

*Данилов Р. К., Григорян Б. А., Гололобов В. Г., Графова Г. Я.,
Одинцова И. А., Хилова Ю. К., Русакова С. Э., Найденова Ю. Г.*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА

*Кафедра гистологии и эмбриологии (заведующий — проф. Р. К. Данилов)
Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург*

Развитие современного общества характеризуется возрастанием воздействия негативных антропогенных факторов на человека, одним из проявлений которых является огнестрельное повреждение органов опорно-двигательного аппарата. Морфология раны, вопросы диагностики и лечения ранений отражены в ряде крупных работ отечественных ученых [2, 4].

Цель исследования — выявить закономерные процессы регенерационного гистогенеза в ходе заживления кожно-мышечных ран и костных переломов после нанесения огнестрельного повреждения.

Работа проведена на белых беспородных крысах, кроликах, собаках с использованием экспериментальной модели огнестрельного ранения, разработанной на кафедре гистологии ВМедА. Исследования выполнялись в соответствии с «Международными рекомендациями по использованию животных в биологических и медицинских исследованиях» (2001).

Методы исследования — общегистологические, гистохимические, авторадиграфия (в том, числе биопсийная), цитофотометрия, электронная микроскопия, статистическая обработка данных. Сроки наблюдения кожно-мышечных ран составили 6 ч, 24 ч, 3, 6, 15 и 25 сут., заживление костных переломов исследовали с 3-х до 180-х сут.

Одной из основных проблем заживления дефектов кожи является восстановление эпидермиса. В первые часы после ранения в зоне мгновенной гибели тканей погибший эпителий имел строение, характерное для состояния паракератоза. Кератиноциты были сильно уплощены, оксифильны, с пикнотизированными палочковидными ядрами. В радиусе от 4 до 7 мм вокруг зоны первичного некроза эпидермис находился в состоянии паранекроза, самым заметным маркером которого является отсутствие зернистого слоя. В нем от 45 до 75 % базальных и супрабазальных клеток находилось на разных стадиях деструкции. С помощью кариологического анализа окрашенных по Фельгену препаратов были определены три основные формы деструкции клеток эпителия кожи: онкоз (вакуолярная дистрофия), кариолизис и апоптоз. Параллельно с гибелью клеток в описываемом участке эпидермиса перинекротической области отмечалась вспышка пролиферативной активности — 4,8 % базальных клеток находилось в S-периоде митотического цикла, тогда как индекс меченных ³H-тимидином ядер в контроле составлял 0,8 %, а вдали от раневого канала — 1,1 %. Во всех супрабазальных эпителиоцитах ядрышки были значительно увеличены и многие из них достигали гигантских размеров. Это свидетельствует об интенсивности белкового синтеза. Следовательно, в раннем посттравматическом периоде происходило ускорение реализации клетками потенциалов к развитию в соответствии с уровнем их дифференцировки: камбиальными — к пролиферации, специализирующимися — к синтезу специфических белков. Отсутствие в этом участке

пласта зернистого слоя, клетки которого ускоренно превратились в роговые чешуйки, позволяет предположить, что дифференцировка клеток шла по ускоренному пути, был нарушен синтез филаггрина и не происходило созревание кератина. Через 24–36 ч опыта эпидермис, ранее находившийся в состоянии паранекроза вокруг зоны первичного посттравматического некроза, полностью погибал и был отделен от жизнеспособной соединительной ткани дермы лейкоцитарным валом. Эпителизация дефекта начиналась после отделения лейкоцитарным валом жизнеспособных тканей кожи от некротизированных. Источником камбия для образования эпителиального регенерата служит эпителий волосяных воронок. Сохранивший свою целостность эпидермис участвовал в регенераторном процессе в меньшей степени, поскольку его край отстоял слишком далеко от зоны первичного некроза. Количество отсроченно гибнущих клеток в нем было достаточно высоким и составляло 4,1–15,4 %. Индекс меченых ядер был равен 22,4 %. Полная эпителизация межфолликулярных участков дермы происходила через 2,5 сут. после нанесения травмы. Новообразованный эпидермис представлял собой 3–4-слойный пласт изоморфных плоских клеток. Через 3,5 сут. дифференцировка эпителиального регенерата шла по типу дефинитивного ороговения. При этом в базальных клетках регенерата появляются митозы, и созревающие клетки постепенно вытесняют из пласта провизорные генерации эпителиоцитов. Однако длительное время регенерат находится в состоянии гиперкератоза. На 25-е сут. эпителий, перекрывающий место бывшего раневого канала, имеет ровную границу с соединительной тканью подлежащего рубца. Он представляет собой дефинитивно дифференцированный ороговевший пласт и отличается от исходной ткани несколько большей толщиной и отсутствием придатков. В нормализации структуры эпителиального регенерата важна запрограммированная гибель его клеток, которая наблюдается на протяжении всего восстановительного периода. Не исключена вероятность, что эпителий таким образом освобождается от дефектных стволовых клеток, в которых вследствие термического повреждения произошли нарушения генетического аппарата. Таким образом, в процессе посттравматического регенерационного гистогенеза эпидермиса помимо пролиферации и дифференцировки кератиноцитов важную роль играет их отсроченная гибель, которая способствует нормализации структуры эпидермального пласта. Она характеризовалась несколькими формами морфологических проявлений, особенностями пространственной и временной локализации. Деструкция клеток протекала по типу некроза, онкоза и апоптоза. При этом онкоз и некроз превалировали во все сроки наблюдения, а апоптоз становился более заметным в поздние сроки опытов.

Изучение особенностей регенерации соединительной ткани при огнестрельных повреждениях также остается одним из актуальных вопросов современной гистологии. Особенностью повреждения соединительной ткани кожи огнестрельным снарядом является обширная зона первичного посттравматического некроза и центробежное расширение во времени перинекротической области, где регистрируется большое количество погибших клеток. Возникший комплекс изменений можно определить как системно-органный дезинтеграцию, включающую и дезинтеграцию клеточных дифферонов дермы. Об этом свидетельствует высокий индекс гибели клеток, который колеблется от $38 \pm 3 \%$ до $59,4 \pm 13,2$, и нарушение оптических свойств межклеточного вещества. Цитофотометрический и поляризационно-оптический анализы межклеточного вещества свидетельствуют, что огнестрельное

повреждение приводит к глубоким деструктивным изменениям межклеточного вещества гистиона соединительной ткани [5]. В гбнущих фибробластах преобладают явления пикноза и перинуклеарного отека. Наблюдаемая у части фибробластов конденсация и маргинация хроматина свидетельствует об их гибели путем апоптоза. Через 24 ч после повреждения регистрируются меченные ^3H -тимидином клетки в гиподерме перинекротической области, прилежащей к лейкоцитарному валу. Наибольшая пролиферативная активность клеток соединительной ткани регистрируется на 3–6-е сут. после травмы. В самой развивающейся грануляционной ткани фибробластические клетки размножаются менее активно. Через сутки после ранения среди общего числа меченых клеток в гиподерме и соединительной ткани кожной мышцы периваскулярные клетки в области выходной раны составляют 58 %. К 3-м сут. опыта в выходной ране среди всех меченых клеток перинекротической области периваскулярные клетки сохраняют высокий индекс пролиферации, который равен 54 %. Анализ характера распределения меченых клеток по глубине кожи показывает, что большая часть клеток (около 70 %) как во входной так и в выходной ране локализуется в области кожной мышцы и в гиподерме. Кроме процессов пролиферации и дифференциации в образующейся грануляционной ткани довольно часто встречаются гбнущие клетки ($6,3 \pm 1,5$ %). В перинекротической области также наблюдаются явления отсроченной гибели фибробластов ($19,7 \pm 2,5$ %). К 15-м сут. опыта область повреждения полностью заполняется грануляционной тканью. Адаптивная перестройка соединительнотканного регенерата проявляется в постепенном замещении грануляционной ткани рубцом и сопровождается запрограммированной гибелью фибробластов. В данных условиях эксперимента на всех сроках наблюдается гибель клеток. Наиболее неблагоприятным является сохранение гбнущих клеток тканей кожи на поздних сроках опыта, когда сформировался регенерат, который внешне выглядит вполне благополучно. Однако при гистологическом исследовании в нем сохраняются очаги лейкоцитарной инфильтрации и мозаично расположенные некротически измененные клетки. Это создает условия для развития тканей по механизму незавершенного гистогенеза и является морфологической особенностью заживления огнестрельной раны.

Процессы активации и пролиферации в огнестрельной ране характерны не только для эпителия и соединительной ткани, но и для скелетной мышечной ткани. Для огнестрельного повреждения скелетных мышц характерны стереотипные гистологические процессы и временные фазы.

Диагностическим маркером начала регенерационного гистогенеза в мышечной ткани является активация камбиальных элементов, представленных миосателлитоцитами [6, 7, 8, 9]. Миосателлитоциты в результате дивергентной дифференцировки создают популяцию миобластов, формирующих в последующем симпласты и мышечные трубочки, которые, однако, после огнестрельного повреждения не дифференцируются в мышечные волокна и погибают.

Наряду с гибелью новообразованных симпластов продолжается гибель предсуществующих мышечных волокон. Это поздняя отсроченная гибель гистологических структур, являющаяся специфичной для огнестрельных ранений. Высокая степень выраженности внутридифферонной гетероморфии может служить диагностическим критерием течения раневого миогенеза как незавершенного. На поздних сроках после огнестрельной травмы сохраняется междифферонная гетероморфия. Ее проявлениями наряду с фибробластами являются фагоцитарные и секреторные

макрофаги, а также многочисленные плазматические клетки. Это следует расценивать как неблагоприятный фактор, осложняющий течение раневого процесса при заживлении огнестрельных ран. В целом, для огнестрельного повреждения характерна регенерация по заместительному типу таких дифференцированных тканей, как скелетная мышечная.

Для огнестрельных переломов весьма существенны особенности гистологического строения регенерата. Через 3 сут. раневой канал заполнен гематомой, тканевым и клеточным детритом, мелкими костными фрагментами. К 6-м суткам опыта активный фагоцитоз макрофагами детрита способствовал разворачиванию регенерационного остеогенеза. К 10-м сут. опыта межотломковое пространство заполнялось реактивно измененной рыхлой соединительной тканью по своей организации в значительной степени напоминающей грануляционную ткань, у края отломков появлялись костные макрофаги — остеокласты. Интермедиарный остеогенез проявлялся, после того как остеокласты резорбировали некротические участки кости по краю отломков. Костные осколки также участвовали в остеорепарации. Остеобласты не утрачивали способности синтезировать ДНК. Индекс меченых ядер остеобластов наиболее высок ($7,8 \pm 0,9 \%$) на этот срок после травмы. Зона костеобразования хорошо кровоснабжена, что являлось способствующим фактором для этого процесса. Подтверждением того, что на месте дефекта кости происходило формирование сложного тканевого регенерата, служило выраженное наличие в нем гиалиновой хрящевой ткани (доля хрящевых клеток — $15,9 \pm 1,7 \%$).

Через 30 сут. от начала эксперимента, согласно морфометрическим данным, значительное представление есть в регенерате имел макрофагально-фибробласто-эндотелиальный гистион. Отмечено увеличение доли остеокластов ($5,5 \pm 0,7 \%$), свидетельствующее об их совместном с остеобластами участии в регенерационном эндооссальном остеогенезе и ремоделировании костного регенерата. Резко (более чем в 2 раза) повысились количественные показатели хрящевых клеток. При очевидном нарастании темпов регенерационного остеогенеза репаративный хондрогенез опережает развитие ретикулофиброзной костной ткани при заживлении перелома на этот срок.

Через 45–60 сут. опыта нарастали процессы минерализации костной части регенерата, а также наблюдались очаги обызвествления гиалиновой хрящевой ткани, приводящего к деструкции и гибели хондроцитов. Вслед за этим проявлялись признаки закономерного процесса — репаративного эндохондрального остеогенеза. Регенерация тканей при столь обширной и тяжелой травме проходила в условиях, не способствующих более полной реализации остеогенных потенциалов элементов рассредоточенного камбия и дефицита последних, разворачивалась с участием в этом процессе тканей (волокнистой соединительной, хрящевой), имеющих больший эволюционный возраст и более высокие уровень и темп заместительной регенерации.

Адаптация клеточных, тканевых и гистионных структур к возникающим и меняющимся условиям раневого гистогенеза имела пролонгированное течение. На 60–90-е сут. опыта вновь образованная ретикулофиброзная костная ткань регенерата подвергалась перестройке. Отмечалось формирование структур, сходных по архитектонике с первичными остеонами. Они закладывались вокруг межбалочных промежутков, заполненных соединительной тканью с кровеносными сосудами, периваскулоцитами и элементами остеобластического дифферона. В этот период

вновь была выражена реакция остеокластов, участвовавших в ремоделировании костного регенерата. Через 60 сут. уменьшились доли фибробластов ($17,7 \pm 1,6 \%$) и хондроцитов ($28,7 \pm 2,4 \%$), но увеличились — остеоцитов ($17,3 \pm 1,9 \%$) и остеокластов ($8,5 \pm 2,0 \%$). Продолжалась пролиферация остеобластов ($4,2 \pm 0,5 \%$) и их дифференцировка (соотношение остеобластов и остеоцитов — 53 : 47). К началу восстановления костномозгового канала (120-е сутки) поверхность эндостального регенерата становилась неровной, так как формообразовательные процессы в этой зоне приводили к появлению костных перекладин. Последние, являясь выростами внутренних окружающих пластинок, усложнялись по форме (180-е сут.). Между перекладинами разрасталась жировая ткань, которая заселялась кроветворными элементами в виде очагов или диффузных скоплений. Полученные результаты по выявлению закономерностей посттравматического гистогенеза в условиях заживления костных переломов являются теоретическим обоснованием разработки и внедрения в практическую медицину новых лечебных мероприятий при оказании помощи пострадавшим [1, 3].

Проведенная работа свидетельствует о том, что травма вызывает реакции всех структурных уровней организации живого. Вне зависимости от свойств травмирующего агента реакции тканевых структур стереотипны как по временным, так и по пространственным характеристикам. Они проявляются фазностью течения, активацией источников регенерации, их пролиферацией и дифференцировкой, взаимодействием клеточных дифферонов и последующей адаптивной перестройкой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брюсов П. Г. Боевые повреждения конечностей. — М.: ГЭОТАР, 1996.
2. Гирголав С. С. Огнестрельная рана. — Л.: ВМедА, 1956.
3. Гололобов В. Г., Дулаев А. К., Деев Р. В. и др. Новый подход к лечению дефектов длинных костей конечностей. От культур *in vivo* к культурам *in vitro* // Тез. конф. «Анатомия и военная медицина». — СПб., 2003. С. 104—106.
4. Давыдовский И. В. Огнестрельная рана человека. Морфологический и общепатологический анализ. — М.: АМН СССР, 1952.
5. Данилов Р. К., Хилова Ю. К., Русакова С. Э. Морфофункциональная характеристика регенерации соединительной ткани дермы крыс при огнестрельном повреждении // Морфология. 1997. Т. 111. № 1. С. 71—74.
6. Данилов Р. К. Значение концепции профессора А. А. Клишова о системно-структурной организации гистогенеза и регенерации тканей для понимания гистологии огнестрельной раны // Тез. конф. «Гистогенез и регенерация тканей». — СПб., 1995, с 5—6.
7. Данилов Р. К., Одинцова И. А., Найденова Ю. Г. Клетки миосателлитоциты и проблема регенерации скелетной мышечной ткани // Успехи соврем. биологии. 2005. Т. 115. № 3. С. 595—608.
8. Шубникова Е. А., Юрина Н. А., Гусев Н. Б. и др. Мышечные ткани. — М.: Медицина, 2001.
9. Sheehan S. M., Tatsum R., Temm-Grove C. G., Allen R. E. HGF is an autocrine growth factor for skeletal muscle satellite cells *in vitro* // Muscle Nerve. 2000. V. 23. № 2. P. 239—245.