

УДК 616.155.34:617-089

ВЛИЯНИЕ СЕКРЕТОРНЫХ ПРОДУКТОВ НЕЙТРОФИЛОВ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ЗАЖИВЛЕНИЯ ИНФИЦИРОВАННЫХ ХИРУРГИЧЕСКИХ РАН

Третякова И.Е., Григорян А.М., Сохова А.З., Колхидова З.А., Едзиева Р.А., Базеева С.А.

*ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская Государственная медицинская академия Минздрава России»,
Владикавказ, e-mail: tretjakova.60@mail.ru*

Проведен анализ влияния аутологических супернатантов активированных латексом нейтрофилов крови на функциональную активность фагоцитов в поврежденных тканях, на бактериологическое состояние раны, на регенеративные процессы в ране. Оценку эффективности местного применения аутологических нейтрофилокинов проводили у 30 больных с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей туловища и конечностей. Результаты исследования показали, что местное применение аутологических нейтрофилокинов влияет на характер клеточного состава раневого отделяемого у больных с раневой хирургической инфекцией, достоверно снижая количество нейтрофилов и увеличивая содержание макрофагов, устраняет развитие дисбаланса в функциональной активности гранулоцитов и макрофагов в ране (фагоцитарной, НСТ-редуцирующей, лизосомальной), улучшает бактериологическое состояние раны, обеспечивает очищение раны, способствует развитию полноценной регенерации поврежденных тканей.

Ключевые слова: аутологичные нейтрофилокины, инфицированные хирургические раны, функциональная активность фагоцитов, бактериологическое состояние раны, регенерация поврежденных тканей

THE INFLUENCE OF SECRETORY PRODUCTS OF NEUTROPHILS IN THE INTENSITY OF THE HEALING OF INFECTED SURGICAL WOUNDS

Tretjakova I.E., Grigoryan A.M., Sohova A.Z., Kolhidova Z.A., Edzieva R.A., Bazaeva S.A.

North Osetian State Medical Academy (NOSMA), Vladikavkaz, e-mail: tretjakova.60@mail.ru

We have done the analysis of the influence of autologous supernatant of activated neutrophils latex blood on the functional activity of phagocytes in the damaged tissues, on the bacteriological condition of the wound, on the regenerative processes in the wound. Evaluation of the effectiveness of local application of autologous neutrophilokine was performed in 30 patients with purulent-inflammatory diseases of the soft tissues of the body and limbs. The results showed that local application of autologous neutrophilokine influences the nature of cell composition of wound patients with traumatic surgical infection, significantly reducing the number of neutrophils and increasing macrophage content, eliminates the development of an imbalance in the functional activity of granulocytes and macrophages in the wound (phagocytic, NST-reduced, lysosomal), improves the bacteriological condition of the wound, provides cleansing wounds, promotes the development of a full regeneration of damaged tissues.

Keywords: autologous neutrophilokine, infected surgical wounds, the functional activity of phagocytes, the bacteriological status of the wounds, regeneration of damaged tissues

Проблема заживления и лечения ран была и остается одной из самых актуальных проблем современной медицины [1]. Инфекционные осложнения ран являются не менее важной проблемой хирургии [1]. Одной из причин развития микрофлоры в ране является нарушение как общего, так и местного иммунного статуса. Недооценка важности диагностики и коррекции нарушений функции иммунной системы может приводить к развитию иммунодефицитных состояний и ухудшению течения патологического процесса [1, 6]. Работа посвящена оценке роли секреторных продуктов нейтрофилов в регуляции локальных реакций воспаления и иммунитета. Известно, что выделяемые нейтрофилами биологически активные продукты способны существенно влиять на протекание различных физиологических и патологических процессов в организме [3, 5]. При этом изучение механизмов индукции

и торможения местных иммунных реакций занимает достойное место в комплексе современных клинко-иммунологических исследований.

Целью исследования было изучение влияния аутологических супернатантов активированных латексом нейтрофилов крови на функциональную активность фагоцитов в поврежденных тканях, на бактериологическое состояние раны, на регенеративные процессы в ране.

Материалы и методы исследования

Выделение секреторных продуктов гранулоцитов с использованием микросфер латекса проводили с помощью метода, разработанного И.И. Долгушиным и соавт., 1987 [2]. Оценку эффективности местного применения супернатантов аутологических нейтрофилов крови проводили у 30 больных с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей туловища и конечностей, для чего всех больных обследовали дважды: на 5-6 сутки и 13-14 сутки после оперативного вмешательства (определяли клеточ-

ный состав раневого отделяемого, функциональную активность фагоцитов в ране). Оценку уровня бактериальной обсемененности раны проводили в 1 сутки и на 13-14 сутки после поступления больного в стационар. После проверки аутологичных супернатантов нейтрофилов на стерильность и иммуотропную активность больным опытной группы на фоне комплексного лечения по общепринятой схеме местно назначали выделенные аутологичные секреторные продукты нейтрофилов пятикратно с интервалом в 24 часа в дозе 0,5-1,0 мл супернатанта, разведенного в 4,0 мл стерильного изотонического раствора NaCl. Доза аутологичных нейтрофилокинов определялась уровнем активности содержащихся в них иммуностимулирующих факторов при сравнении на моноцитах донора со стандартными суммированными донорскими супернатантами гранулоцитов, имеющими установленный уровень иммуностимулирующей активности. Выбор сроков начала локального применения аутологичных нейтрофилокинов обусловлен тем, что на 7 сутки наблюдения у больных с раневой хирургической инфекцией сохранялся дисбаланс в функциональной активности фагоцитов в ране, отмечалось развитие неполноценной регенерации поврежденных тканей, не снижался уровень инфицирования ран. Помимо этого, при проверке стерильности полученных супернатантов нейтрофилов должно пройти не менее 7 суток. Группу сравнения составили 20 пациентов с аналогичной патологией, которые получали лечение по общепринятой схеме. В качестве плацебо использовали изотонический раствор NaCl в аналогичной дозе и кратности применения. Клиническое испытание было рандомизированным. Опытная группа и группа сравнения были сопоставимы по возрасту, полу, локализации гнойного раневого процесса, тяжести заболевания, сопутствующей патологии. Состояние раны у больных с раневой хирургической инфекцией оценивали при помощи цитологического исследования отделяемого из раны [4]. Изучали показатели функциональной активности нейтрофилов и макрофагов, выделенных из раны (фагоцитарной, НСТ-редуцирующей, лизосомальной) [3, 5]. Кроме того, были проведены бактериологические методы исследования, заключающиеся в идентификации возбудителей раневой инфекции и определении их чувствительности к антибактериальным препаратам, а также количественное определение содержания микроорганизмов (КОЕ) в 1,0 мл раневого отделяемого.

Полученные результаты исследований были подвергнуты статистической обработке с использованием пакетов статистических программ STADIA 6.3, Statistica for Windows 5.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования показали, что аутологичные нейтрофилокины влияют на характер клеточного состава раневого отделяемого у больных с раневой хирургической инфекцией, достоверно снижая количество нейтрофилов и увеличивая содержание макрофагов, что свидетельствует о происходящих в ране процессах регенерации, так как под влиянием ряда медиаторов макрофагов

формируется грануляционная ткань [1, 6]. Напротив, в группе сравнения на 13-14 сутки после оперативного вмешательства сохранялось высокое содержание гранулоцитов на фоне низкого уровня макрофагов, что указывает на сохранение остроты воспаления и наличие неполноценной регенерации поврежденных тканей (табл. 1).

Оценка функциональной активности фагоцитов в ране у больных в группе сравнения с учетом общепринятых нормальных значений естественной резистентности организма выявила нарушение иммунореактивности этих клеток в динамике воспалительного процесса: угнетение фагоцитарной реактивности макрофагов, высокие значения кислородзависимого метаболизма поли- и мононуклеарных фагоцитов, которые сохранялись на протяжении всего периода наблюдения; снижение функционального резерва и лизосомальной активности изучаемых клеток. Отсутствие статистически значимых изменений между показателями первого и второго обследования свидетельствовало о сохраняющемся дисбалансе в функциональной активности фагоцитов в ране у больных в группе сравнения на протяжении всего периода наблюдения. Местное применение аутологичных нейтрофилокинов у больных с раневой хирургической инфекцией устраняло развитие дисбаланса в функциональной активности гранулоцитов и макрофагов в ране, способствовало развитию полноценной регенерации поврежденных тканей (табл. 2, 3).

После установленного иммуномодулирующего влияния аутологичных секреторных продуктов ПМЯЛ на показатели местного иммунитета интересно было изучить бактериологическое состояние раны у больных после проведенной локальной иммунокоррекции, ибо можно было предположить, что секреторные продукты нейтрофилов, устраняя развитие дисбаланса в функциональной активности фагоцитов в ране, влияют на уровень бактериальной обсемененности поврежденных тканей.

Бактериологическое состояние раны изучали дважды: в 1 сутки и на 13-14 сутки после поступления больного в стационар. При бактериологическом исследовании мы проводили качественное и количественное изучение раневой микрофлоры.

Результаты исследований показали, что в 1 сутки после поступления в стационар у больных опытной группы и группы сравнения были выделены стафилококки: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* и стрептококки: *Streptococcus pyogenes*.

Таблица 1

Влияние аутологичных нейтрофилокинов на клеточный состав раневого отделяемого у больных с раневой хирургической инфекцией (M ± m)

Показатели клеточного состава раневого отделяемого	Группа сравнения		Больные, получавшие местно аутонейтрофилокины	
	5-6 сутки n = 10	13-14 сутки n = 10	5-6 сутки n = 11	13-14 сутки n = 11
Лейкоциты (10 ⁶ /мл раневого отделяемого)	4.19 ± 0.92	2.6 ± 0.81	4.8 ± 1.41	1.29 ± 0.16*
Нейтрофилы (%)	82.0 ± 2.13	65.9 ± 3.51	86.0 ± 2.09	43.7 ± 2.62*, **
Нейтрофилы (10 ⁶ /мл)	3.48 ± 0.75	1.84 ± 0.67	4.14 ± 1.25	0.58 ± 0.09*
Макрофаги (%)	10.7 ± 1.49	16.7 ± 2.16	8.7 ± 1.55	40.8 ± 3.37*, **
Макрофаги (10 ⁶ /мл)	0.39 ± 0.09	0.4 ± 0.12	0.35 ± 0.08	0.52 ± 0.06
Лимфоциты (%)	8.25 ± 1.79	17.4 ± 2.87	5.9 ± 1.42	15.4 ± 2.24*
Лимфоциты (10 ⁶ /мл)	0.38 ± 0.14	0.42 ± 0.12	0.28 ± 0.09	0.19 ± 0.04

Примечание. * – достоверность различий показателей внутри группы больных (между данными первого и второго обследования); ** – достоверность различий показателей первых и повторных исследований разных групп больных. Использован критерий Вилкоксона.

Таблица 2

Влияние аутологичных нейтрофилокинов на функциональную активность нейтрофилов в ране у больных с раневой хирургической инфекцией (M ± m)

Показатели функциональной активности нейтрофилов в ране	Группа сравнения		Больные, получавшие местно аутонейтрофилокины	
	5-6 сутки n = 10	13-14 сутки n = 10	5-6 сутки n = 11	13-14 сутки n = 11
Активность фагоцитоза (%)	32.6 ± 3.91	60.2 ± 3.03*	63.3 ± 7.49**	44.6 ± 3.79**
Интенсивность фагоцитоза (у.е.)	0.81 ± 0.14	1.21 ± 0.15	1.26 ± 0.22	1.75 ± 0.15
Фагоцитарное число (у.е.)	2.58 ± 0.35	2.03 ± 0.24	2.14 ± 0.35	4.0 ± 0.27*, **
Спонтанный НСТ-тест, активность (%)	60.0 ± 9.02	70.9 ± 7.93	69.5 ± 8.04	47.7 ± 2.84
Спонтанный НСТ-тест, индекс (у.е.)	0.62 ± 0.1	0.81 ± 0.1	0.76 ± 0.1	0.51 ± 0.04
Индукцированный НСТ-тест, активность (%)	66.7 ± 9.95	62.7 ± 7.11	70.4 ± 8.36	66.0 ± 3.52
Индукцированный НСТ-тест, индекс (у.е.)	0.7 ± 0.11	0.72 ± 0.1	0.86 ± 0.15	0.7 ± 0.04
Функциональный резерв	1.26 ± 0.23	0.97 ± 0.12	1.23 ± 0.24	1.45 ± 0.07**
Лизосомальная активность (у.е.)	220.9 ± 12.34	72.8 ± 8.25*	312.4 ± 20.81**	289.5 ± 18.62**

Примечание. * – достоверность различий показателей внутри группы больных (между данными первого и второго обследования); ** – достоверность различий показателей первых и повторных исследований разных групп больных. Использован критерий Вилкоксона.

Таблица 3

Влияние аутологичных нейтрофилокинов на функциональную активность макрофагов в ране у больных с раневой хирургической инфекцией (M ± m)

Показатели функциональной активности макрофагов в ране	Группа сравнения		Больные, получавшие местно аутонейтрофилокины	
	5-6 сутки n = 10	13-14 сутки n = 10	5-6 сутки n = 11	13-14 сутки n = 11
Активность фагоцитоза (%)	36.6 ± 4.1	28.8 ± 3.37	37.2 ± 3.13	57.6 ± 4.96*, **
Интенсивность фагоцитоза (у.е.)	1.11 ± 0.18	0.67 ± 0.11	1.12 ± 0.15	2.16 ± 0.3*, **
Фагоцитарное число (у.е.)	3.1 ± 0.48	2.33 ± 0.2	2.98 ± 0.29	3.77 ± 0.41**
Спонтанный НСТ-тест, активность (%)	63.0 ± 10.52	71.0 ± 7.99	74.6 ± 6.34	41.3 ± 4.31*, **
Спонтанный НСТ-тест, индекс (у.е.)	0.69 ± 0.13	0.79 ± 0.08	0.9 ± 0.08	0.42 ± 0.04*, **
Индукцированный НСТ-тест, активность (%)	66.3 ± 9.04	59.5 ± 5.3	67.2 ± 7.82	77.7 ± 5.53
Индукцированный НСТ-тест, индекс (у.е.)	0.71 ± 0.1	0.77 ± 0.09	0.79 ± 0.1	0.86 ± 0.06
Функциональный резерв	1.29 ± 0.2	0.95 ± 0.12	0.95 ± 0.13	2.12 ± 0.26*, **
Лизосомальная активность (у.е.)	67.2 ± 12.74	62.9 ± 7.65	86.9 ± 11.83	167.6 ± 17.1*, **

Примечание. * – достоверность различий показателей внутри группы больных (между данными первого и второго обследования); ** – достоверность различий показателей первых и повторных исследований разных групп больных. Использован критерий Вилкоксона.

Таблица 4

Влияние аутологических нейтрофилокинов на количество микроорганизмов в 1,0 мл раневого отделяемого у больных с раневой хирургической инфекцией ($M \pm m$)

Показатель обсемененности ран	Группа сравнения n = 10		Больные, получавшие местно аутонейтрофилокины n = 10	
	1 сутки	13-14 сутки	1 сутки	13-14 сутки
Общее количество микроорганизмов в 1,0 мл раневого отделяемого у всех больных в группе	$2.5 \cdot 10^6 \pm 1.6 \cdot 10^6$	$5.3 \cdot 10^6 \pm 1.8 \cdot 10^6$	$2.2 \cdot 10^6 \pm 1.3 \cdot 10^6$	$1.0 \cdot 10^5 \pm 9.9 \cdot 10^4$ *

Примечание. * – достоверность различий показателей внутри группы больных (между данными первого и второго обследования). Использован критерий Вилкоксона.

На 13-14 сутки лечения в стационаре, после проведения у больных способа локальной иммунокоррекции с помощью аутологических нейтрофилокинов получена следующая картина микробного пейзажа. Уменьшилось количество больных с обнаруженным золотистым стафилококком, не зарегистрировано ни одного случая повторного инфицирования ран. При этом увеличилось количество пациентов, у которых отделяемое из раны было незначительным, оно имело серозный характер, рана выполнялась яркими грануляциями. У больных группы сравнения содержание в раневом отделяемом *Staphylococcus aureus* сохранялось на исходном уровне, а также присоединялась Грам (-) микрофлора (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*). Это сопровождалось увеличением количества гнойного отделяемого из раны. В ране отмечались единичные участки некроза. Грануляции становились вялыми, бледными, тусклыми, медленно выполняли полость раны.

При количественной оценке бактериологического состояния ран между исследуемыми группами больных не было выявлено достоверной разницы в исходных значениях. Анализ количественного изучения раневой микрофлоры при повторном обследовании обнаружил, что в опытной группе в 3 и более раза уменьшилось количество пациентов с критическим уровнем бактериальной обсемененности ран 10^5 и более микробных клеток/1,0 мл раневого отделяемого. Тогда как в группе сравнения количество больных с критическим уровнем бактериальной обсемененности раны возросло более чем в 3 раза. Общее количество микроорганизмов в 1,0 мл отделяемого из раны у больных опытной группы достовер-

но снизилось более чем в 20 раз по сравнению с исходными данными и более чем в 50 раз по сравнению с данными повторного обследования в группе сравнения (табл. 4).

Таким образом, при проведении у больных с раневой хирургической инфекцией локальной иммунокоррекции с помощью аутологических нейтрофилокинов уменьшался уровень бактериальной обсемененности ран, не развивалась вторичная инфекция.

Заключение

Местное применение аутологических нейтрофилокинов у больных с раневой хирургической инфекцией увеличивает количество макрофагов в ране, устраняет развитие дисбаланса в функциональной активности гранулоцитов и макрофагов в ране, улучшает бактериологическое состояние раны, обеспечивает очищение раны, способствует развитию полноценной регенерации поврежденных тканей.

Список литературы

1. Военно-полевая хирургия. Национальное руководство [под ред. И.Ю. Быкова, Н.А. Ефименко, Е.К. Гуманенко]. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 815 с.
2. Долгушин И.И., Зурочка А.В., Власов А.В. Способ получения иммуностимулирующих нейтрофилокинов // Патент России № 1536977.1987.
3. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. – М.: Изд-во РАМН, 2009. – 204 с.
4. Камаев М.Ф. Инфицированная рана и ее лечение. – М.: Медицина, 1970. – 159 с.
5. Третьякова И.Е., Долгушин И.И., Зурочка А.В. Влияние секреторных продуктов активированных нейтрофилов на морфологический состав и функциональную активность клеток перитонеального экссудата в динамике воспаления стафилококковой этиологии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2004. – Том 137, № 2. – С. 198–201.
6. Хаитов Р.М. Иммунология. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 521 с.