

УДК 616 - 001. 4: 616 – 076. 5

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ПЕРВОЙ ФАЗЫ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА

С.М.Смотрин, к.м.н., доцент

Гродненский государственный медицинский университет



Смотрин Сергей Михайлович - доцент кафедры хирургических болезней №1 ГГМУ, к.м.н., врач-хирург высшей квалификационной категории. Хирургический стаж - 25 лет.

Определяющим моментом течения раневого процесса является эмиграция лейкоцитов в зону повреждения. Изучение этого процесса в эксперименте и клинической практике осуществляется цитологическими методами исследования [12, 18, 37]. Течение раневого процесса происходит в соответствии с универсальной закономерностью, которая выражается в строгой последовательности развития и смены цитологических элементов в ране при ее заживлении [13, 14].

Следует отметить, что цитологические методы не конкурируют с гистологическими методами. Гистологический препарат характеризуется тем, что в нем клеточные элементы находятся в определенном топографическом соотношении, что дает возможность представить их расположение в ткани. В цитологическом препарате-отпечатке топографических соотношений практически нет. Однако исследование регенерата при помощи цитологического метода может производиться неоднократно в течение суток, чего невозможно достичь гистологическим методом [18].

Широко применяемым методом исследования раневого экссудата является метод «раневых отпечатков», предложенный М.П. Покровской. Однако данный метод позволяет определить лишь

В статье приводится обзор литературы по применению цитологических методов диагностики первой фазы раневого процесса в медицинской практике.

Ключевые слова: первая фаза раневого процесса, цитологическая диагностика.

The article makes review of the literature on using the cytologizing methods of diagnosing the first phase on wounding process in medical practice.

Key words: the first phase of wounding process, cytologizing diagnosing.

относительное содержание клеточных элементов. При этом в препаратах нейтрофилы составляют 85-90% клеток, а 5-10% приходится на долю лимфоцитов и моноцитов [12].

Ряд исследователей для изучения цитологической картины и динамики изменения клеточных элементов в заживающей ране использует методики пункционной биопсии ран [18, 3]. Из глубины раны пункционным методом осуществляется забор содержимого с последующей фиксацией, окраской и изучением препаратов аналогично методу «раневых отпечатков» [21]. По мнению ряда авторов [1, 5, 8], при помощи метода «раневых отпечатков» и биопсий ран можно судить о характере морфологических изменений, состоянии неспецифических факторов защиты, эффективности хирургической обработки раны, определять течение фаз раневого процесса, а также уточнять показания и противопоказания к использованию лечебных мероприятий [6].

Однако рассмотренные методы имеют и ряд существенных недостатков. В препарат-отпечаток всегда попадают клеточные элементы из верхних слоев раны, которые избивают недифференцированными элементами соединительной ткани в виде различных переходных форм своего развития [18]. Не вызывает сомнения тот факт, что истинное представление о характере раневого процесса возможно только при последовательном сопоставлении цитологических данных, а отдельно взятая, выхваченная из цепи реакций картина может ввес-

ти в заблуждение, ибо одна и та же клеточная реакция имеет различное значение в зависимости от исходного фона [12]. Использование гистологических методов связано с систематической травматизацией раны [17].

В связи с вышеперечисленными недостатками метода «раневых отпечатков» и биопсий ран были разработаны другие цитологические методы, сущность которых состоит в искусственном повреждении кожи, на которое организм отвечает проявлением регенерационной способности, выражающейся закономерными и последовательными во времени реакциями, в том числе развитием раневого посттравматического воспаления. Наиболее известными из таких модельных методик оказались методы «кожного окна» по Rebusk и кожных камер. По мнению ряда исследователей [26, 27, 34], главным преимуществом методов «кожного окна» и кожных камер перед вышеописанными методиками является их асептичность, что позволяет изучить течение раневого процесса в «чистом» виде. Он основан на изучении цитологической картины препаратов, полученных после прикладывания к скарифицированной коже человека и животных покровных стекол [38, 40]. Классическая методика «кожного окна» по Rebusk заключается в следующем: на коже передней поверхности предплечья, после предварительной обработки этиловым спиртом, скарификатором снимают слой эпидермиса площадью 0,2-0,5 см². Рану покрывают стерильным стеклом, которое закрепляют лейкопластырем. Через 6 часов стекло заменяют. Второе стекло снимают через 24 часа от начала реакции. Полученные отпечатки фиксируют метиловым спиртом и окрашивают по Романовскому. Препараты просматривают под микроскопом с иммерсией, подсчитывая не менее 200-300 клеток [40].

У здоровых лиц [19, 20] эмиграция клеток на нижнюю поверхность стекол в течение первых 2 часов незначительна. В популяции преобладают нейтрофилы с единичными мононуклеарами. К 4-му часу количество клеток в экссудате увеличивается, при этом преобладают нейтрофильные лейкоциты (94%). В более поздние сроки возрастает эмиграция мононуклеаров, и к 12-му часу их количество составляет приблизительно половину всех клеток. Через 16 часов в клеточном экссудате преобладают мононуклеары, количество которых до-

стигает максимума к 24 часам (83,6%). Начиная с 32-часа изучение клеточного состава препаратов становится затруднительным, так как в отпечатках появляются фибробласты, свидетельствующие о завершении клеточной реакции. В препаратах «кожного окна» у здоровых лиц нейтрофилы в I фазе имеют четко выраженные сегментированные ядра и зернистую цитоплазму. Во II фазе появляются признаки дегенерации этих клеток: разрушение ядер, отсутствие зернистости, разрушение мембран. Макрофаги в I фазе асептического воспаления представлены моноцитами, не имеющими вакуолей и псевдоподий. Во II фазе эти клетки приобретают черты типичных активных макрофагов [9]. Клетки увеличиваются в размерах, имеют крупное ядро круглой, овальной или почкообразной формы с равномерным распределением хроматина. Цитоплазма с выраженной базофилией, иногда с мелкой азурофильной зернистостью. В цитоплазме многих клеток встречаются фагоцитные включения [19].

В 1966 году Satham C.M. et al. «модернизировали» метод «кожного окна», предложив использовать после скарификации кожи не предметные стекла, а камеры, заполняемые стерильными растворами. Использование этого метода позволило изучить динамику клеточной воспалительной реакции у человека и установить, что среди эмигрированных клеток нейтрофильные лейкоциты составляют 90-98% в течение первых 24 часов [28]. Кроме этого, было установлено, что протекание реакции лейкоинfiltrации в полости кожных камер у лабораторных животных идентично таковой у человека, но с более ранним началом инфицирования полостной жидкости [50].

Сфера применения вышеуказанных методов оказалась очень широкой: от создания моделей прижизненного изучения микроциркуляции в эксперименте [22, 25, 31, 46, 49], регуляции функциональной активности клеток воспалительного поля и их миграции в зону воспаления [48] до изучения реактивности организма при различных патологических состояниях, включая оценку течения I фазы раневого воспаления, в том числе и в хирургической практике [2, 4, 9, 34, 44, 45, 47]. Так, наиболее характерным признаком клинического улучшения течения раневого процесса является повышение процентного содержания мононуклеаров в препаратах. Клиническое ухудшение течения раневого

процесса сопровождается снижением относительного содержания мононуклеаров, появлением различных морфологически измененных клеток с повышенной или пониженной вакуолизацией цитоплазмы и раневой дегенерацией нейтрофилов [2, 9]. Однако методы «кожного окна» и кожных камер, используемые для оценки течения 1 фазы раневого процесса, имеют серьезные недостатки. Так, практическая ценность этих методов в значительной мере снижена в связи с тем, что подавляющее большинство данных по оценке раневого процесса было получено в эксперименте на животных [22, 32]. В то же время при клинических исследованиях 1 фазы раневого процесса при помощи метода «кожного окна» в препаратах обнаруживается наличие микроорганизмов, что свидетельствует о затруднении в поддержании асептичности в процессе исследования [4]. Кроме этого, при использовании методов «кожного окна» и кожных камер не выполняется одно из важнейших условий – стандартное воспроизведение травмы при скарификации. Даже современные дерматомы не позволяют произвести отделение только эпидермиса от дермы ввиду извилистого хода базальной мембраны. Я. Золтан указывает, что минимальная толщина расщепленного кожного лоскута, взятого дерматомом, составляет 0,1 мм [7]. Установлено, что присутствие покровного стекла в «кожном окне» вызывает преимущественное накопление моноцитов [51]. При использовании кожных камер, наоборот, отмечено отсутствие смены нейтрофильной фазы воспаления моноцитарной [33]. Установлено, что функциональная активность клеток экссудата в кожных камерах отличается от таковой в периферической крови [45]. Все это ведет к неадекватной оценке реакции асептического воспаления у хирургических больных [34, 44], а исследования 1 фазы раневого процесса при помощи этих методов обычно не выходят за пределы специальных клиник или эксперимента [18].

Следует отметить, что вышеописанные методы «раневых отпечатков», поверхностной биопсии ран, «кожного окна» по Rebusk и кожных камер также не позволяют проводить количественной оценки динамики лейкоинфильтрации в абсолютных цифрах. Поэтому и интерес исследователей к этим методам заметно снизился, а поиск более совершенных методик изучения первой фазы раневого процесса был продолжен. Главным в создании но-

вой модели по изучению 1 фазы раневого процесса стала разработка стандартного метода нанесения травмы. С этой целью были проведены исследования по отслойке эпидермиса от подлежащей дермы при помощи воздействия отрицательного давления с формированием кожно-вакуумных пузырей. Первые сообщения о возможности отслойки всех слоев эпидермиса по ходу базальной мембраны от подлежащей дермы у здорового человека с помощью воздействия отрицательного давления даны С. Slowey и U. Kiistala [42, 29]. Авторы предложили использовать раневую поверхность после отслойки вакуумом эпидермиса для изучения раневого процесса по методу кожного окна.

Однако в имеющихся работах с использованием вышеописанного метода [23, 24, 30, 36, 39, 41, 49] авторы не пошли дальше в изучении раневого процесса, чем создание метода нанесения стандартной травмы. Ими не была прослежена динамика эмиграции лейкоцитов через лишенную эпидермиса поверхность кожи в полость кожно-вакуумных пузырей. Эти исследования были проведены в 1987 г. А.А.Островским. В последующем изучение процесса эмиграции лейкоцитов в жидкость кожно-вакуумных пузырей позволило установить важную закономерность, что динамика изменения клеточного состава пузырной жидкости по своим параметрам соответствует 1 фазе раневого процесса [15, 16], а предлагаемый метод рекомендован как лабораторный метод оценки течения раневого процесса [16].

Литература

1. Батвинков Н.И. Цитология экссудата трофических язв, леченных фибринолизинном // Здравоохранение Белоруссии. – 1967. – №7. – С. 36-37.
2. Вихриев В.С., Глибин В.Н., Шевченко М.А. Динамика показателей дермоцитогамм и репаративные способности организма у обожженных // Вестник хирургии. – 1988. – Т. 140, № 4. – С. 68-71.
3. Воленко А.В. Профилактика послеоперационных осложнений ран // Хирургия. – 1998. – №9. – С. 64-67.
4. Глибин В.Н., Татеосов Г.И., Шевченко М.А. Динамика показателей «кожного окна» и изменение реактивности организма при травмах // Вестник хирургии. – 1990. – №12. – С. 39-41.
5. Девятов В.А. Оценка динамики раневого процесса // Хирургия. – 1998. – № 11. – С. 46-48.
6. Диагностика и лечение ранений / Под ред. Ю.Г. Шапошникова. – М.: Медицина, 1984. – 344 с.
7. Золтан Я. Пересадка кожи: Пер. с венгерского. – Будапешт: Изд-во АН Венгрии, 1984. – 303 с.
8. Камаев М.В. Инфицированная рана и ее лечение. – М.: Медицина. 1970. – 159 с.
9. Капелько М.А., Цветкова Е.И., Коровина Н.А. Использование метода «кожного окна» для характеристики асептической воспалительной реакции у детей // Педиатрия. – 1980. – №9. – С. 26-30.

10. Островский А.А., Наумов И.А., Цыркунов В.М. Клеточный состав жидкости пузырей насаживания // *Материалы 4-й Гродненской обл. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов. – Гродно, 1987. – С.62.*
11. Покровская М.П., Макаров М.С. Цитология раневого экссудата как показатель процесса заживления ран. – М.: Медгиз, 1942. – 42 с.
12. Раны и раневая инфекция / Под ред. академика АМН СССР М.П. Кузина. – М.: Медицина. 1981. – 687с.
13. Ракицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Мн.: Высш. шк., 1973. – 320с.
14. Саркисов Д.С. Очерки истории общей патологии. – М.: Медицина, 1988. – 336 с.
15. Смотрич С.М., Наумов И.А., Островский А.А. Новый подход к изучению течения первой фазы раневого процесса у больных с диабетической стопой // *Декабрьские чтения по неотложной хирургии: Сб. науч. тр. / Под ред. проф. Г.П.Шороха – Мн., - 1997. - Т.2. - С. 288-289.*
16. Смотрич С.М., Наумов И.А., Островский А.А. Лабораторный метод оценки и прогнозирования течения первой фазы раневого процесса // *Журн. Гродн. мед. ун-та. - 2003. - № 1. - С. 37-40.*
17. Стручков В.И., Григорян А.В., Гостищев В.К. Гнойная рана. – М.: Медицина, 1975. – 312 с.
18. Фенчин К.Н. Заживление ран. – Киев: Здоровья. 1979. – 173 с.
19. Фокина Н.Т., Деншиков Д.И. Изучение миграции лейкоцитов в зону экспериментального воспаления методом «кожного окна у здоровых лиц // *Проблемы гематологии и переливания крови. – 1970. - №4. – С. 51-56.*
20. Щербаков В.И., Макарова О.П. Миграция лейкоцитов и показатели НСТ-теста при острых и затяжных формах пневмонии // *Врачебное дело. – 1986. - №12. – С. 72-75.*
21. Фомин Н.Н. Раневое отделяемое – показатель хода заживления ран // *Воен.-мед. журн. – 1974. - №8. – С.71-74*
22. Borel J.F., Feurer C.A. In-vivo effects of anti-inflammatory and other drugs on granulocyte emigration in the rabbit skin collection chamber // *J. Pathol. – 1978. –Vol. 124, №2. – P.85-93.*
23. Bielfeld V.C., Holle A., Mielke V. Chemotactic activity of IL-1 beta and NAP-1/IL-8 in human suction blisters // *Arch. Dermatol. Res. – 1991. – Vol.283. – P.56-57.*
24. Dubertret L., Lebreton C., Touraine R. Inhibition of neutrophil migration by tretinoin and its main metabolite // *Brit. J. Dermatol. – 1982. – Vol.107.- P.681-685.*
25. Endrich B., Hammersen F., Messmer K. Microvascular ultrastructure in non-freezing cold injuries // *Res. Exp. Med. Berl. – 1990. – Vol. 190, №5. – P. 365-379.*
26. Ferencik M., Stvrtnova V. Endogenous control and modulation of inflammation // *Folia. Biol. Praha. – 1996. – Vol. 42, №1-2. – P.47-55.*
27. Furukawa F., Huff J.C., Weston W.L., Norris D.A. Serum-free serial culture of adult human keratinocytes from suction-blister roof epidermis // *J. Invest. Dermatol. – 1987. – Vol. 89. – P.460-463.*
28. Hellum K.B., Solberg C.O. Human leucocyte migration: studies with an improved skin chamber technique // *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. C. – 1977. – Vol. 85, №6. – P 413-423.*
29. Kiistala U., Mustakallio K.K. In-vivo separation of epidermis by production of suction blisters // *Lancet. – 1964. – Vol. 1, №7348. – P.1444-1445.*
30. Kenney R.T., Rangdaeng S., Scollard D.M. Skin blister immunocytology. A new method to quantify cellular kinetics in vivo // *J. Immunological Methods. – 1987. – Vol.97. – P.101-110.*
31. Lerner A.B. Repopulation of pigment cells in patients with vitiligo // *Arch. Dermatol. – 1988. – Vol. 124. – P.1701-1702.*
32. Lehr H.A., Leunig M. et al. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice // *Am. J.Pathol. – 1993. – Vol. 143, №4. – P.1055-1062.*
33. Matzner Y. // *Neutrophil function studies in clinical medicine // Transfus. Med. Rev. – 1987. – Vol. 1, №3. – P. 171-181.*
34. Morris J.S., Meakins J.L., Christou N.V. In vivo neutrophil delivery to inflammatory sites in surgical patients. Correlation with in vitro neutrophil chemotaxis and adherence // *Arch. Surg. – 1985. – Vol. 120, №2. – P.205-209.*
35. Miler J., Holub M. et al. Skin-window study on the migration of leukocytes of newborns and infants // *Folia. Microbiol. Praha. - 1979. – Vol. 24, №5. – P.408-414.*
36. Oikarinen A.I., Viinikka I., Rytsala H. Et al. Prostacyclin, thromboxane and prostaglandin F2a in suction-blister fluid of human skin // *Life Sci. – 1981. – Vol.29. – P 391-396.*
37. Postlethwaite A.F., Kang A.H. Fibroblast // *Inflammation basic principles and clinical correlates/ Ed. J/ Gallin – 17 –N. Y. Raven Press, 1988.- P. 577-597.*
38. Rebeck J.W., Crowley J.H. A method studying leukocytic functions «in vivo» // *Ann. N.Y.Acad. Sci. – 1955. - №59. – P757.*
39. Rommain M., Brossard C., Piron M.A. et al. A skin suction blister model in hairless rats: application to the study of anti-inflammatory and immunomodulatory drugs // *Int. J. Immunopharmacol. – 1991. – Vol.13, №4. – P.379-384.*
40. Smith J.L., Blythe M.J., Patterson L.T. The avian inflammatory response: adaptation and utilization of skin windows // *Poult. Sci. – 1975. – Vol. 54, №1. – P. 183-190.* Southam C.M., Levin A.G. A quantitative Rebeck technique // *Blood. – 1966. – Vol.27. – P. 734-738.*
41. Schafer Korting M., Korting H.G., Lukacs A. Et al. Levels of intraconazole in skin blister fluid a single oral dose and during repetitive administration // *J. Am. Acad. Dermatol. – 1990. – Vol.22. – P.211-215.*
42. Slowey C., Leider M. Abstract of a preliminary report : the production of bullae by quantitated suction // *Arch. Derm. – 1961. – Vol.83. – P.1029.*
43. Southam C.M., Levin A.G. A quantitative Rebeck technique // *Blood.- 1966.- Vol.- 27.- P. 734-738.*
44. Tellado J.M., Ciannias B. Et al. Anergic patients before elective surgery have enhanced nonspecific host-defense capacity // *Arch. Surg. – 1990. – Vol. 125, №1. – P. 49-53.*
45. Tellado J.M., McGowen G.C., Christou N.V. Decreased polymorphonuclear leukocyte exudation in critically ill anergic patients associated with increased adhesion receptor expression / *Crit. Care. Med. – 1993. – Vol.21, № 10. – P.1496-1501.*
46. Teraoka S., Sugawara M. Et al. Microscopic observation of leukocyte kinesis in the vascular bed during hemodialysis using the rabbit ear chamber technique // *Int. J. Artif. Organs. – 1989. – Vol.12, №4. – P. 229-233.*
47. Wandall J.H. Leucocyte mobilization and function in vitro of blood and exudative leucocytes after inguinal herniotomy // *Br. J.Surg. – 1982. – Vol. 69, №11. – P. 669-672.*
48. Wasniewski J., Matusiewicz R. Zdolność leukocytów tkankowych do migracji in vivo w soli fizjologicznej i surowicy autologicznej u chorych z bakteryjnymi zapaleniami płuc // *Pneumonol. Pol. – 1987. – Vol. 55, №7-8. – P.348-351.*
49. Wisselink M.A., Koeman J.P., Willemse T. Leukocyte mobilization to skin lesions in dogs // *Am. J. Vet. Res. – 1993. – Vol. 54, №10. – P. 1598-1601.*
50. Wright J.D., Ma T., Chu C.K., Boudinot F.D. Pharmacokinetics of 1- (2-deoxy-2-fluoro-beta-L-arabinofuranosyl)-5-methyluracil (L-FMAU) in rats // *Pharm. Res. – 1955. – Vol.12, №9. – P.1350-1353.*
51. Zimmerli W., Gallin J.I. Monocytes accumulate on Rebeck skin window coverslips but not in skin chamber fluid. A comparative evaluation of two in vivo migration models // *J. Immunol. Methods. – 1987. – Vol.96, №1. – P.11-17.*