показниками лейкограми кореляційних зв'язків не виявлено.

З допомогою бактеріологічного дослідження ранового вмісту був ідентифікований збудник — ним виявився *S. aureus*, та визначена його кількість. Так, на 4 год рівень мікробної контамінації рани становив $5,69 \pm 0,34$ log КУО/мл. При цьому спостерігалось стрімке зниження цього показника на 9 та 11 год до рівня $0,84 \pm 0,32$ та $0,42 \pm 0,28$ log КУО/мл відповідно. В подальшому визначалось не менше стрімке зростання кількості мікрофлори і вже на 24 год вона становила $5,19 \pm 0,33$ log КУО/мл з подальшою тенденцією до зростання.

Подібне стрімке зростання кількості мікроорганізмів в рані можна пояснити виснаженням місцевих природних механізмів антимікробного захисту, що може бути результатом зниження активності локальної клітинної ланки імунітету, яке було встановлене раніше за допомогою досліджуваного показника фактор форми нейтрофільних гранулоцитів.

При аналізі результатів цитологічного дослідження протягом перших 4 год вираженої міграції клітин в рану не спостерігалось. В мазках виявлялись лише скупчення еритроцитів та мізерна кількість нейтрофільних лейкоцитів з поодинокими мононуклеарами (рис. 1).

На 6 год кількість клітин в ексудаті зростала, при цьому домінували нейтрофільні гранулоцити ($97,75 \pm 0,12\%$). Також виявлялись у незначній кількості лімфоцити — $1,25 \pm 0,11\%$, фібробласти — $0,82 \pm 0,13\%$. Визначалась велика кількість мікроорганізмів, що розташовувались позаклітинно та внутрішньоклітинно (рис. 2).

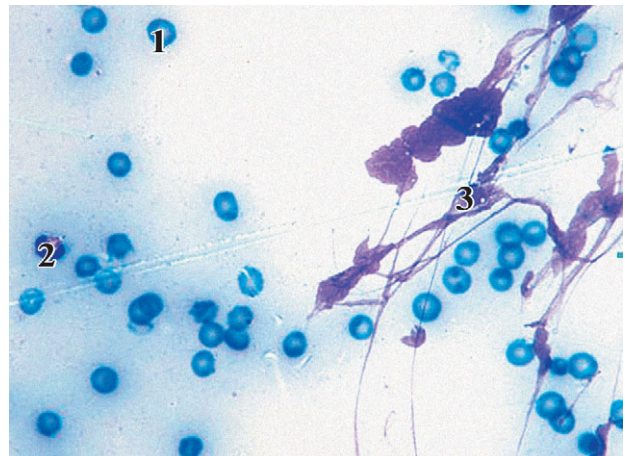


Рис. 6

Цитограма мазка-відбитка з контамінованої рани на 27 год її існування. Забарвлення за Романовським-Гімзою, збільшення $\times 1000$.

1 — еритроцит; 2 — нейтрофільний лейкоцит; 3 — фібробласт.

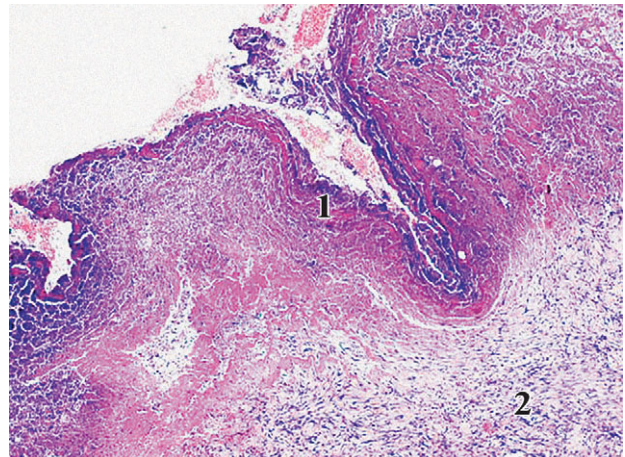


Рис. 7

Гістологічна структура рани через 24 год після її контамінації. Гематоксилін-еозин $\times 100$.

1 — шар некротизованої тканини; 2 — шар дерми та гіподерми з вогнищевими крововиливами, повнокрів'ям судин, дифузною інфільтрацією сегментоядерних лейкоцитів та лімфогістіоцитарними елементами.

На 12 год кількість нейтрофільних лейкоцитів становила $95,5 \pm 0,25\%$, лімфоцитів було $0,50 \pm 0,14\%$, моноцитів — $1,00 \pm 0,12\%$, макрофагів $3,00 \pm 0,10\%$. Фібробласти не визначались. Мікроорганізми розташовувались позаклітинно та внутрішньоклітинно (рис. 3).

На 18 год кількість нейтрофільних лейкоцитів становила $93,17 \pm 0,25\%$, лімфоцитів було $0,95 \pm 0,08\%$, моноцитів — $0,83 \pm 0,07\%$, макрофагів $5,05 \pm 0,16\%$, з'являлись поодинокі полібласти, клітинний детрит. Фібробласти не визначались. У препараті зростала кількість мікроорганізмів, яка визначалась у всіх частинах мазка (рис. 4).

На 24 год від початку моделювання контамінованої рани кількість нейтрофільних лейкоцитів продовжувала зменшуватися до $88,95 \pm 0,38\%$, лімфоцитів було $1,4 \pm 0,11\%$, моноцитів — $1,43 \pm 0,06\%$, макрофагів $7,72 \pm 0,16\%$,

фібробластів — $0,95 \pm 0,11\%$. Зберігалось скупчення мікроорганізмів, кількість яких зростала (рис. 5).

На 27 год кількість нейтрофільних лейкоцитів становила $86,9 \pm 0,18\%$, лімфоцитів $1,25 \pm 0,11\%$, моноцитів — $1,45 \pm 0,08\%$, макрофагів $8,03 \pm 0,15\%$, фібробластів — $2,36 \pm 0,11\%$. Зберігалось скупчення мікроорганізмів.

Однак слід відмітити, що подальше вивчення клітинного складу препарату ускладнювалось рясною появою фібробластів та волокон, що вказувало про затихання клітинної реакції і хибно відображало нормальний процес загоєння рани (рис. 6).

Таким чином зменшення відсоткового вмісту нейтрофільних гранулоцитів та їх дегенеруючих форм, макрофагів, поява фібробластів, полібластів свідчили про зниження активності клітинної реакції і чітко корелювали з підвищенням показника ФФНГ ранового вмісту. Про негативний прогноз такої рани вказує наявність мікрофлори в рані, яка зберігається протягом усієї доби спостереження із тенденцією до зростання.

Загалом, між показниками ФФНГ, визначених у крові, та кількістю нейтрофільних лейкоцитів виявлений прямий сильний кореляційний зв'язок ($r = 0,96$ ($p \leq 0,05$)), а також сильний непрямої зв'язок з кількістю моноцитів ($r = -0,88$ ($p \leq 0,05$)) та кількістю макрофагів ($r = -0,99$ ($p \leq 0,05$)). Показники ФФНГ, визначені у рановому вмісті, також мали сильний зворотній кореляційний зв'язок із цими показниками: ($r = -0,95$ ($p \leq 0,05$)), ($r = 0,90$ ($p \leq 0,05$)) та ($r = 0,99$ ($p \leq 0,05$)) відповідно.

Через 24 год після моделювання контамінованої рани визначалась наступна гістологічна картина: краї рани знаходяться вище ранового дефекту, який має неправильну блющеподібну форму. Краї ранового дефекту утворені зрізаною шкірою, дном рани є гіподерма. Епітелій біля країв рани раптово обірваний, деякі епітеліоцити по краях рани у стані некробіозу. Дерма під епітелієм складається із пучків колагенових та еластичних волокон, які розташовуються у різному напрямку. Навколо додатків шкіри та, особливо, судин спостерігаються скупчення однотипних клітин. Має місце набряк дерми та гіподерми (один із проявів розладу мікроциркуляції). В набряковій рідині зустрічаються одноядерні клітини (моноцити і лімфоцити), а також поодинокі сегментоядерні лейкоцити. Судини з еритростазами з крайовим стоянням лейкоцитів (лейкостази). Ендотелій судин набряклий (рис. 7).

Отже через добу після моделювання рани в тканинах, що оточують та утворюють її, спостерігались ознаки ранньої стадії запального процесу: альтерація та початкові ознаки ексудативного процесу.

Висновки

Характерна динаміка змін показника фактору форми нейтрофільних гранулоцитів у крові та рановому вмісті при контамінованій рані є підставою для викори-

стання цього показника як діагностичного критерію при оцінці перебігу ранового процесу і визначення відповідної хірургічної тактики під час проведення первинної хірургічної обробки. Позитивні результати первинної хірургічної обробки можна очікувати при низькому значенні показника фактору форми нейтрофільних гранулоцитів, визначеного в рановому вмісті. Його наближення до норми може бути протипоказом до накладання первинного хірургічного шва.

Література

1. Абаев Ю.К. (2003) Раневая инфекция в хирургии: учебное пособие. (Минск). "Беларусь". 293 с.
2. Бурковский М.И., Петрушенко В.В., Хлоп'юк Л.О., Чорнопишук Р.М., Верба Н.А., Шиндер А.В. (2012) Оцінка стадії розвитку гнійно-запального процесу за показником Індексу лейкоцитарної активності. Український журнал хірургії. 17; 2: 69-73
3. Гомоляко І.В., Тумасова К.П. (2001) Ультраструктурна та морфометрична характеристика нейтрофільних гранулоцитів крові. Цитология и генетика. 5: 44-48
4. Даценко Б.М. (1995) Теорія та практика місцевого лікування гнійних ран. (Київ). "Здоров'я". 384 с.
5. Деев В.А., Тумасов Е.П. (1999) Взаимосвязь между оксидантной и миелопероксидазной активностью нейтрофильных гранулоцитов у гнойно-септических больных. Лабораторная диагностика. 2: 13-15
6. Жадинский А.Н., Гюльмамедов Ф.И., Жадинский Н.В., Полунин Г.Е. (2010) Разработка способа местного лечения гнойных ран в первой фазе раневого процесса и оценка его эффективности в эксперименте. Архив клінічної та експериментальної медицини. 19; 2: 131-133
7. Камышников В.С. (2009) Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. (Москва). "МЕДпрессинформ". 896 с.
8. Кузнецов Н.А., Родоман Г.В., Туманов В.П., Никитин В.Г., Шалаева Т.И. (2004) Учебно-методическое пособие по лечению ран. (Москва). РГМУ. 64 с.
9. Куцевляк В.И. Любченко А.В. (2004) Местная озонотерапия при лечении гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области у детей. Вісник стоматології. 3: 76-79
10. Приказ минздрава СССР об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений от 22.04.85 № 535.
11. Радзіховський А.П., Мироненко О.І., Сютя Л.О., Федоров Ю.Б. (2007) Фактори виникнення ранової хірургічної інфекції. Клінічна хірургія. 11-12: 52
12. Сивец Н.Ф. (2005) Основные принципы и тактика антибиотикопрофилактики в хирургической практике. Медицинские новости. 12: 32-36
13. Швыдченко И.Н., Нестерова И.В., Синельникова Е.Ю. (2005) Цитокиносекретирующая функция нейтрофильных гранулоцитов. Иммунология. 1: 31-34
14. Jepsen O.V. (1973) Contamination of the wound during operation and postoperative wound infection. Ann Surg. 177; 2: 178-180