

УДК [616.61-089-003.93:615.468.6]-092.9

© Проніна О.М., Гончар С.В., Данильченко С.І., Половик О.Ю., Коптев М.М., 2011

ДИНАМІКА ПОКАЗНИКІВ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ, МАКРОФАГІВ ТА ФІБРОБЛАСТІВ В ПРОЦЕСІ РЕГЕНЕРАЦІЇ НИРКИ ПІСЛЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ НЕФРОТОМІЇ ПРИ ВИКОРИСТАННІ РІЗНИХ ВИДІВ КЕТГУТУ

Проніна О.М., Гончар С.В., Данильченко С.І., Половик О.Ю., Коптев М.М.

Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія» (м. Полтава)

Проніна О.М., Гончар С.В., Данильченко С.І., Половик О.Ю., Коптев М.М. Динаміка показників нейтрофільних гранулоцитів, макрофагів та фібробластів в процесі регенерації нирки після експериментальної нефротомії при використанні різних видів кетгуту // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3 (додаток). – С. 9-11.

Експеримент був проведений на 48 беспородних, статевозрілих собаках обох статей вагою 7–12 кг. Тварини були розподілені на чотири групи: контрольну та експериментальні. Після нефротомії краї рани шили ниткою кетгуту (полірованого), виготовленого із баранячої сировини, кетгуту зі свинячої сировини, а також кетгуту, модифікований L-аргініном. L-аргінін іммобілізували на хірургічних нитках у заводських умовах згідно із запропонованим нами способом одержання резорбтивного біологічно активного шовного матеріалу. Отримані в результаті морфометричних досліджень дані свідчать, що при застосуванні кетгуту зі свинячої сировини в більш ранній термін у порівнянні з кетгутом з баранячої сировини відмічається перехід на макрофагально-моноцитарну стадію ранового запалення. При використанні хірургічних ниток, модифікованих L-аргініном, прискорюється перехід як на макрофагально-моноцитарну, так і на фібробластичну стадії ранового запалення. Проліферація фібробластів спостерігається у більш ранній термін (на сьому добу після нефротомії) у порівнянні з кетгутом з баранячої та свинячої сировини.

Ключові слова: кетгут, L-аргінін, тканевий регенерат, морфометрія.

Проніна Е.Н., Гончар С.В., Данильченко С.І., Половик А.Ю., Коптев М.Н. Динаміка показателів нейтрофільних гранулоцитів, макрофагів та фібробластів в процесі регенерації почки после експериментальної нефротомії при використанні різних видів кетгута // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3 (додаток). – С. 9-11.

Експеримент был проведен на 48 беспородных, половозрелых собаках обоего пола весом 7 - 12 кг. Животные были распределены на четыре группы: контрольную и экспериментальные. После нефротомии края раны шили нитью кетгута (полированного), изготовленного из бараньего сырья, кетгутом из свиного сырья, а также кетгутом, модифицированным L-аргинином. Аргинин иммобилизовали на хирургических нитях в заводских условиях согласно предложенному нами способу получения резорбтивного биологически активного шовного материала. Полученные в результате морфометрических исследований данные свидетельствуют, что при применении кетгута из свиного сырья в более ранние сроки по сравнению с кетгутом из бараньего сырья, отмечается переход на макрофагально-моноцитарную стадию раневого воспаления. При использовании хирургических нитей, модифицированных L-аргинином, ускоряется переход как на макрофагально-моноцитарную, так и на фибробластическую стадию раневого воспаления. Пролиферация фибробластов наблюдается в более ранний срок (на седьмые сутки после нефротомии) по сравнению с кетгутом из бараньего и свиного сырья.

Ключевые слова: кетгут, L-аргинин, тканевой регенерат, морфометрия.

Pronina E.N., Gonchar S.V., Danylchenko S.I., Polovik A.Yu., Koptev M.N. Dynamics Of Indicators Of Neutrocytes, Macrophages And Fibroblasts In The Course Of Neogenesis Of The Kidney After Experimental Nephrotomy At Use Of Various Kinds Of The Catgut // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3 (додаток). – С. 9-11.

Experiment has been spent on 48 not purebred, puberal dogs of both sexes is powerful 7-12 kg. Animals have been distributed on four groups: control and experimental. After nephrotomy of edge of a wound sewed a thread of a catgut (polished), made of the mutton raw materials, a catgut from pork raw materials, and also a catgut modified by a L-arginine. L-arginine immobilized on surgical threads industrially according to the way of reception offered by us resorbitive biologically active suture material. Received as a result morphometrical researches the data testifies that at application of a catgut from pork raw materials in earlier terms in comparison with a catgut from the mutton raw materials, transition to a macrophage-monocyte stage of wound inflammations becomes perceptible. When using surgical threads modified with L-arginine accelerates the transition as a macrophage-monocyte, and on fibroblastic stage of wound inflammation. Fibroblast's proliferation observed in the earlier period (on the seventh day after nephrotomy) compared to the catgut of lamb and pork raw material. In this case, proliferation of fibroblasts clearly limited in time (7-14 days) and corresponds to the period required for healing of the wound, thus preventing the possibility of excessive scarring and lithogenesis in the kidney.

Key words: catgut, L-arginin, tissue regenerat, morphometry.

Робота виконана в рамках комплексної міжкафедральної науково-дослідної теми Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія» «Морфологія судинно-нервових взаємовідношень органів голови та шиї людини в нормі та під дією зовнішніх чинників у віковому аспекті. Створення нових та модифікація існуючих хірургічних шовних матеріалів і експериментально-морфологічне обґрунтування їх використання в клініці» (№ держреєстрації 0107U001657).

Вступ. Перспективною є розробка метаболітотропних хірургічних ниток. На сьогодні перспективними ефектами метаболітотропних ХПМ вважається їх репаратна антигіпоксична і біорегуляторна дія. На підставі даних літератури і отриманих нами результатів властивостями метаболітотропних ХПМ володіють як модифіковані лікарськими засобами нитки, так і вже існуючі природні і синтетичні ХПМ [2,10]. У літературі є численні повідомлення щодо

здатності L-аргініну поліпшувати плин ранового процесу, механічної травми та синдрому поліорганної недостатності, що особливо важливо в ранньому післяопераційному періоді [3,7,9]. Цінні якості L-аргініну як препарату, що має антимікробні, антиоксидантні, метаболітотропні та репаративні властивості, визначили розробку методів його іммобілізації на хірургічних шовних матеріалах. Використання кетгуту зі свинячої сировини як матеріалу-носія пов'язане з його певними фізико-хімічними та біологічними властивостями (задовільні характеристики міцності нитки, наявність активних хімічних груп у її колагеновій структурі, здатних міцно зв'язувати аніоно- та катіоноактивні ліганди [6,10]).

Наведено дані щодо наявності у L-аргініну позитивного заряджених груп, що дозволяє забезпечити зв'язок цієї амінокислоти методом електростатичної імпрегнації з хірургічним шовним матеріалом, що містить у своєму складі колаген. При цьому, у літературі

повністю відсутні відомості про реакцію тканин оперованих органів сечовиділення на застосування хірургічної нитки кетгуту, модифікованого L-аргініном.

Мета дослідження. Провести морфометричний аналіз змін нейтрофільних гранулоцитів, макрофагів та фібробластів в складі тканинного регенерату нирки після нефротомії з використанням стандартного кетгуту, кетгуту зі свинячої сировини і кетгуту, модифікованого L-аргініном.

Об'єкт і методи дослідження. Експеримент був проведений на 48 безпородних, статевозрілих собак обох статей вагою 7 – 12 кг. Тварини були розподілені на чотири групи: контрольну та експериментальні.

Тваринам проводилась нефротомія (крім контрольної групи) з подальшим ушиванням нирки різними розсмоктувальними шовними матеріалами. Операція проводилась після премедикації (0,5 ml 0,1% розчину атропіну сульфату, 1% розчину диметролу, 0,8 ml + 2 ml 50% розчину анальгину з розрахунку на 10-15 кг ваги тварини) під тіопенталнатрієвим наркозом із розрахунку 0,09 г на 10 кг ваги тварини.

У першій – контрольній групі проводилася всі етапи оперативного доступу до нирки, без її розсікання і використання шовного матеріалу. У другій групі тварин після нефротомії краї рани зшивали ниткою кетгуту (полірованого), виготовленого із баранячої сировини. У третій групі тварин для зшивання рани нирки використовувся кетгут зі свинячої сировини. У четвертій групі для зшивання рани нирки використовували кетгут, модифікований L-аргініном. L-аргінін іммобілізували на хірургічних нитках у заводських умовах згідно із запропонованим нами способом одержання резорбтивного біологічно активного шовного матеріалу [8].

Після забору матеріалу в експериментальних тварин з метою припущення аутолізу і стабілізації ультраструктур клітин, видалені нами шматочки тканин нирки фіксували в 2,5% розчин глутарового альдегіду на 24 години при температурі +4° С. Наступної доби матеріал заклали в Епон-812 за загальноприйнятою методикою.

Напівтонкі зрізи товщиною 1-2 мкм одержували на ультрамікромомі Сумського ВО «Selmi» УМТП-7 (серійний номер 8–31.4, ТУ 25–7401 0063-91).

Морфометричний аналіз був проведений на напівтонких зрізах за допомогою підрахунку клітин різних класів методом стандартних площин за Г.Г.Автанділовим (1990) (нейтрофільних гранулоцитів, макрофагів, фібробластів) [1].

При роботі з тваринами керувалися загальними етичними принципами роботи з експериментальними тваринами (2001), положеннями брифінгу Європейського наукового співтовариства «Использование животных в исследованиях» (1998) і Гельсінської декларацією про гуманне ставлення до тварин (2000). Уся експериментальна частина дисертаційної роботи з використанням тварин була проведена з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілях» (Страсбург, 1985), нормам біомедицинської етики та відповідним Законам України.

Результати досліджень та їх обговорення. Морфометричні дослідження показали, що на 3 добу

після операції відмічається істотне збільшення числа нейтрофільних гранулоцитів при використанні для шва кетгуту із баранячої сировини у 13.6 рази ($P < 0.001$), при застосуванні кетгуту зі свинячої сировини – у 14.6 рази ($P < 0.001$), а також кетгуту зі свинячої сировини, модифікованого L-аргініном – у 15.2 рази ($P < 0.001$).

Звертає на себе увагу, що за умов використання кетгуту зі свинячої сировини, модифікованого L-аргініном, кількість нейтрофільних гранулоцитів у досліджених зразках перевищує таку при застосуванні стандартного кетгуту на 11.8% ($P < 0.05$). Отримані нами результати відповідають даним літератури, що відмічають порядок реакції клітин у вогнищі ранового запалення: спочатку запалення з'являються нейтрофільні лейкоцити, потім до них присднуються макрофаги і, нарешті, фібробласти [8,11,13,14,15].

Число макрофагів збільшується при використанні для шва стандартного кетгуту із баранячої сировини у 8.2 рази ($P < 0.001$), при застосуванні кетгуту зі свинячої сировини – у 10.8 рази ($P < 0.001$), а також кетгуту зі свинячої сировини, модифікованого L-аргініном – у 11.6 рази ($P < 0.001$).

Особливий інтерес мають дані про кількість фібробластів у динаміці ранового запалення в операційному локусі. Так, на 3 добу післяопераційного періоду кількість фібробластів зменшується при застосуванні кетгуту з баранячої сировини на 52.2% ($P < 0.01$) та при застосуванні кетгуту зі свинячої сировини – на 38.8% ($P < 0.05$), що є характерним для ранніх стадій запального процесу [4,11].

На сьому добу післяопераційного періоду число нейтрофільних гранулоцитів залишається істотно підвищеним при використанні для шва кетгуту із баранячої сировини у 5 разів ($P < 0.001$), при застосуванні кетгуту зі свинячої сировини – у 4.4 рази ($P < 0.001$), а також кетгуту зі свинячої сировини, модифікованого L-аргініном – у 2.2 рази ($P < 0.01$). При цьому, за умов використання кетгуту зі свинячої сировини, модифікованого L-аргініном, кількість нейтрофільних гранулоцитів у досліджених зразках істотно поступається як результату серії при застосуванні стандартного кетгуту (на 56.0%, $P < 0.001$), так і серії з використанням кетгуту зі свинячої сировини (на 50.0%, $P < 0.001$). Тобто, нейтрофільна реакція за умов ранового запалення при застосуванні нитки, модифікованої L-аргініном, обмежена чітким часовим проміжком, що важливо для попередження генералізації запального процесу та його небажаних місцевих і системних проявів.

У цей же час кількість макрофагів залишається збільшеною при використанні для шва кетгуту із баранячої сировини у 8.4 рази ($P < 0.001$), при застосуванні кетгуту зі свинячої сировини – у 8.4 рази ($P < 0.001$), а також кетгуту зі свинячої сировини, модифікованого L-аргініном – у 7.4 рази ($P < 0.001$).

Кількість фібробластів у зразках різних серій дослідів істотно відрізняється. Так, залишається достовірно зниженим число фібробластів при застосуванні кетгуту з баранячої сировини, яке на 41.0% ($P < 0.05$), поступається величині контрольної групи. При застосуванні кетгуту зі свинячої сировини їх кількість достовірно не відрізняється від контролю. При використанні нитки, модифікованої L-аргініном, число фібробластів на 79.9% ($P < 0.001$) перевищує величину контрольної групи, та

відповідно у 3.1 рази ($P < 0.001$) та на 69.7% ($P < 0.01$) перевищує результати серій, у яких застосовували кетгут з баранячої та свинячої сировини. Це свідчить про здатність шовного матеріалу, модифікованого L-аргініном, прискорювати перехід ранового запалення на фібробластичну стадію.

На 14 добу після операції кількість нейтрофілних гранулоцитів залишається підвищеною тільки при використанні для шва кетгуту із баранячої сировини у 3.4 рази ($P < 0.02$). При застосуванні кетгуту зі свинячої сировини та його модифікованого L-аргініном варіанта число нейтрофілів достовірно не відрізняється від величини контрольної групи та на 58.8% ($P < 0.05$) перевищує дані групи з використанням кетгуту з баранячої сировини.

У цей же час кількість макрофагів залишається збільшеною при використанні для шва кетгуту з баранячої сировини у 6.8 рази ($P < 0.001$), при застосуванні кетгуту зі свинячої сировини – у 4.6 рази ($P < 0.001$), а також кетгуту зі свинячої сировини, модифікованого L-аргініном – у 4.2 рази ($P < 0.001$). При цьому кількість макрофагів при застосуванні кетгуту зі свинячої сировини та нитки, модифікованої L-аргініном, відповідно на 32.4% ($P < 0.02$) та 38.2% ($P < 0.001$) поступається даним серії з використанням кетгуту з баранячої сировини.

Кількість фібробластів підвищується також у серії з використанням для шва кетгуту із баранячої сировини на 28.7% ($P < 0.05$). При застосуванні кетгуту зі свинячої сировини, модифікованого L-аргініном, число фібробластів на 65.7% ($P < 0.001$) перевищує величину контрольної групи, та відповідно на 28.7% ($P < 0.01$) та на 44.2% ($P < 0.01$) перевищує результати серій, у яких застосовували кетгут з баранячої та свинячої сировини, що свідчить про потужну біостимулюючу дію цього шовного матеріалу на репаративні процеси у тканинах оперованої нирки.

На 30 добу після операції кількість нейтрофілних гранулоцитів не відрізняється від даних контрольної групи. Кількість макрофагів залишається збільшеною при використанні для шва кетгуту з баранячої сировини у 8.6 рази ($P < 0.001$). При застосуванні кетгуту зі свинячої сировини та нитки, модифікованої L-аргініном, кількість макрофагів відповідно на 76.7% ($P < 0.001$) та 75.6% ($P < 0.001$) поступається даним серії з використанням кетгуту з баранячої сировини. Отже, при використанні кетгуту з баранячої сировини відмічається затримка процесу ранового запалення на моноцитарно-макрофагальній стадії [5,12].

На 30 добу після операції кількість фібробластів є достовірно збільшеною тільки при використанні кетгуту з баранячої сировини на 37.3% ($P < 0.05$). При застосуванні кетгуту зі свинячої сировини та його модифікованого L-аргініном варіанта кількість фібробластів не перевищує результат контрольної групи. Це вказує, що біостимулююча дія модифікованої L-аргініном нитки обмежена в часі і відповідає періоду, необхідному для загоєння операційної рани, що попереджає можливість надлишкового рубцювання.

Висновки: Отже, отримані дані свідчать, що при застосуванні кетгуту зі свинячої сировини в більш ранній термін у порівнянні з кетгутом з баранячої сировини відмічається перехід на макрофагально-моноцитарну стадію ранового запалення. При використанні хірургічних ниток, модифікованих L-

аргініном, прискорюється перехід як на макрофагально-моноцитарну, так і на фібробластичну стадію ранового запалення. Проліферація фібробластів спостерігається у більш ранній термін (на сьому добу після нефротомії) у порівнянні з кетгутом з баранячої та свинячої сировини.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому планується прослідити зміни інших клітин тканевого регенерату тканин нирки при використанні різних видів кетгуту.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов. – Москва : Медицина, 1990. – 178 с.
2. Бабанин А.А. Новая рассасывающаяся хирургическая нить «Биофил» / А.А. Бабанин, А.Ш. Коротко, Р.Х. Гумеров // Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов : Мат. II Международ. конф. – Москва, 1995. – С. 305–306.
3. Бурлакова Е.Б. Биоантиоксиданты / Е.Б. Бурлакова // Рос. хим. журн. – 2007. – Т.51, №1. – С. 3–12.
4. Воспаление : руководство для врачей / Под ред. В.В. Серова, В.С. Паукова. – М. : Медицина, 1995. – 640 с.
5. Каланберз В.С. Реакция тканей на рассасывающиеся хирургические шовные материалы и ее практическое значение / В.С. Каланберз, И.В. Кузмина, Л.Э. Домбровска // Вестн. хир. – 1988. – №11. – С. 130–131.
6. Костенко В.А. Хирургический шовный материал будущего : конструктивные взаимоотношения нити и паравульнарных тканей / В.А. Костенко, Н.С. Скрипников, А.В. Липченко [и др.] // Актуальні проблеми сучасної медицини : Вісн. Української медичної стоматологічної академії. – 2006. – Т.6, №1–2. – С. 259–261.
7. Лігоненко О.В. Вплив хірургічних ниток, модифікованих етонісом, на морфометричні показники в паравульнарних тканинах оперованої товстої кишки собак / О.В. Лігоненко, Л.В. Грін, В.О. Костенко // Хірургія України. – 2003. – №1. – С. 66–69.
8. Пат. 39088 Україна, МПК(2009) А61L 17/00 Спосіб одержання резорбтивного біологічно активного шовного матеріалу / Гончар С.В., Проніна О.М., Костенко В.О. [та ін.] ; заявники і патентовласники Гончар С.В., Проніна О.М., Костенко В.О. [та ін.]. – № 200806857; заявл. 19. 05. 08; опубл. 10.02.09, Біол № 3.
9. Скрипников М.С. Вплив різних розсмоктувальних шовних матеріалів на вміст макроерічних сполук в оперованих нирках собак / М.С. Скрипников, В.О. Костенко, О.М. Проніна // Одеський мед. журн. – 2000. – № 1. – С. 18–19.
10. Скрипников Н.С. Методологические подходы к разработке новых хирургических рассасывающихся шовных материалов / Н.С. Скрипников, Е.Н. Пронина, А.С. Ставничий [и др.] // Вісн. пробл. біології і медицини. – 2005. – Вип. 2. – С. 7–10.
11. Eming S.A. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms // S.A. Eming, T. Krieg, J.M. Davidson // J. Invest. Dermatol. – 2007. – Vol.127, №3. – P. 514–525.
12. Forrester J.C. Sutures and wound repair / J.C. Forrester // Wound healing and wound infection. Theory and surgical practice. – N.Y., 1980. – P. 194–207.
13. Glaros T. Macrophages and fibroblasts during inflammation, tissue damage and organ injury / T. Glaros, M. Larsen, L. Li // Front. Biosci. – 2009. – Vol.14. – P. 3988–3993.
14. Teller P. The physiology of wound healing: injury through maturation / P. Teller, T.K. White // Surg. Clin. North Am. – 2009. – Vol. 89, №3. – P. 599–610.
15. de la Torre J.I. Wound Healing, Chronic Wounds / J.I. de la Torre, J.A. Chambers [Electronic resource]. – Updated: Oct 9, 2008. – eMedicine Online. – Access mode: <http://emedicine.medscape.com/article/1298452-overview>.

Надійшла 16.09.2011 р.

Рецензент: проф. С.А.Кашенко