

**«УТВЕРЖДАЮ»**  
Директор  
Федерального Государственного Учреждения  
«Института хирургии им. А.В.Вишневского»  
академик РАМН



В.Д.Федоров

**Отчет**  
по теме: «Изучение влияния 1,3-диэтилбензимидазолия трийодида  
(Стелланина) на клеточные и внутриклеточные процессы репаративной  
регенерации в ране»

Москва – 2008г.

## ГЛАВА I

### Процессы репаративной регенерации в ранах при местном лечении мазью СТЕЛЛАНИН-ПЭГ.

#### Электронно-микроскопическое исследование.

##### *Цель исследования*

Определить влияние мази Стелланин-ПЭГ на структурно-функциональное состояние клеток раны.

##### *Материал исследования*

Биопсийный материал из гнойных ран 4 больных, находящихся на лечении в отделении ран и раневой инфекции ФГУ «Института хирургии им. А.В. Вишневского Росмедтехнологий», в процессе лечения мазью Стелланин-ПЭГ.

##### *Методы исследования*

Проведено морфологическое (свето-микроскопическое и электронно-микроскопическое) исследование образцов ткани гнойной раны. Исследование проводили до лечения Стелланином-ПЭГ, на 1, 2, 3, 4, 5 и 8 сутки лечения мазью. Тонкие срезы (толщина 100-200 нм) исследовали в электронном микроскопе Philips CM 10. На всех сроках исследования подсчитывали количество полиморфно-ядерных лейкоцитов, макрофагов, фибробластов и сосудов. Подсчет проводили в 20 произвольно выбранных полях зрения площадью 100 мм<sup>2</sup> каждое при увеличении  $\times 1000$  (иммерсия) с вычислением среднего арифметического.

#### Количество препаратов исследованных в световом и электронном микроскопе

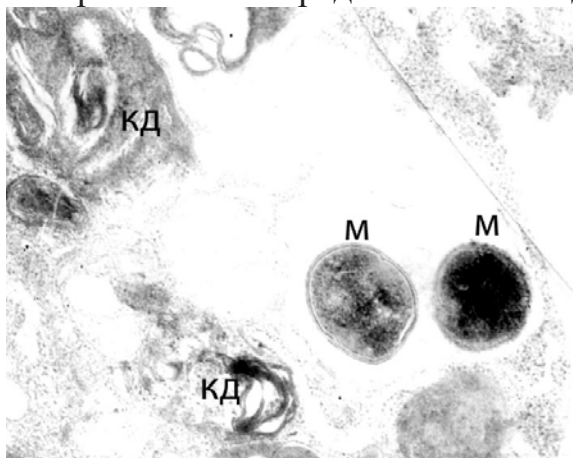
Сутки	Кол-во блоков - полутонких срезов для светооптического исследования	Кол-во блоков отобранных для электронно-микроскопического исследования	Кол-во сеточек (препараты для электронно-микроскопического исследования)
До лечения	30	9	15
1	10	3	5
2	20	6	10
3	10	3	5
4	30	9	15
5	10	3	5
8	20	6	10
<b>Всего</b>	<b>130</b>	<b>39</b>	<b>65</b>

##### *Результаты исследования*

*До лечения* гистологическая картина была типичной для гнойной вяло заживающей раны. Поверхность ран была густо инфильтрирована лейкоцитами. Среди клеточного детрита определяли микробы, многие из которых по ультраструктурным признакам сохраняли жизнеспособность

(рис.1). Грануляционная ткань отечна. Отмечали значительные гемодинамические расстройства – просветы сосудов резко расширены, заполнены эритроцитами, стенки утолщены (рис 2). Часто в такой вяло гранулирующей ране отмечали плазматические клетки (рис. 3).

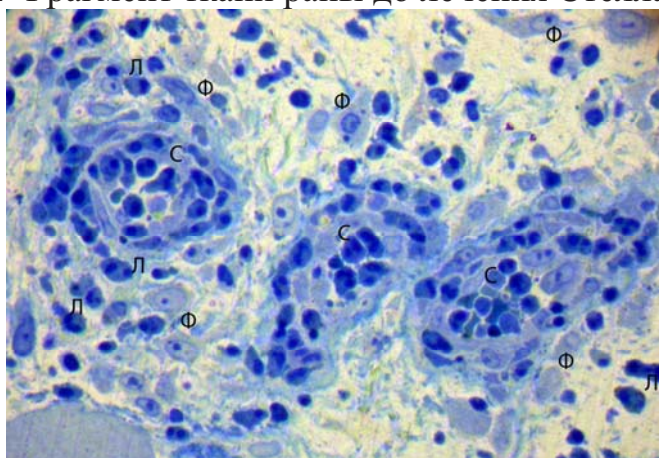
Рис. 1. Микробные тела среди клеточного детрита



М – микробные тела, кд – клеточный детрит

Ув. 16500

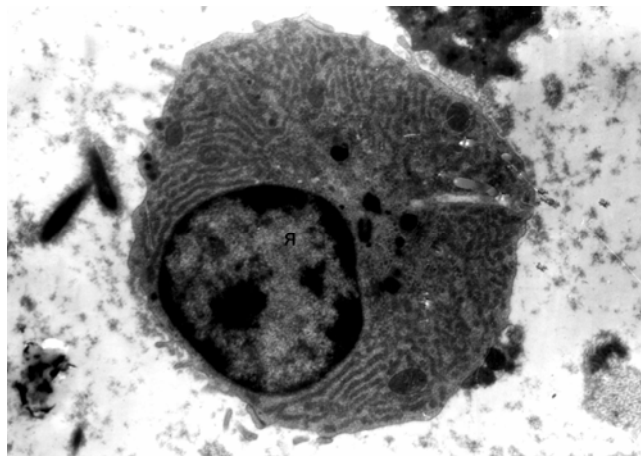
Рис. 2 Фрагмент ткани раны до лечения Стелланином-ПЭГ



Тромбоз сосудов (с), отек межучточного вещества и инфильтрация лейкоцитами (л). Ф – фибробласты

Ув. 400

Рис. 3 Плазматическая клетка

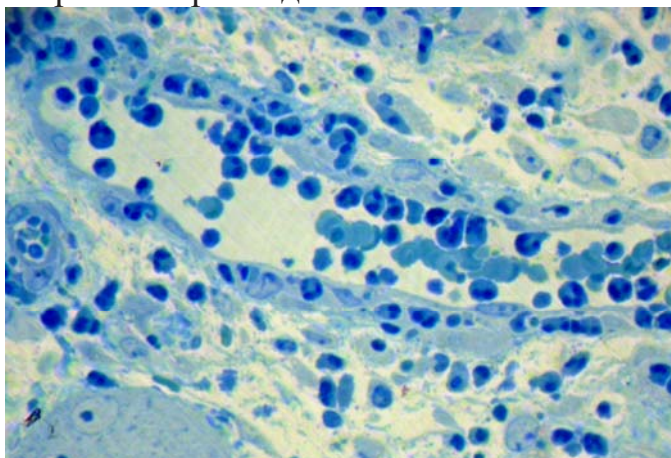


Я – ядро клетки

Ув. 10000

Повышается проницаемость сосудистой стенки, что приводит к плазматическому пропитыванию экстравазального пространства и развитию отека ткани. В связи с местным расширением сосудов возникал стаз клеток крови с характерным краевым стоянием лейкоцитов (маргинация) и выход их из кровеносного русла (рис. 4). В зоне воспаления замедлялся кровоток и усиливалась сосудистая проницаемость сосудов. В эндотелиальных клетках происходит ряд изменений: изменяется цитоскелет клеток и межклеточные контакты, повреждается эндотелий с лизисом и отслойкой или происходит отслойка эндотелия без лизиса.

*Рис. 4* Фрагмент раны до лечения Стелланином-ПЭГ



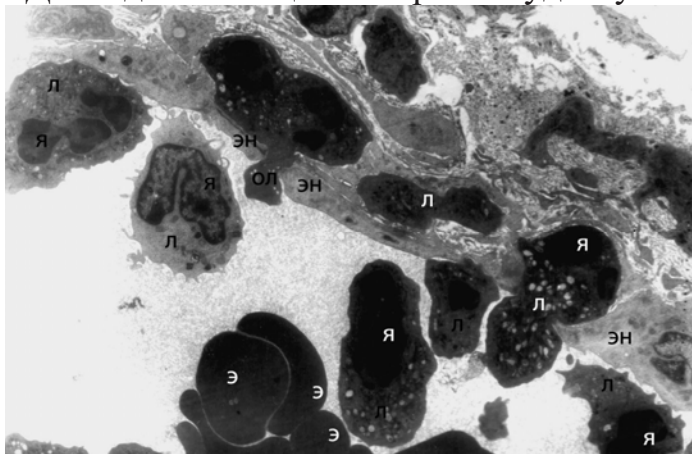
Крупный сосуд грануляционной ткани с выраженным краевым стоянием лейкоцитов  
Ув.400

При электронно-микроскопическом исследовании были зафиксированы стадии диапедеза лейкоцитов через сосудистую стенку (рис. 5). После прикрепления к эндотелию нейтрофилы выпускают цитоплазматический отросток в межэндотелиальное пространство и выходят в экстравазальное пространство. Лейкоциты, особенно нейтрофилы, могут повреждать эндотелиальные клетки, а повреждение эндотелия дает возможность лейкоцитам быстро выходить из сосуда в ткань. Базальный слой сосудов был значительно увеличен за счет плазматического пропитывания.

Попадая в ткань полиморфно-ядерные лейкоциты должны в полной мере выполнять свои функции – фагоцитоз, а также выделение в среду цитокинов – лизосомальных протеаз, простагландинов, лейкотриенов и др. Основной функцией нейтрофилов является разрушение возбудителей инфекции, видоизмененных клеток и тканей, а также регулирование функций других клеток. Выполняют свои функции только клетки, находящиеся в активном состоянии, а активация нейтрофилов происходит при переходе из крови в очаг воспаления.



*Рис.5* Диapedез лейкоцитов через сосудистую стенку



Эн – эндотелиоцит, л – лейкоцит, ол – отросток лейкоцита, я – ядро, э – эритроцит  
Ув. 6500

Однако при электронно-микроскопическом исследовании фрагментов ткани из ран были найдены нейтрофильные полиморфно-ядерные лейкоциты с большим количеством специфических гранул в цитоплазме, но фагоцитарная активность клеток не была выражена (рис. 6).

В ранах были обнаружены многоядерные гигантские клетки (рис. 7). Эти клетки называли «гигантскими клетками инородных тел», они встречаются не только при наличии инородного тела, но и при хронических воспалительных процессах и представляют собой симпласты содержащие несколько ядер. Установлено, что многоядерные гигантские клетки происходят от слияния мононуклеарных фагоцитов и обладают высокой метаболической активностью (Kreipe H. et al., 1988).

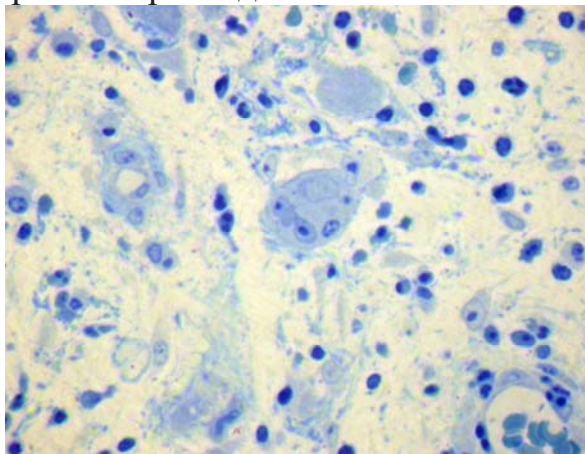
*Рис. 6* Нейтрофильные полиморфноядерные лейкоциты до лечения ран Стелланином-ПЭГ



Я – ядро, гр – специфические гранулы

Ув. 10000

*Рис. 7* Фрагмент раны до лечения Стелланином-ПЭГ

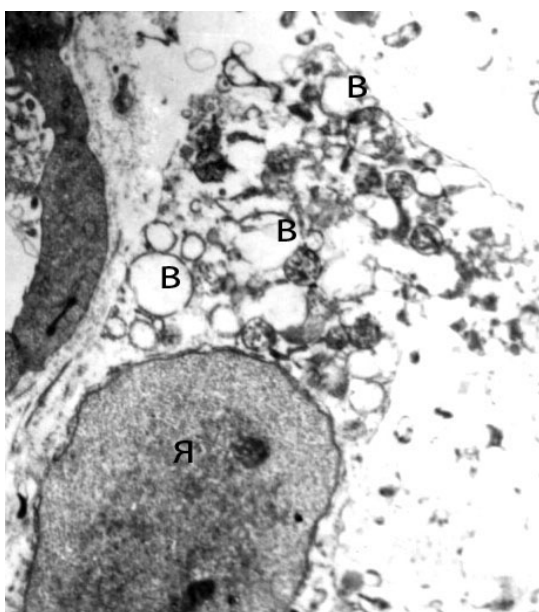


Многоядерная гигантская клетка в центре Ув. 400

В грануляционной ткани имеется небольшое количество фибробластов с выраженными дистрофическими изменениями (рис. 8). В основном это были клетки с крупными ядрами, канальцы гранулярной цитоплазматической сети и комплекс Гольджи вакуолизированы, в цитоплазме определяются зоны просветления (лизиса). Плазмолемма частично нарушена.

Проведенный количественный анализ показал большое количество лейкоцитов в ране (в среднем 13,4 в поле зрения), единичные фибробласты (в среднем 1,35 в поле зрения), макрофаги (в среднем 4,65 в поле зрения). Сосудов мало – в среднем 0,95 в поле зрения.

*Рис. 8* Дистрофически измененный фибробласт до лечения ран Стелланином-ПЭГ



Я – ядро, в – вакуоль

Ув. 15000

Таким образом, до лечения Стелланином-ПЭГ в ране отмечали клеточные элементы, характерные как для первой, так и для второй фазы раневого процесса. Формируется неполноценная грануляционная ткань, бедная фибробластами и волокнами, с выраженным отеком межклеточного вещества, инфильтрированная нейтрофилами. В ранах затягивается нейтрофильная фаза, не происходит своевременной замены нейтрофилов макрофагами и тормозится фибропластический процесс. Фагоцитоз не выражен. Все это указывало на вяло текущий хронический воспалительный процесс.

### *1 сутки лечения ран Стелланином ПЭГ*

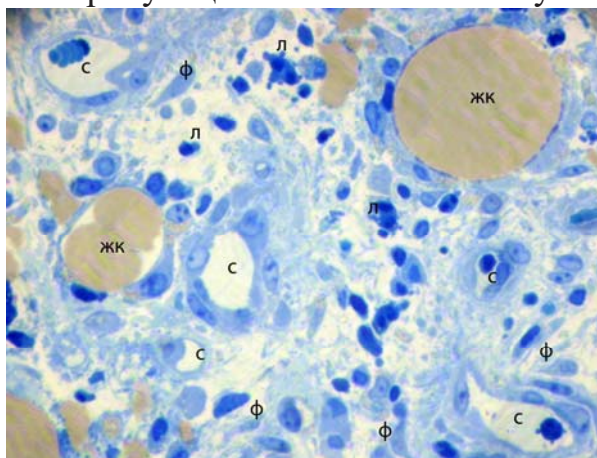
Электронная микроскопия с высоким разрешением позволяет проследить, как Стелланин влияет на функциональную активность клеток грануляционной ткани и как при этом изменяется их ультраструктура.

Уже на 1 сутки лечения ран Стелланином-ПЭГ отмечали положительную динамику в процессе заживления ран. В области дна раны проницаемость сосудов грануляционной ткани снизилась, что привело к снижению инфильтрации ткани нейтрофильными лейкоцитами (рис. 9).

При электронно-микроскопическом исследовании стенка сосудов была без патологических изменений. Контакты между эндотелиоцитами сохранены. В просвете сосуда отмечали лейкоциты, краевого стояния клеток отмечено не было (рис. 10).

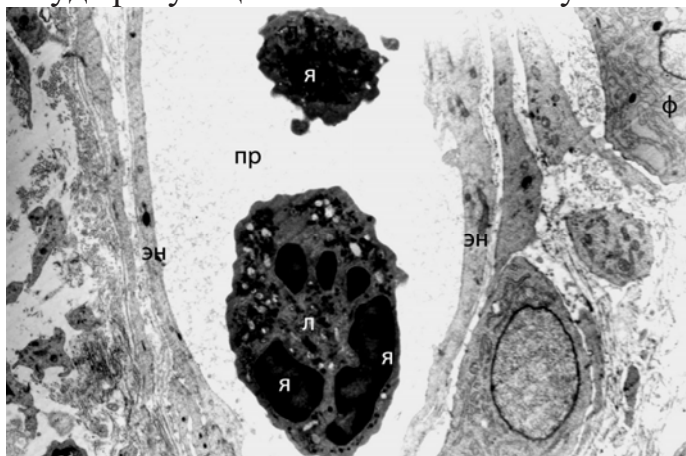
В ткани раны отмечали нейтрофильные лейкоциты, проявляющие функциональную активность, на что указывало наличие цитоплазматических выростов, лизосом в цитоплазме, фагосом (рис. 11).

*Рис. 9* Фрагмент грануляционной ткани на 1 сутки лечения ран



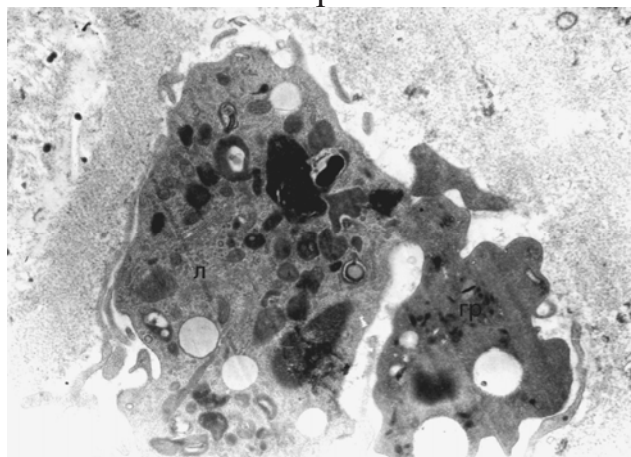
Сосуды (с) грануляционной ткани. Уменьшение инфильтрации ткани нейтрофильными лейкоцитами (л). Локализация фибробластов (ф) около сосудов. Жк – жировая клетка  
Ув. 400

*Рис. 10* Сосуд грануляционной ткани на 1 сутки лечения ран



Эн – эндотелиоцит, пр – просвет сосуда, л – лейкоцит, я – ядро, ф – фибробласт  
Ув. 6000

*Рис. 11* Функционально активный нейтрофильный лейкоцит на 1 сутки лечения ран



л – лейкоцит, гр – гранулы

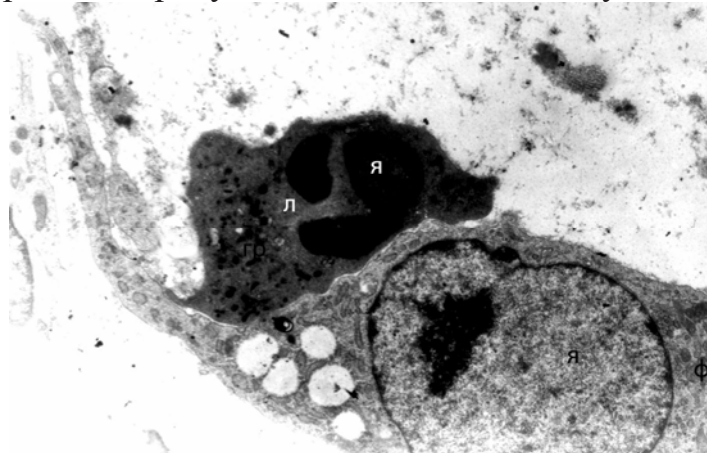
Ув. 10000

С уменьшением отека ткани уменьшаются межклеточные расстояния, что увеличивает возможность взаимодействий между клетками. Межклеточные контакты модулируют функции клеток. Обнаруживались контакты между нейтрофилами и фибробластами (рис. 12). Нейтрофилы являются источниками разнообразных медиаторов (пептид, активирующий рост фибробластов (СТАР-PMN); лейкотриен  $B_4$ , усиливающий их миграцию; фактор ингибиции миграции фибробластов и др.) и поддерживают каскад воспалительно-репаративного процесса. Однако при избытке нейтрофилов (при гнойном воспалении) пролиферация фибробластов тормозится. На 1 сутки лечения ран Стелланином-ПЭГ торможения пролиферации фибробластов не происходит – в грануляционной ткани находили фибробласты в состоянии митоза (рис. 13). Митохондрии в таких клетках мелкие с электронноплотным матриксом большим количеством крист, гранулярная цитоплазматическая сеть представлена короткими узкими фрагментами. Форма и внутреннее строение митохондрий в значительной мере определяются их функциональным состоянием. Увеличение количества



крист митохондрий – свидетельство возрастающих функциональных потребностей клетки (рис. 14).

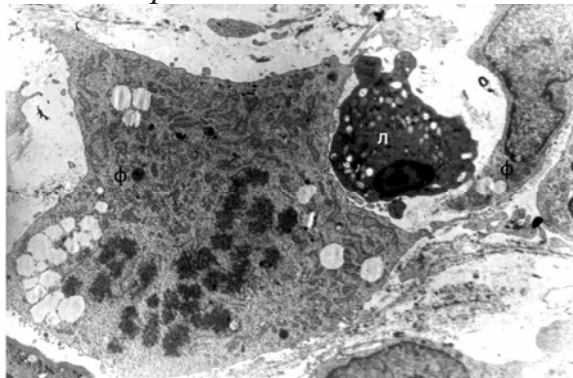
*Рис. 12* Фрагмент грануляционной ткани на 1 сутки лечения ран



Контакт нейтрофильного лейкоцита (л) с фибробластом (ф).  
Я – ядро клетки

Ув. 15000

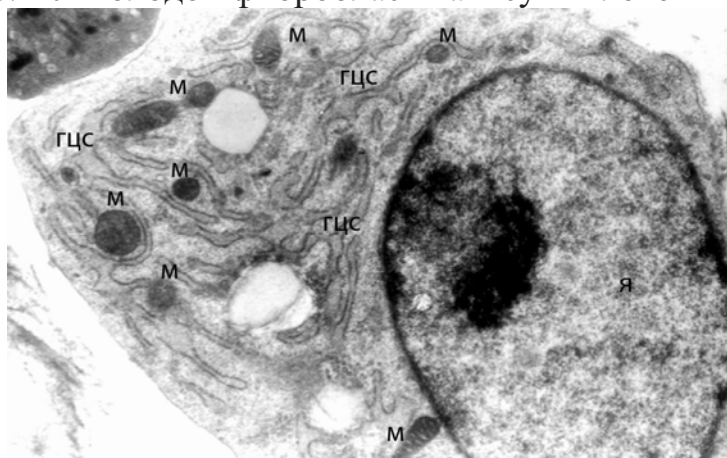
*Рис. 13* Фибробласт в состоянии митоза



ф – фибробласт, л – лейкоцит

Ув. 6000

*Рис. 14* Молодой фибробласт на 1 сутки лечения ран

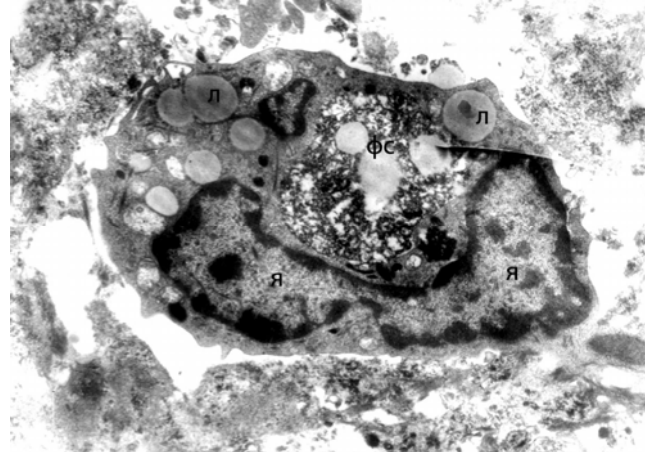


Я – ядро, гцс – гранулярная цитоплазматическая сеть, м – митохондрии с плотно упакованными кристами

Ув. 25000

В ране появляются функционально активные макрофаги. В цитоплазме клеток определяли крупные фагосомы с клеточным детритом, капли липидов (рис. 15). Фагоциты активно очищают рану от клеточного детрита. Появление макрофагов в ране указывает на начало замены нейтрофильного пула мононуклеарными фагоцитами.

*Рис. 15* Макрофаг на 1 сутки лечения ран



Я – ядро, л – капли липидов, фс – крупная фагосома с клеточным детритом  
Ув. 10000

Проведенный количественный анализ показал незначительное увеличение количества макрофагов по сравнению с предыдущим сроком (в среднем 4,7 и 4,65 в поле зрения соответственно), но как было отмечено выше, активность макрофагов возросла. Количество лейкоцитов снизилось почти в 2 раза (в среднем 13,4 и 7,15 соответственно). Значительно увеличилось количество фибробластов в ране – почти в 3 раза (в среднем 3,8 и 1,35 в поле зрения соответственно). Количество сосудов осталось без изменения – в среднем 0,95 в поле зрения.

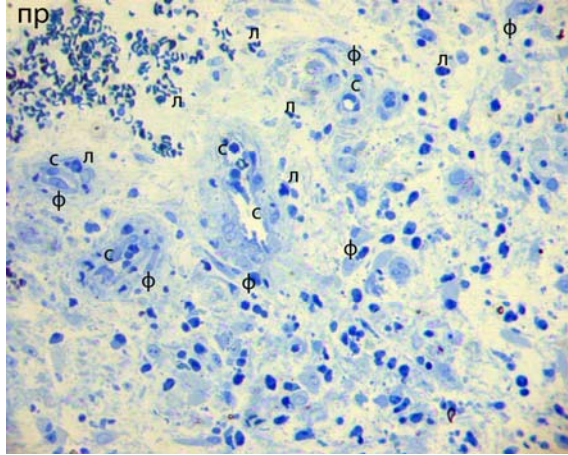
Таким образом, на 1 сутки лечения вяло заживающей гнойной раны, мазью Стелланин-ПЭГ отмечали уменьшение инфильтрации ткани нейтрофильными лейкоцитами, появление в ране функционально активных макрофагов. Эффективное очищение ран от детрита; восстановление кровообращения создает условия необходимые для течения фибропластических процессов в ране. В ране появляются фибробласты в состоянии митоза и молодые клетки с высоким уровнем обменных процессов.

### ***2 сутки лечения ран Стелланином-ПЭГ***

На 2 сутки лечения на поверхности ран находили измененные эритроциты, фибрин, клеточный детрит, лейкоциты (рис. 16). Большинство нейтрофильных лейкоцитов находилось в верхних слоях раны. По сравнению с предыдущим сроком исследования количество лейкоцитов незначительно увеличилось (в среднем 7,15 и 7,55 в поле зрения соответственно). В подлежащей ткани воспаление еще сохраняется. Фагоциты (лейкоциты и

макрофаги) проявляли активность – в цитоплазме находили фагосомы с детритом. Количество макрофагов в грануляционной ткани еще не велико – по сравнению с предыдущим сроком исследования практически не изменилось (в среднем 4,8 и 4,7 в поле зрения соответственно).

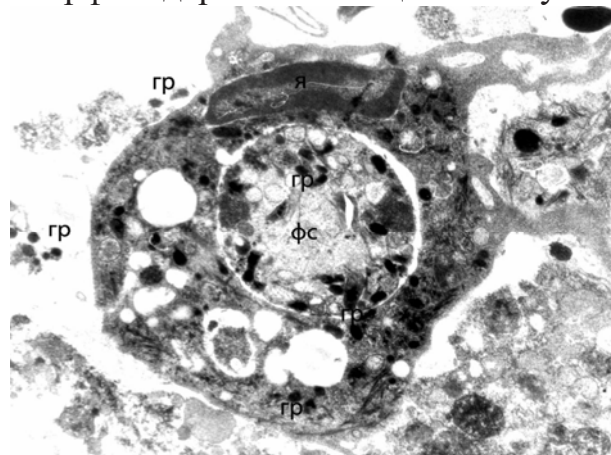
*Рис. 16* Фрагмент ткани раны на 2 сутки лечения



Уменьшение отека грануляционной ткани. Увеличение количества фибробластов (ф) с преимущественной локализацией около сосудов (с). Пр – поверхность раны, л – лейкоцит  
Ув.200

Об активности полиморфноядерных лейкоцитов свидетельствовала также дегрануляция клеток, при которой выделение литических ферментов, содержащихся в гранулах лейкоцитов, происходит не только внутрь пищеварительных вакуолей, но и за пределы клетки (внеклеточная дегрануляция), что говорит о дистанционном действии активных веществ на бактериальные тела (рис.17). Регуляцию воспаления не могут обеспечивать клетки с секрецией в полость фагосомы. Такая регуляция совершается выбросом активных веществ во внеклеточное пространство (А.А. Пальцын, 1988).

*Рис. 17* Полиморфноядерный лейкоцит на 2 сутки лечения ран



Фс – фагосома, гр – гранулы, я – ядро

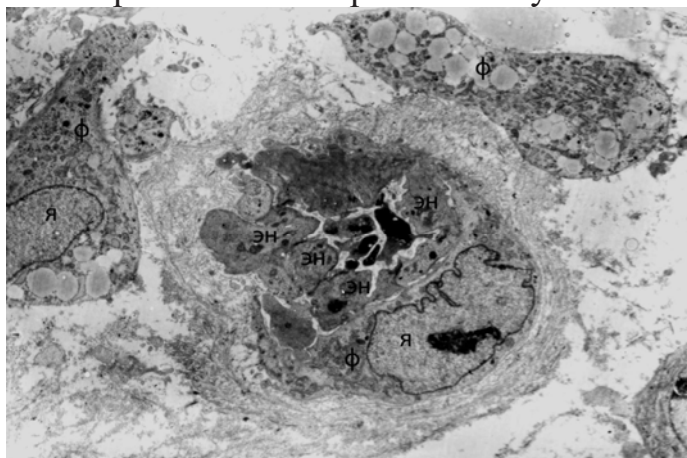
Ув. 15000

Раневые дефекты заполнены грануляционной тканью с небольшим количеством сосудов (в среднем 1,05 в поле зрения). Базальный слой сосудов



увеличен, несколько отечен (рис. 18). Количество сосудов незначительно увеличилось по сравнению с предыдущим сроком исследования (0,95 и 1,05 соответственно).

*Рис. 18* Фрагмент ткани раны на 2 сутки лечения

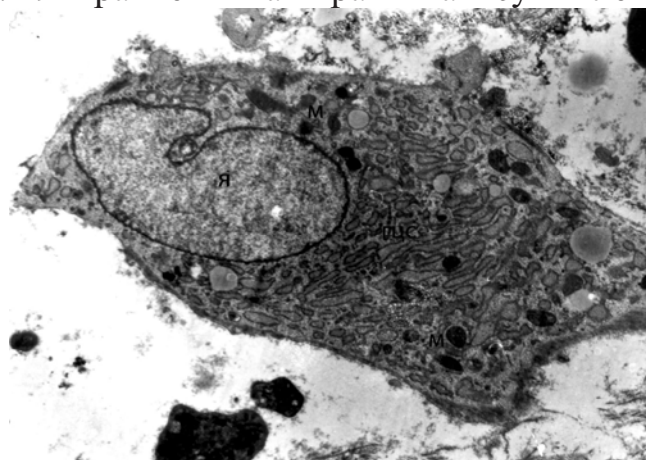


Сосуд окружен рыхлым, набухшим базальным слоем. Рядом с сосудом находятся фибробласты. Эн – эндотелиоцит, я – ядро, ф – фибробласт

Ув. 4000

Количество фибробластов увеличилось в 1,63 раза по сравнению с предыдущим сроком исследования (в среднем 3,8 и 6,2 в поле зрения соответственно). Фибробласты в основном располагались между сосудами. Это были клетки с эксцентрично расположенным ядром, митохондриями с плотным матриксом, цитоплазма заполнена короткими фрагментами гранулярной цитоплазматической сети (рис. 19). Такая ультраструктура соответствует молодым фибробластам, которые уже синтезируют коллаген и гликозаминогликаны и вместе с тем еще способны к делению и движению.

*Рис. 19* Фрагмент ткани раны на 2 сутки лечения



Молодой фибробласт. Я – ядро, гцс – гранулярная цитоплазматическая сеть, м – митохондрии

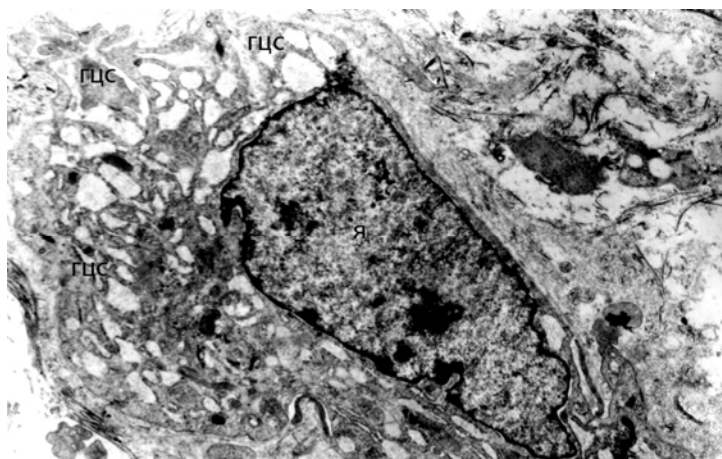
Ув.7800

В грануляционной ткани отмечали не только молодые клетки, но и небольшое количество зрелых функционально активных фибробластов,



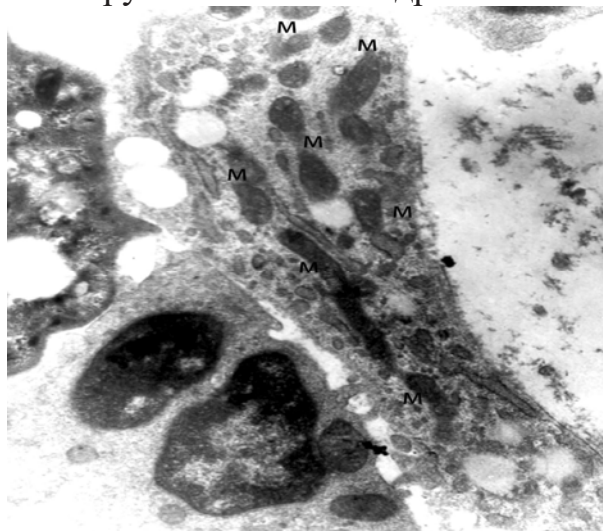
способных синтезировать белки, в том числе и коллаген (рис. 20). В таких клетках гранулярная цитоплазматическая сеть занимала практически всю цитоплазму. Нередко резко расширенные участки сети, образовывали лакуны, с хлопьевидным материалом. Митохондрии более крупные по сравнению с предыдущим сроком исследования, однако, матрикс также высокой плотности (рис. 21).

*Рис. 20* Функционально активный фибробласт на 2 сутки лечения ран



Я – ядро, гцс – резко расширенные каналцы гранулярной цитоплазматической сети  
Ув. 8000

*Рис. 21* Фибробласт с крупными митохондриями с плотным матриксом



м – крупные митохондрии

Ув. 25000

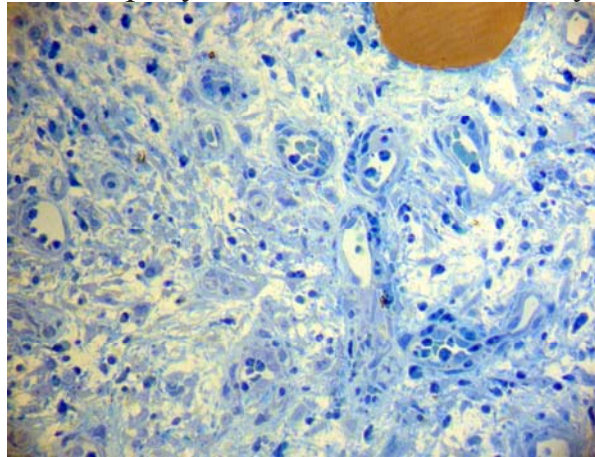
Таким образом, на 2 сутки лечения ран Стелланином-ПЭГ признаки воспаления и отек грануляционной ткани уменьшились, активность нейтрофильных лейкоцитов и клеток грануляционной ткани – макрофагов, фибробластов увеличилась, что создает благоприятные условия для развития полноценной грануляционной ткани. Внутриклеточные изменения фибробластов – гиперплазия митохондрий, гранулярной цитоплазматической

сети являются морфологическим отображением повышения функциональной активности фибробластов на 2 сутки лечения ран Стелланином-ПЭГ.

### *3 сутки лечения ран Стелланином-ПЭГ*

В области дна раны формируется грануляционная ткань с большим количеством сосудов, фибробластов. Отека ткани практически нет (рис. 22). Количество лейкоцитов уменьшилось по сравнению с предыдущим сроком исследования – в 1,8 раза (в среднем 7,55 и 4,2 в поле зрения соответственно), а макрофагов увеличилось – в 1,3 раза (в среднем 6,3 и 4,8 в поле зрения соответственно). Таким образом, количество макрофагов превышает количество лейкоцитов в поле зрения препарата. Произошла замена нейтрофильного пула в очаге мононуклеарными фагоцитами и процесс заживления вступает в фазу репарации.

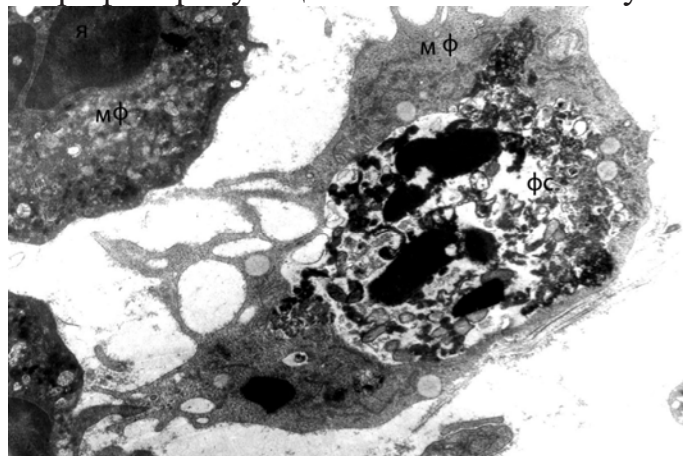
*Рис. 22* Фрагмент грануляционной ткани на 3 сутки лечения



Ув. 200

Макрофаги продолжают выполнять свою основную функцию – очищение ран от клеточного детрита. На поверхности клеток находим большое количество длинных цитоплазматических выростов, которые участвуют в захвате фрагментов разрушенных клеток (рис. 23).

*Рис. 23* Макрофаг грануляционной ткани на 3 сутки лечения



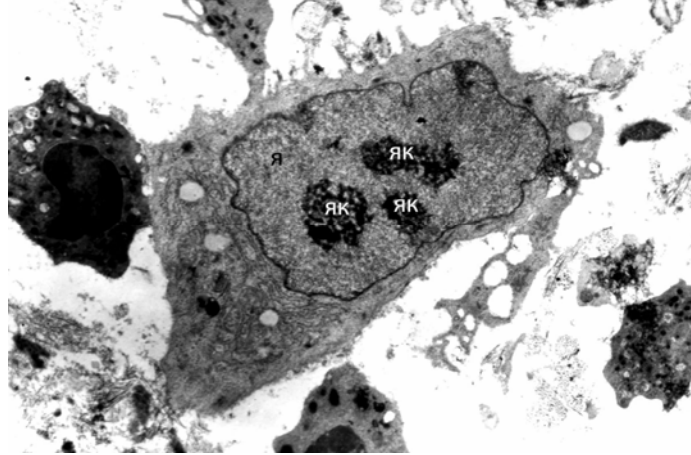
Мф – макрофаг, фс – крупная фагосома с клеточным детритом

Ув. 10000

Основными клеточными элементами грануляционной ткани становятся фибробласты (в среднем 7,3 в поле зрения). Находили молодые, способные к пролиферации фибробласты, с крупным ядром и несколькими ядрышками, что указывало на активное состояние клетки (рис. 24). Гранулярная цитоплазматическая сеть не обильная, просветы не расширены, митохондрий немного, ориентация крист сохранена. Среди тонких фибрилл коллагена находились фибробласты, способные к синтезу коллагена (рис. 25). Цитоплазма таких клеток была заполнена гранулярной цитоплазматической сетью с расширенным просветом. Много митохондрий крупных размеров с просветленным матриксом и нередко нарушенной ориентацией крист.

Увеличение в размерах митохондрий и просветление матрикса указывает на высокий уровень функциональной активности клетки, на превышение уровня расхода энергии над уровнем синтеза. Расширение просвета канальцев гранулярной цитоплазматической сети также указывает на высокую функциональную активность фибробластов.

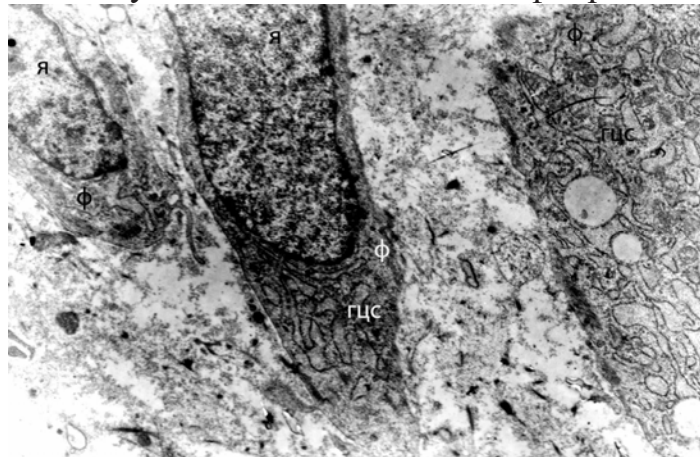
*Рис. 24* Молодой фибробласт грануляционной ткани



Я – ядро, як – ядрышко

Ув. 10000

*Рис. 25* Функционально активные фибробласты



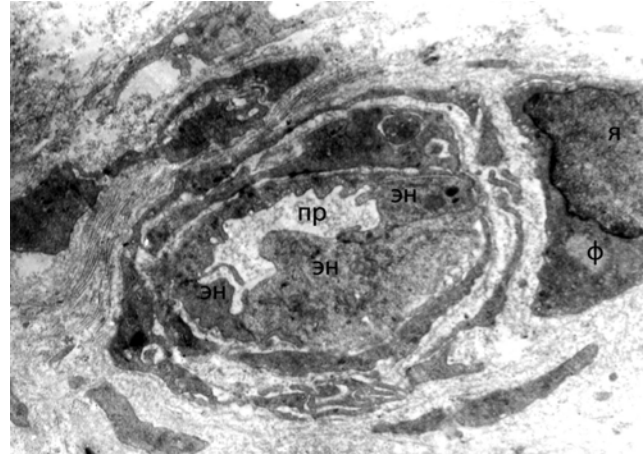
Ф – фибробласт, гцс – гранулярная цитоплазматическая сеть, я – ядро

Ув. 10000



Новообразованные сосуды отмечали как в области дна раны, так и ближе к поверхности. Капилляры имели типичное строение. Контакты между эндотелиоцитами были плотные, митохондрии мелкие с электронноплотным матриксом. Отростки перицитов окружали капилляры. Фибробласты располагались вокруг сосудов (рис.26). Количество сосудов в ране продолжает увеличиваться по сравнению с предыдущим сроком (в среднем 1,9 и 1,05 в поле зрения соответственно).

*Рис. 26* Капилляр грануляционной ткани на 3 сутки лечения ран Стелланином-ПЭГ



Пр – просвет капилляра, эн – эндотелиоцит, я – ядро, ф – фибробласт  
Ув. 10000

Таким образом, на 3 сутки лечения в ранах произошла замена нейтрофильного пула в очаге мононуклеарными фагоцитами, и процесс заживления ран вступил в фазу репарации. Количество лейкоцитов с начала лечения Стелланином-ПЭГ уменьшилось в 3 раза (в среднем 13,4 до лечения и 4,2 в поле зрения на 3 сутки лечения). Активность фагоцитов возросла. Раневые дефекты заполнены грануляционной тканью богатой сосудами и фибробластами. Фибробласты находились в различном функциональном состоянии – молодые, способные к делению клетки, и зрелые, синтезирующие коллаген клетки.

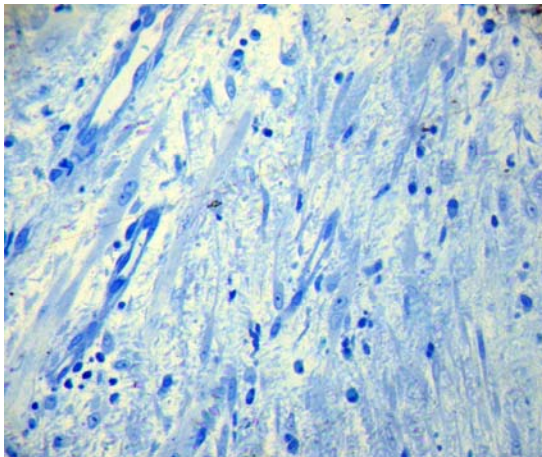
#### *4 сутки лечения ран Стелланином-ПЭГ*

Отмечали активное развитие грануляционной ткани. Увеличилось количество фибробластов по сравнению с предыдущим сроком исследования (в среднем 8,0 и 7,3 соответственно), количество сосудов также увеличилось (2,3 и 1,9 соответственно) Увеличивается и количество макрофагов в ране (6,3 и 7,2 соответственно). Лейкоциты находили лишь в верхних слоях раны (рис. 27). Крупные фибробласты веретеновидной и звездчатой формы находились среди волокнистого материала. Ультраструктурные признаки указывали на функционально активное состояние клеток, при котором происходит активный синтез белков, в том числе и коллагеновых.



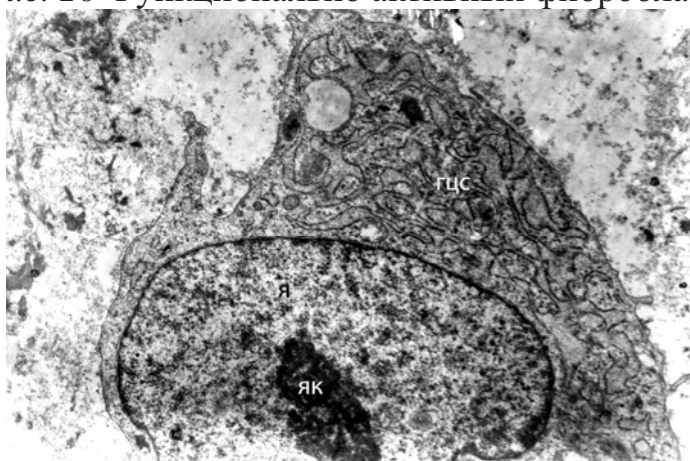
Синтезированный коллаген окружал фибробласты (рис. 28). Фибробласты пока не имели горизонтальной ориентации к поверхности, что характерно для созревающей грануляционной ткани.

*Рис. 27* Фрагмент грануляционной ткани на 4 сутки лечения



Ув. 200

*Рис. 28* Функционально активный фибробласт

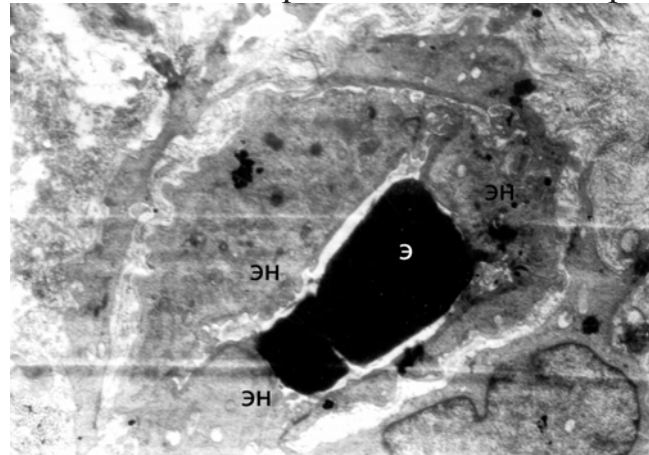


Я – ядро, як – ядрышко, гцс – гранулярная цитоплазматическая сеть

Ув. 10000

Межэндотелиальные контакты в новообразованных сосудах были плотные. Базальный слой не отечен. Отростки перицитов окружали капилляры (рис. 29).

Рис. 29 Новообразованный капилляр



Э – эритроцит в просвете капилляра, эн – эндотелиоцит

Ув. 8000

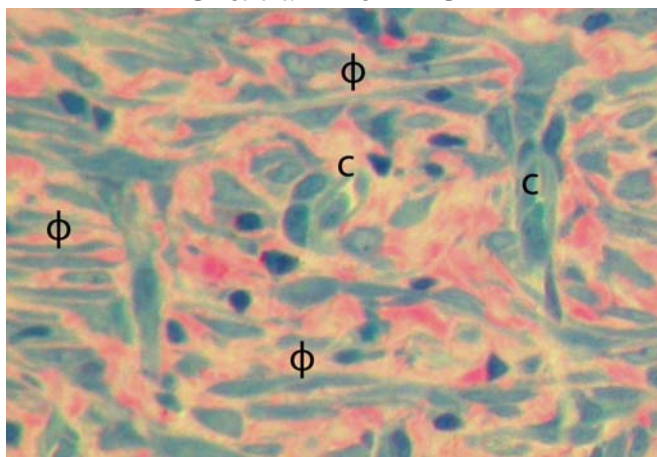
Таким образом, на 4 сутки лечения Стелланином-ПЭГ раневые дефекты заполнены созревающей грануляционной тканью с большим количеством клеточных элементов. Улучшается васкуляризация ран (увеличивается количество сосудов), макрофаги проявляют функциональную активность. Фибробласты, синтезирующие коллаген, были преобладающими клеточными элементами в ране. Лишь на поверхности раны отмечены признаки воспаления.

### ***5 сутки лечения ран Стелланином-ПЭГ***

Раневые дефекты заполнены зрелой грануляционной тканью. Количество фибробластов продолжает увеличиваться (по сравнению с предыдущим сроком исследования – 9,3 и 8,0 в поле зрения соответственно). Между фибробластами находятся коллагеновые фибриллы и волокна. В грануляционной ткани, кроме фибробластов, обнаруживались макрофаги – их количество снижается с 7,2 на 4 сутки исследования до 6,8 в поле зрения на 5 сутки. В грануляционной ткани отмечали формирующиеся сосудистые петли направленные перпендикулярно к раневой поверхности (рис. 30).

Зрелость грануляционной ткани повышалась от поверхности ко дну раны. В области дна раны было больше волокнистых элементов, чем клеточных. Между фибриллами коллагена располагались как функционально активные фибробласты с резко расширенными канальцами гранулярной цитоплазматической сети, образующими лакуны с хлопьевидным содержимым (рис. 31), так функционально неактивные формы фибробластов - фиброциты с редуцированной цитоплазмой, слабо развитым комплексом Гольджи и гранулярной цитоплазматической сетью (рис. 32). Сосудов среднего калибра было несколько больше, чем мелких капилляров.

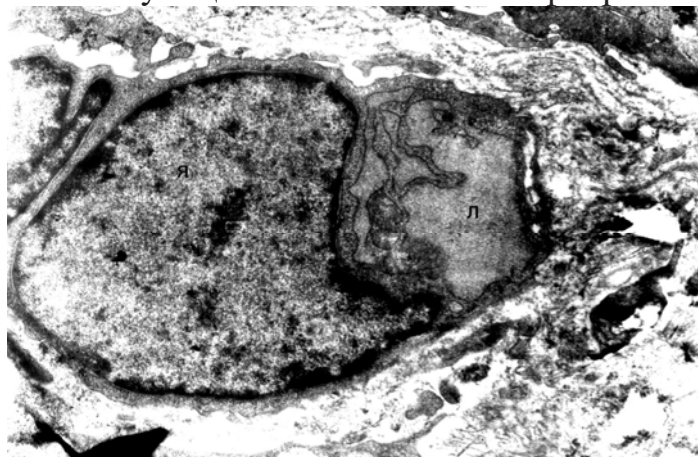
*Рис. 30* Фрагмент грануляционной ткани на 5 сутки лечения  
Стелланином-ПЭГ



Ф – фибробласты, с – сосуды

Ув. 800

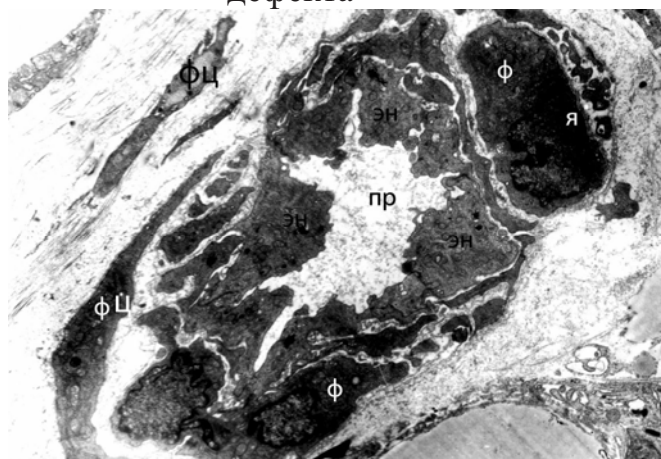
*Рис. 31* Функционально активный фибробласт



Я – ядро, л – резко расширенный каналец гранулярной  
цитоплазматической сети, образующий лакуну с хлопьевидным содержимым

Ув. 15000

*Рис. 32* Фрагмент грануляционной ткани из области дна раневого  
дефекта



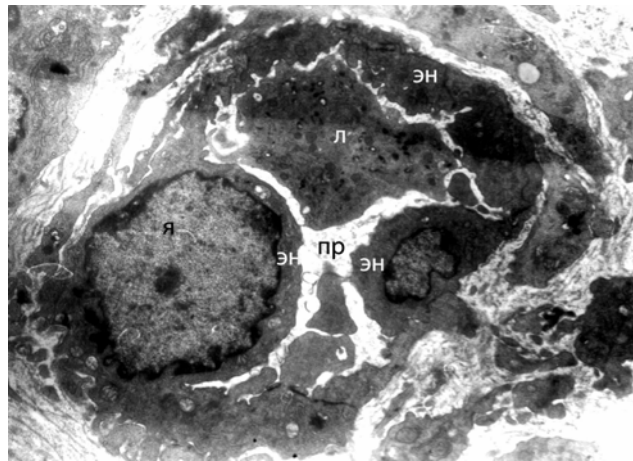
Фц – фиброцит, эн – эндотелиоцит, я – ядро, пр – просвет сосуда, ф –  
фибробласт

Ув. 6000



Ближе к поверхности раны степень зрелости грануляционной ткани уменьшается. Сосуды мелкие, капиллярного типа с узким щелевидным просветом окружены фибриллами коллагена (рис. 33). Количество сосудов продолжает увеличиваться по сравнению с предыдущим сроком (2,6 и 2,3 соответственно). Среди фибробластов чаще встречались молодые клетки. Отсутствовала параллельная ориентация фибробластических элементов. В верхних слоях грануляционной ткани отмечали незначительное количество нейтрофильных лейкоцитов и макрофагов.

*Рис. 33* Сосуд верхних слоев грануляционной ткани

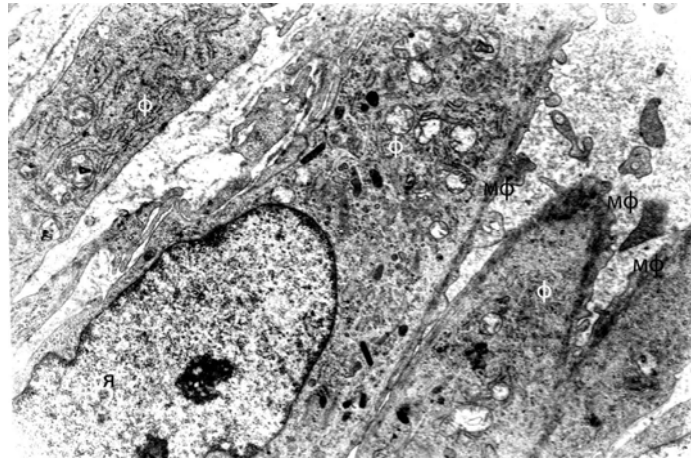


Пр – щелевидный просвет, л – лейкоцит в просвете капилляра, эн – эндотелиоцит  
Ув. 8000

Было отмечено наличие миофибробластов, Gabbiani G et al. (1971), Majno G. Et al описали эти клетки как атипичные фибробласты грануляционной ткани. Было высказано предположение об участии этих клеток в контракции раны (Gabbiani G. et al., 1972; Runger-Brandle E., Gabbiani G., 1983 и др.). Ультраструктура миофибробластов характеризуется наличием длинных отростков, ориентированных пучков микрофиламентов в цитоплазме под плазмолеммой. Между пучками встречаются электронно-плотные участки, напоминающие аналогичные структуры гладких мышечных клеток (рис.34).



Рис. 34 Миофибробласты грануляционной ткани



мф – микрофиламенты, я – ядро

Ув. 10000

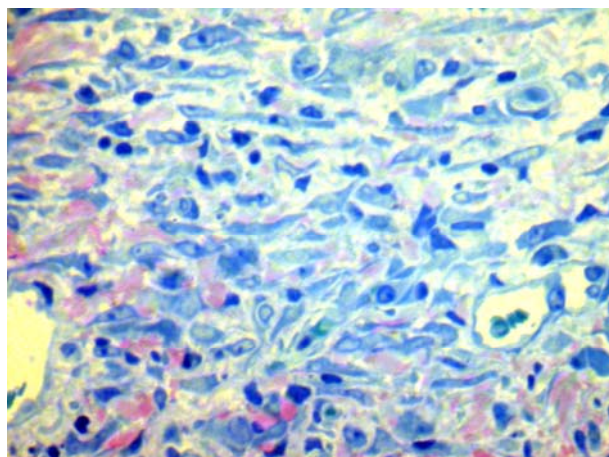
Таким образом, на 5 сутки лечения ран Стелланином-ПЭГ дефекты были заполнены зрелой грануляционной тканью степень зрелости которой повышалась от поверхности раны ко дну. В ране появляются миофибробласты, ответственные за контракцию раны; фиброциты – функционально неактивные фибробласты.

#### ***8 сутки лечения ран Стелланином-ПЭГ***

Раневые дефекты заполнены зрелой грануляционной тканью. На поверхности сохранялся тонкий слой наложений фибрина с незначительным количеством нейтрофильных лейкоцитов. С уменьшением признаков воспаления уменьшается и количество макрофагов (5,6 и 6,8 соответственно). В подлежащей ткани имелось большое количество волокнистых структур, состоящих из тонких коллагеновых волокон (рис. 35). В зрелой грануляционной ткани много фибробластов крупных размеров с четкой ориентацией относительно поверхности раны.

По мере созревания уменьшается потребность грануляционной ткани в активном поступлении питательных веществ, вследствие чего новообразованные капилляры редуцируются. В грануляционной ткани сосуды находились среди волокон коллагена и фибробластов. Количество сосудов уменьшилось по сравнению с предыдущим сроком 2,3 и 2,6 соответственно. Количество фибробластов продолжает увеличиваться по сравнению с предыдущим сроком лечения – 10,1 и 9,3 соответственно.

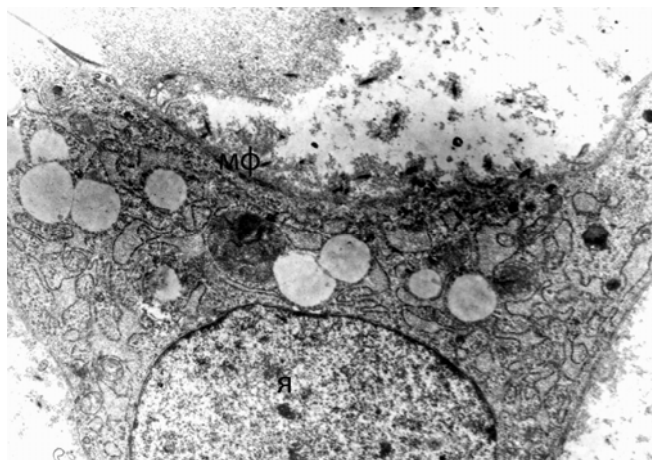
*Рис. 35* Фрагмент грануляционной ткани на 8 сутки лечения ран Стелланином-ПЭГ



Ув. 400

В ране, также как и на предыдущем сроке исследования, были обнаружены миофибробласты (рис.36). В цитоплазме клеток обнаруживали характерные микрофиламенты.

*Рис. 36* Миофибробласт на 8 сутки лечения ран Стелланином-ПЭГ



Я – ядро, мф – микрофиламенты

Ув. 10000

Таким образом, на 8 сутки лечения ран дефекты были заполнены зрелой грануляционной тканью с большим количеством волокнистого материала и характерной ориентацией фибробластов. Отмечали редукцию сосудов, что указывает на зрелость грануляционной ткани.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пальцын А.А. Некоторые вопросы современного учения о полиморфноядерных лейкоцитах. Арх.патол., 1988, № 8, с.85-89
2. Kreipe H., Radzun H.J., Rudolph P., Hansmann M.L., Heidorn K., Parawaresch R. Multinuclear giant cells generated in vitro. Terminally differentiated macrophages with downregulated c-fms expression. – Am. J. Pathol., 1988, v. 130, No. 2, p. 323-243
3. Gabbiani G., Ryan G.B., Majno G. Presence o modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. – Experientia, 1971, 27, 549.

## ГЛАВА II

**Электронно-микроскопическое исследование регенератонных процессов в ране при местном лечении Бетадином***Цель исследования*

Определить влияние мази Бетедин на клеточный состав и структурно-функциональное состояние клеток раны.

*Материал исследования*

Биопсийный материал из гнойных ран 3 больных, находящихся на лечении в отделении ран и раневой инфекции ФГУ «Института хирургии им. А.В. Вишневского Росмедтехнолгий», в процессе лечения мазью Бетедин.

*Методы исследования*

Проведено морфологическое (свето-микроскопическое и электронно-микроскопическое) исследование образцов ткани гнойной раны. Исследование проводили до лечения Бетадином, на 1, 2, 3, 4, 5 и 8 сутки лечения мазью. Тонкие срезы (толщина 100-200 нм) исследовали в электронном микроскопе Philips CM 10. На всех сроках исследования подсчитывали количество полиморфно-ядерных лейкоцитов, макрофагов, фибробластов и сосудов. Подсчет проводили в 20 произвольно выбранных полях зрения площадью 100 мм<sup>2</sup> каждое при увеличении ×1000 (иммерсия) с вычислением среднего арифметического.

Все количественные показатели и морфологическая картина на 4-5 сутки лечения Бетадином незначительно отличались и были практически одинаковыми. Поэтому эти сроки объединены в описании состояния раны. При сравнении количественных данных использовали данные на 5 сутки лечения ран.

### Количество препаратов исследованных в световом и электронном микроскопе

Сутки	Кол-во блоков - полутонких срезов для светооптического исследования	Кол-во блоков отобранных для электронно-микроскопического исследования	Кол-во сеточек (препараты для электронно-микроскопического исследования)
1	20	6	15
2	20	6	10
3	10	3	5
4	20	6	10
5	10	3	5
8	10	3	5
<b>Всего</b>	<b>90</b>	<b>27</b>	<b>50</b>

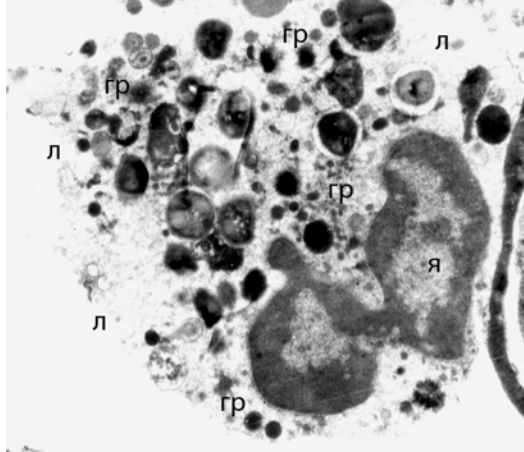
#### *1 сутки лечения ран Бетадином*

На 1 сутки лечения Бетадином в ранах основными клеточными элементами были нейтрофильные лейкоциты (в среднем 13 в поле зрения), многие из лейкоцитов находились в состоянии деструкции (рис.1). Макрофагов было мало (в среднем 4,5 в поле зрения). Единичные фибробласты (в среднем 2,1 в поле зрения) находились в состоянии деструкции выраженной в разной степени – от незначительных изменений до некроза. При незначительных изменениях клеточные органеллы – митохондрии, гранулярная цитоплазматическая сеть были гипертрофированы. В цитоплазме определяли зоны лизиса. Целостность цитоплазматической мембраны местами была нарушена (рис.2). В ядре необратимо измененных фибробластов происходит мелкогранулярное рассеивание хроматина, четкие контуры ядерной мембраны исчезают. Цитоплазма просветлена, митохондрии набухшие, каналы гранулярной цитоплазматической сети расширены и фрагментированы. Исчезновение клеточной мембраны приводит к выбросу цитоплазматического содержимого в окружающее пространство (рис.3)

В ранах наблюдались выраженные микроциркуляторные расстройства: просветы микрососудов расширены, сладж-эритроцитов, повышена проницаемость стенок сосудов. Многие сосуды находились в состоянии деструкции (рис.4).

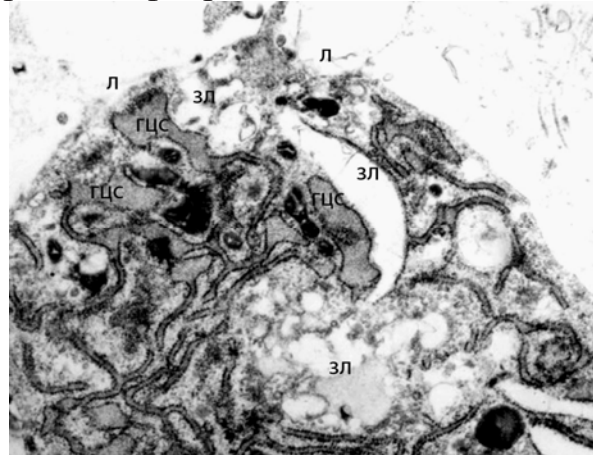


Рис. 1 Деструктивно измененный лейкоцит



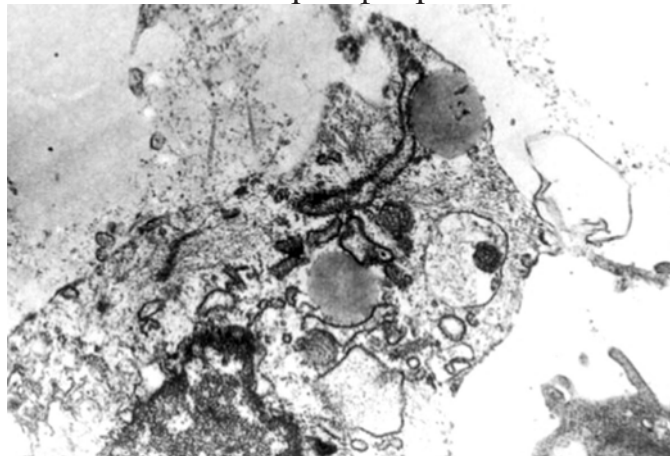
Я – ядро, гр – специфические гранулы, л – участки лизиса  
цитоплазматической мембраны Ув. 10000

Рис. 2 Фрагмент фибробласта в состоянии деструкции



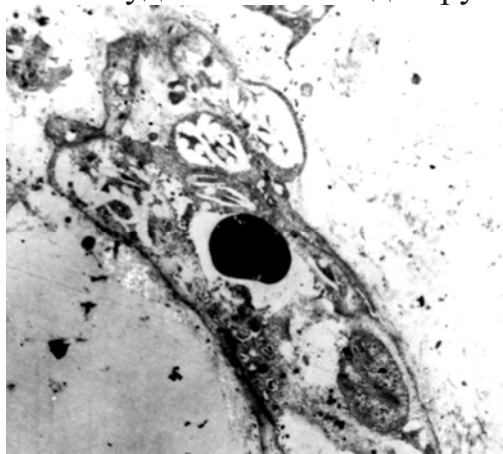
Л – участки лизированной цитоплазматической мембраны, гцс –  
участки расширенной гранулярной цитоплазматической сети, зл – зоны  
лизиса цитоплазмы Ув. 15000

Рис. 3 Некроз фибробласта



Ув. 8000

Рис. 4 Сосуд в состоянии деструкции



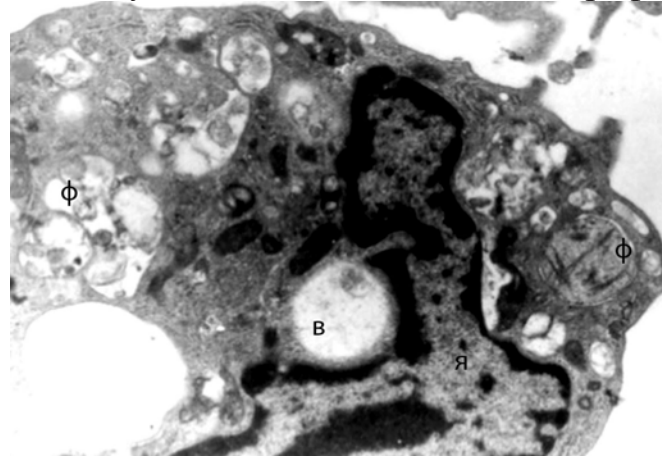
Ув. 5000

Таким образом, на 1 сутки лечения Бетадином в ранах сохраняются выраженные воспалительные и микроциркуляторные изменения. Обилие клеточного детрита способствует пролонгированию процесса воспаления в ране.

### *2 сутки лечения ран Бетадином*

На 2 сутки лечения ран Бетадином отмечаем уменьшение клеточного детрита. Количество лейкоцитов в ране несколько снизилось по сравнению с предыдущим сроком лечения (в среднем 13,0 и 12,2 в поле зрения соответственно). Количество макрофагов незначительно увеличилось – 4,5 и 4,7 соответственно по сравнению с предыдущим сроком исследования. Макрофаги функционально активны, на усиление процессов внутриклеточного пищеварения указывают крупные фагосомы с клеточным детритом. Клетки с крупными ядрами с изрезанными контурами, большим количеством везикул, единичными профилями гранулярной цитоплазматической сети, вакуолями и фагосомами с клеточным детритом (рис. 5). Количество фибробластов увеличивается по сравнению с 1 сутками лечения – 2,1 и 3,5 соответственно. Наряду с деструктивно измененными фибробластами встречаются молодые клетки с незначительными изменениями. Присутствие жира в клетке отражает некоторое нарушение баланса между продукцией и утилизацией жиров (рис.6).

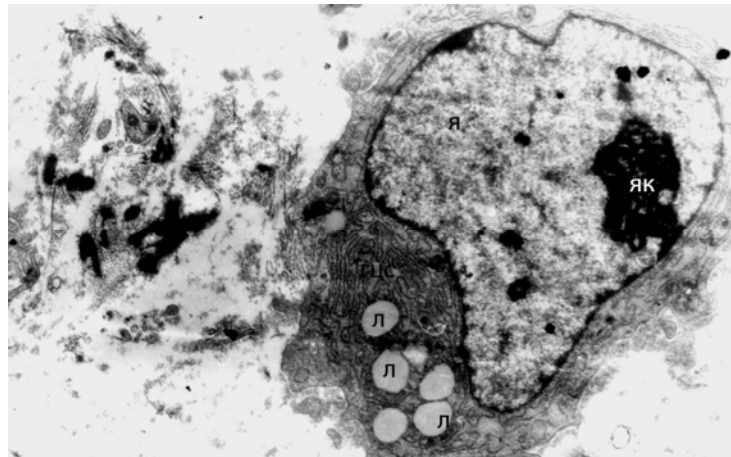
Рис. 5 Функционально активный макрофаг



Я – ядро, в – вакуоль, ф – фагосома с детритом

Ув. 9000

Рис. 6 Фибробласт грануляционной ткани

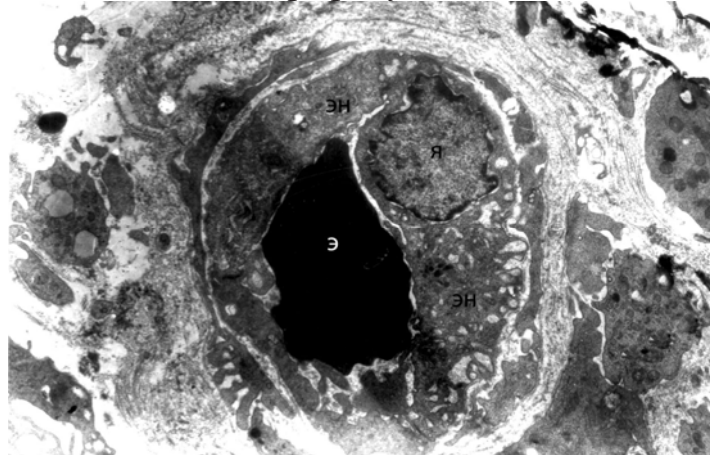


Я – ядро, як – ядрышко, л – капли липидов, гцс – гранулярная  
цитоплазматическая сеть

Ув. 8000

В области дна раны отмечали единичные сосуды (в среднем 0,9 в поле зрения). Некоторые сосуды, также как и на предыдущем сроке исследования, были разрушены, но появляются и молодые новообразованные сосуды капиллярного типа (рис.7). Базальный слой рыхлый, отростки перицитов окружают капилляр. Эндотелиальные клетки крупные, на базальной и люминальной поверхностях отмечали цитоплазматические выросты, что указывает на активное состояние эндотелия.

Рис. 7 Капилляр грануляционной ткани



Эн – эндотеллоцит, я – ядро эндотелиоцита, э – эритроцит в просвете сосуда  
Ув. 9000

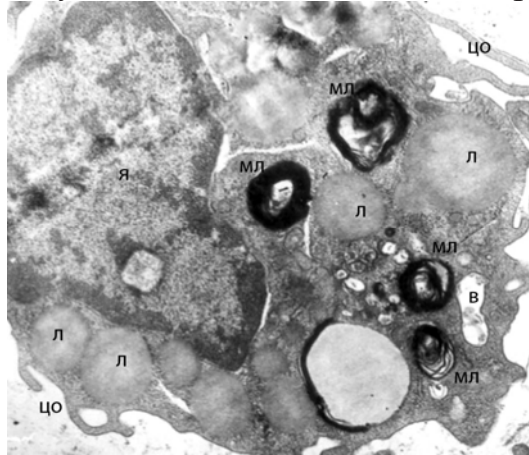
Таким образом, на 2 сутки лечения Бетадином в ранах сохраняются признаки воспаления. Сохраняется значительная инфильтрация ткани нейтрофильными лейкоцитами. Однако немногочисленные макрофаги проявляют фагоцитарную активность – очищают рану от детрита. Появляются молодые фибробласты и новообразованные капилляры.

### *3 сутки лечения ран Бетадином*

На 3 сутки лечения на поверхности раны отмечали большое количество эритроцитов и фибрина. В верхних слоях грануляционной ткани сохраняется значительное количество лейкоцитов (в среднем 10,1 в поле зрения) макрофагов было в 2 раза меньше – 5,2 в поле зрения. Как лейкоциты, так и макрофаги были в активном состоянии – активно фагоцитировали детрит. Морфологически признаки активации макрофагов заключались в наличии цитоплазматических отростков, гранул, овальных глобул липидного происхождения и миелиноподобных включений (рис.8). Количество фибробластов увеличилось почти в 2 раза по сравнению с предыдущим сроком – 3,5 и 6,3 соответственно. Больше было молодых клеток (рис.9), а коллагенобластов – зрелых, активно синтезирующих коллаген фибробластов – было значительно меньше. Васкуляризация раны улучшается – увеличивается количество сосудов – с 0,9 до 1,3 в поле зрения.

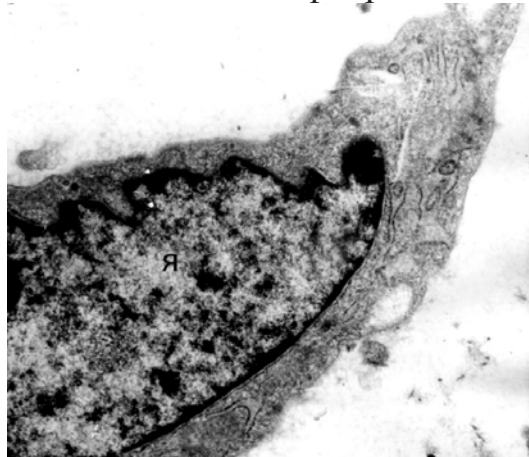


Рис.8 Функционально активный макрофаг



Я – ядро, л – капли липидов, мл – миелиноподобные структуры, в – вакуоль, цо – цитоплазматические отростки  
Ув. 12000

Рис.9 Молодой фибробласт



Я – ядро фибробласта

Ув. 12000

Таким образом, на 3 сутки лечения Бетадином признаки воспаления сохраняются, на что указывает значительное превышение количества лейкоцитов в ране над макрофагами. Увеличение количества и появление функционально активных фибробластов, а также некоторое увеличение количества сосудов в ране указывают на заполнение раневого дефекта развивающейся грануляционной тканью.

#### ***4-5 сутки лечения ран Бетадином***

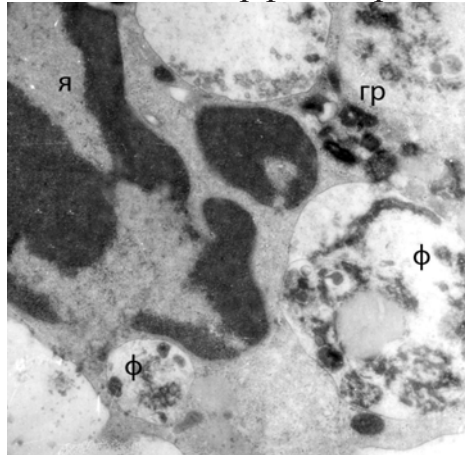
На поверхности раны отмечали скопления лейкоцитов, инфильтрация грануляционной ткани была незначительной. Количество лейкоцитов снизилось по сравнению с 3 сутками лечения ран – 10,1 и 7,3 соответственно. Количество макрофагов продолжает увеличиваться – 5,2 и 5,8 соответственно, но остается меньше количества лейкоцитов. Функциональная активность клеток была высокая – фагосомы с клеточным и микробным детритом, обилие цитоплазматических выростов, всевозможных

гранул в цитоплазме – все это морфологические признаки высокой фагоцитарной активности клеток (рис. 10).

Основным клеточным элементом грануляционной ткани является фибробласт. Количество фибробластов в ране продолжает увеличиваться (в среднем 6,3 и 7,3 в поле зрения соответственно). Преобладали фибробласты с умеренной продукцией коллагена. Гранулярная цитоплазматическая сеть в этих клетках занимает до 50% объема (рис.11). Митохондрии мелкие с плотным матриксом и кристами, комплекс Гольджи развит умеренно. Довольно много и молодых фибробластов способных к пролиферации. Ультраструктура клеток была подробно описана в I главе отчета.

Васкуляризация раны улучшается – продолжает увеличиваться количество сосудов (в среднем 1,3 и 1,5 в поле зрения соответственно). Появляются мелкие новообразованные капилляры окруженные перицитами и их отростками (рис.12).

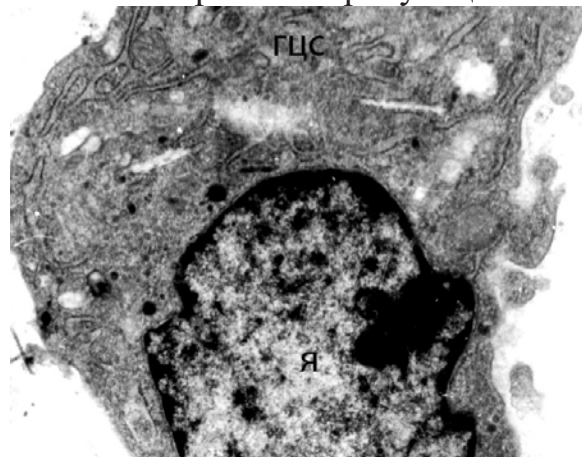
Рис.10 Фрагмент полиморфноядерного лейкоцита



Я – ядро, ф – фагосома, гр – гранулы

Ув.28000

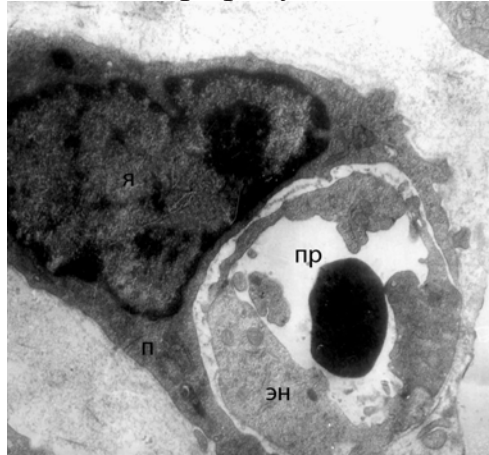
Рис.11. Фибробласт грануляционной ткани



Я – ядро, гцс – гранулярная цитоплазматическая сеть

Ув.15000

Рис.12 Капилляр грануляционной ткани



П – перицит, я – ядро перицита, эн – эндотелиоцит, лр – просвет капилляра с эритроцитом  
Ув. 12000

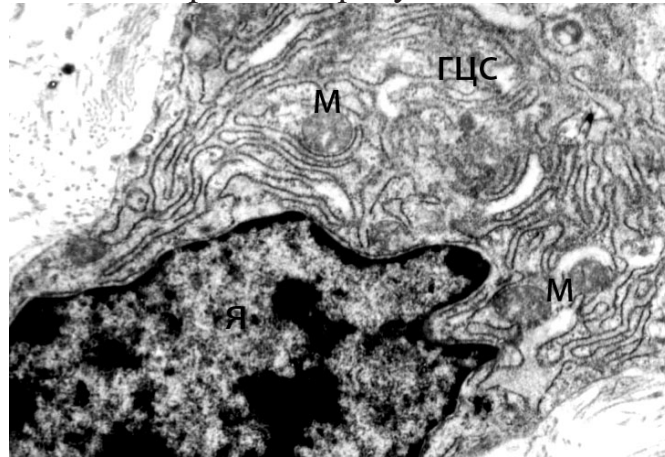
Таким образом, на 5 сутки лечения Бетадином постепенно увеличивается количество макрофагов и возрастает их фагоцитарная активность, что является необходимым условием для эффективного очищения ран от детрита и перехода раневого процесса во II фазу – регенерации. Раневой дефект заполнен развивающейся грануляционной тканью, на что указывает довольно большое количество молодых фибробластов способных к пролиферации.

#### **8 сутки лечения ран Бетадином**

На 8 сутки лечения ран на поверхности ран отмечаем небольшое количество лейкоцитов, клеточного детрита нет, инфильтрации грануляционной ткани не отмечалось. Количество макрофагов практически такое же, как и количество лейкоцитов (6,3 и 6,1 соответственно). Раневой дефект заполнен созревающей грануляционной тканью с большим количеством функционально активных фибробластов (в среднем 8,2 в поле зрения). Преобладали фибробласты интенсивно продуцирующие коллаген. Гранулярная цитоплазматическая сеть занимала практически всю цитоплазму. Митохондрии были крупных размеров с просветленным матриксом и сохраненной ориентацией крист, что указывает на активное состояние клетки (рис.13). На этом сроке лечения ориентации фибробластов параллельно поверхности раны еще нет.

Количество сосудов в грануляционной ткани увеличивается по сравнению с предыдущим сроком исследования (1,5 и 1,8 соответственно). В основном это были капилляры, но встречались и сосуды среднего калибра. Строение стенки сосудов было без изменений – контакты между эндотелиоцитами не нарушены, базальный слой несколько увеличен, отростки перицитов окружали капилляры, а вокруг более крупных сосудов располагались фибробласты.

Рис. 13 Фибробласт грануляционной ткани



Я – ядро, м – митохондрии, гцс – гранулярная цитоплазматическая сеть  
Ув.14000

Таким образом, на 8 сутки лечения ран Бетадином раневые дефекты были заполнены созревающей грануляционной тканью с большим количеством функционально активных фибробластов. Незначительные признаки воспаления отмечались в верхних слоях грануляционной ткани.

### ГЛАВА III

#### **СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОЦЕССА РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ В РАНАХ ПРИ МЕСТНОМ ЛЕЧЕНИИ РАН МАЗЬЮ СТЕЛЛАНИН-ПЭГ И БЕТАДИН.**

Заживление гнойных или вяло заживающих ран у больных характеризуется нарушением синхронизации фаз воспаления и регенерации, что проявляется в пролонгировании воспалительных изменений. При этом угнетается макрофагальная реакция, и отмечаются расстройства системы микроциркуляции. Одновременно происходит торможение процессов репарации, что характерно для длительно незаживающих ран.

Проведено морфологическое исследование биоптатов из гнойных ран в процессе местного лечения мазью Стелланин-ПЭГ и Бетадин.

С первых суток лечения Стелланином-ПЭГ функциональная активность фагоцитов повышается, что является необходимым условием



эффективного очищения ран. При лечении Бетадином воспалительная реакция и инфильтрация ткани нейтрофильными лейкоцитами сохраняется на 1-2 сутки лечения.

На 3 сутки лечения Стелланином-ПЭГ в ранах произошла замена нейтрофильного пула в очаге мононуклеарными фагоцитами, и процесс заживления ран вступил в фазу репарации. При лечении Бетадином лишь на 8 сутки лечения количество макрофагов незначительно превышает количество лейкоцитов.

Активное очищение гнойных ран при лечении Стелланином-ПЭГ приводит к интенсификации функциональной и пролиферативной активности клеток грануляционной ткани. Уже на 2 сутки лечения отмечали повышение функциональной и пролиферативной активности фибробластов, а на 4 сутки раны заполнены созревающей грануляционной тканью. На 5 сутки лечения ран Стелланином-ПЭГ дефекты были заполнены зрелой грануляционной тканью степень зрелости которой повышалась от поверхности раны ко дну. В ране появляются миофибробласты, ответственные за контракцию раны; фиброциты – функционально неактивные фибробласты.

При лечении ран Бетадином стимулирующий эффект выражен слабее созревание грануляционной ткани происходит позже. Более длительная воспалительная стадия приводит к позднему созреванию грануляционной ткани. Лишь на 8 сутки исследования созревающая грануляционная ткань заполняла раневой дефект.

При проведении морфометрического анализа было отмечено увеличение количества фибробластов в ране в процессе местного лечения Стелланином-ПЭГ в среднем в 7,5 раз (при сравнении количества клеток до лечения и на 8 сутки лечения ран), а при лечении Бетадином – в 6 раз, количества сосудов при лечении Стелланином-ПЭГ – в 2,4 раза, а при лечении Бетадином – в 2 раза, макрофагов при лечении Стелланином-ПЭГ – в 1,2 раза, а при лечении Бетадином – в 1,4 раза, количество лейкоцитов в ране уменьшилось при лечении Стелланином-ПЭГ – в 4 раза, а при лечении Бетадином – в 2,2 раза.

Таким образом, мазь Стелланин-ПЭГ при лечении гнойных ран с первых суток применения уменьшает воспалительные изменения в ране, активизируя нейтрофильные лейкоциты и макрофаги. При этом нормализуется система микроциркуляции, уменьшается отек ткани. Полноценное очищение ран при лечении Стелланином-ПЭГ улучшает состояние ран, стимулируя процессы регенерации в них, что приводит к интенсификации пролиферативной и функциональной активности клеток грануляционной ткани. Все это ускоряет заживление гнойных ран. Результатом применения мази Стелланин-ПЭГ явилось формирование на 8

сутки применения в вяло заживающих гнойных ранах зрелой грануляционной ткани с большим количеством фибробластов и волокнистых компонентов.

Заведующий лабораторией электронной микроскопии  
отдела патологической анатомии  
ФГУ Института хирургии им. А.В. Вишневского  
профессор

Б.В. Втюрин

Ведущий научный сотрудник  
лаборатории электронной микроскопии  
отдела патологической анатомии  
ФГУ Института хирургии им. А.В. Вишневского  
доктор биологических наук

И.А. Чекмарева