

6. *Дыбан А. П., Дыбан П. А.* Стволовые клетки в экспериментальной и клинической медицине // Медицинский академический журнал. 2002. Т. 2. № 3. С. 3–24.
7. *Заварзин А. А.* Избранные труды. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1953.
8. *Клишов А. А.* Гистогенез и регенерация тканей. Л.: Медицина, 1984.
9. *Одинцова И. А.* Гистологические критерии заживления кожно-мышечной раны в эксперименте // Труды Воен.-мед. акад. СПб., 2004. Т. 257. С. 88–93.
10. *Руководство по гистологии: В 2 т. / Под ред. Р. К. Данилова, В. Л. Быкова.* СПб.: СпецЛит, 2001.
11. *Хилова Ю. К.* Регенерация дермы при огнестрельных повреждениях в свете новых представлений о гистионе // Труды Воен.-мед. акад. СПб., 2004. Т. 257. С. 77–87.
12. *Шубникова Е. А., Юрина Н. А., Гусев Н. Б.* и др. Мышечные ткани. М., 2001.
13. *Figeac N., Daczewska M., Marcell C.* et al. Muscle stem cells and model systems for their investigation // Dev. Dyn. 2007. Vol. 236. P. 3332–3342.
14. *Yablonka-Reuveni Z., Day K., Vine A., Shefer G.* Defining the transcriptional signature of skeletal muscle stem cells // J. Animal Sci. 2008. Vol. 86. P. 207–216.
15. *Xiaozhong Shi, Garry D.* Muscle stem cells in development, regeneration and disease // Genes Dev. 2006. Vol. 20. P. 1692–1708.

Русакова С. Э., Графова Г. Я.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ В ЭПИТЕЛИИ И СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ КОЖИ КРЫС ПОСЛЕ ОГНЕСТРЕЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

*Кафедра гистологии (заведующий – проф. Р. К. Данилов) Военно-медицинской академии
им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург, e-mail: rusakova-svetik@mail.ru*

Огнестрельное ранение всегда сопровождается повреждением кожных покровов, поэтому реакция тканей кожи на этот вид повреждения и процессы восстановления целостности кожных покровов являются актуальной медико-биологической проблемой.

В настоящее время экспериментально доказано существование трех разновидностей эпидермальных стволовых клеток. В эпидермисе обнаружены только клетки первой разновидности, которые, участвуя в регенерации эпидермиса, дают начало клеткам эпидермальной пролиферативной единицы. В бугорках наружных волосяных влагалищ (под устьем выводных протоков сальных желез) имеются все три разновидности стволовых клеток: первой, второй, являющейся источником развития волоса, и третьей – источник развития эпителиоцитов наружного волосяного влагалища.

Источники возникновения раневых фибробластов, по современным литературным данным, являются: местные фибробласты, мигрирующие предшественники из гематогенных органов и периваскулярные клетки.

В процессе регенерации между компонентами эпидермиса и дермы существуют тесные количественные взаимоотношения. Строгая синхронизация процесса эпителизации и созревания грануляционной ткани является важнейшим условием нормального хода заживления раны. Установлено, что кератиноциты и фибробласты оказывают взаимное влияние друг на друга, паракринно регулируя пролиферацию, дифференциацию и миграцию [10].

Цель работы – анализ полученных данных гистоавтордиографических исследований эпителия и соединительных тканей кожи крыс при заживлении после огнестрельного повреждения с позиции современных представлений о взаимодействии кератиноцитов и фибробластов в раневом гистогенезе.

Материал и методы исследования. Исследование регенерации кожной раны проводили на модели огнестрельной раны кожи спины крысы. Эксперимент проводился на 27 белых беспородных крысах (массой 150–200 г).

Огнестрельное ранение крысам наносили под эфирным ингаляционным наркозом в складку кожи спины каудальнее межлопаточной области из пистолета Марголина пулей калибра 5,6 мм в упор через 15–20 слоев марли. Кусочки кожи размером 0,5 × 1,5 см брали из области, прилежащей непосредственно к зоне дефекта входной и выходной огнестрельной раны. Взятие материала проводилось через 6, 24 ч, 3, 6, 15 и 25 суток. Изучение пролиферативной активности клеток проводили с помощью метода гистоавтордиографии.

Выведение животных из эксперимента осуществляли передозировкой наркотика согласно плану исследований в соответствии с требованиями приказа МЗ СССР № 175 от 12.08.77.

Индекс меченых ядер (ИМЯ) определяли на 1000 клеток исследуемой зоны кожи крыс. Среди кератиноцитов отдельно подсчитывали ИМЯ эпидермиса и эпителия волосяных воронок. Подсчет ИМЯ клеток фибробластического ряда проводили с учетом гистотопографии кожи (от базальной пластинки эпидермиса до глубоких слоев). При этом из общего количества ДНК-синтезирующих клеток фибробластического ряда выделяли фибробласты и фиброциты, расположенные между пучками коллагеновых волокон, а также клетки, располагающиеся по ходу сосудов в их наружном слое (периваскулярные).

Все измерения проводили в перинекротической области огнестрельной раны, которая представляет собой участок кожи от первого сохранившегося волосяного фолликула и распространяется центробежно на 5–6 мм от раневого канала. Математический анализ проводился по обычной методике [4].

Результаты исследования и их обсуждение. Огнестрельное повреждение по сравнению с колотыми, резаными и ушибленными ранами характеризуется высокой кинетической энергией пули, в результате воздействия которой образуется обширная зона повреждения. Непосредственно около раневого канала определяется зона первичного посттравматического некроза и далее перинекротическая область, граничащая с неизменными тканями [2]. После огнестрельного повреждения в складке кожи образовалась сквозная рана с диаметром входного и выходного отверстия 6–8 мм. Во входной огнестрельной ране пороховые газы при выстреле в упор оказывали дополнительное повреждающее воздействие в виде поверхностного ожога, приводящего к гибели эпидермиса на расстоянии до 8 мм от краев

раны. Через 6 часов опыта мгновенно погибший эпителий (как покровный, так и эпителий волосяных фолликулов) наблюдался вокруг раневого канала в зоне первичного посттравматического некроза в радиусе 1,2–1,5 мм [1]. Особенностью повреждения соединительной ткани кожи является обширность зоны первичного посттравматического некроза и центробежное расширение перинекротической области. В коже возникает комплекс изменений, приводящих к дезинтеграции тканей и клеточных дифферонов дермы. Граница между погибшими тканями кожи и тканями, сохранившими жизнеспособность, через 6 часов после травмы была достаточно выражена, хотя демаркационная линия (лейкоцитарный вал) еще не сформирована. Параллельно с гибелью клеток в перинекротической области отмечается вспышка пролиферативной активности базальных кератиноцитов, 4,8 % клеток находятся в S-периоде клеточного цикла, тогда как в контроле индекс меченых ядер (ИМЯ) был равен 0,8 %, а вдали от раневого канала – 1,1 %.

После ранения в коже возникает сложное взаимодействие клеток участников воспаления и процессов восстановления эпидермиса и дермы. Это взаимодействие осуществляется с помощью группы рецепторов распознавания, вовлеченных в защиту организма хозяина против различных патогенных микроорганизмов и названных Toll-like рецепторами (TLRs). Активация TLRs ведет к производству цитокинов, хемокинов, антимикробных пептидов кератиноцитами и другими типами клетками кожи, экспрессирующими Toll-like рецепторы (клетки Лангерганса в эпидермисе; резидентные и иммуносистемные клетки, такие как макрофаги, дендритные клетки, Т- и В-лимфоциты, тучные клетки в дерме; эндотелиальные клетки микроциркуляторного русла кожи; стромальные клетки – фибробласты и адипоциты) [9]. Повреждение и микробное вторжение в рану вызывает изменение микроокружения кератиноцитов и клеток дермы. В интактной коже клетки находятся в контакте с плазменным фильтратом, ранение приводит к выходу сыворотки крови из поврежденных кровеносных сосудов. Исследования влияния на кератиноциты факторов роста сыворотки крови показали, что эпидермальный фактор роста и трансформирующий фактор роста α (TGF- α) являются главными факторами сыворотки крови, которые оказывают митогенное влияние на кератиноциты человека [6]. Стимулами для начала миграции эпителиоцитов являются также и аттрактанты, вырабатываемые фибробластами раневого ложа.

В нашем эксперименте к концу первых суток формировался лейкоцитарный вал, отделяющий зону некроза от тканей перинекротической области, сохранивших жизнеспособность. Миграции кератиноцитов сопутствовало увеличение митотической активности клеток перинекротической области. Через 24 часа после повреждения уже регистрировалась различная пролиферативная активность клеток эпителия наружных волосяных влагалищ, расположенных в участках кожи с полностью погибшим покровным эпителием, и в тех участках кожи, где покровный эпителий сохранился. В эпителии волосяных воронок ИМЯ в первые сутки опыта резко поднимался до 42 % и продолжал расти до 6-х суток, достигая максимума 64,1 %. К 25-м суткам наблюдения этот показатель постепенно снижался до 7,1 %, превышая, тем не менее, контрольные данные (в интактной коже ИМЯ клеток эпителия наружных волосяных влагалищ равен 0,24 %). Эпителий, сохранивший свою целостность, участвовал в регенераторном процессе в мень-

шей степени, так как его край далеко отстоял от зоны первичного некроза. По литературным данным, расширенная эпидермальная реакция на повреждение отмечается у мышей-мутантов, испытывающих недостаток развития волосяных фолликулов на теле и хвосте [5].

Увеличение митотической активности базальных эпителиоцитов и миграция эпителиоцитов из верхней трети волосяного влагалища способствует увеличению толщины эпидермиса, которая становится в 2–3 раза больше нормы. Гипертрофия эпителия свидетельствует о формировании его по ускоренному пути, что позволяет говорить о формировании провизорного эпителия.

Через трое суток после ранения 43,3 % базальных эпителиоцитов перинекротической области включает изотоп, что свидетельствует о продолжающейся пролиферативной фазе регенерации и начале проявления механизмов регенерационного гистогенеза, в результате которого формируется эпителиальный регенерат, приближающийся по строению к нормальному.

Прролиферативная фаза регенерационного гистогенеза тесно связана с миграцией малодифференцированных эпителиоцитов, которая возможна при развитии грануляционной ткани, заполняющей дефект. Формирование грануляций и миграция клеток фибробластического дифферона начинается с 3-х суток опыта из глубоких хорошо кровоснабжаемых слоев кожи – соединительнотканного футляра кожной мышцы перинекротической области раны, где ИМЯ клеток фибробластического дифферона достигает 17 % (в контроле – 0,6 %). Следует отметить, что через сутки после ранения из общего числа меченых клеток глубоких слоев кожи (см. табл.) в области выходной раны периваскулярные клетки составляют 58 %. Остальные клетки – это свободно лежащие фибробласты. В области входной раны, наоборот, большую часть клеток, включающих изотоп, составляют свободнолежащие фибробласты.

В выходной ране на этот срок периваскулярные клетки перинекротической области сохраняют высокий индекс пролиферации, который равен 54 %. При этом ИМЯ периваскулярных клеток возрастает и во входной ране – 30 %. Анализ распределения меченых клеток по глубине кожи показывает, что большая часть клеток (около 70 %) как во входной, так и в выходной ране локализуется в глубоких слоях кожи (в области соединительнотканного футляра кожной мышцы и в гиподерме).

Общеизвестно, что адвентициальные клетки представляют собой мощную популяцию малодифференцированных предшественников, способных дифференцироваться в клетки костной, соединительной, хрящевой и жировой тканей. Интересные данные о роли этих клеток получены в исследовании S. Raquet-Fifield, A. Li и др. (Австралия), посвященных участию перицитов в регенерации эпидермиса. В них идентифицирован ген (LAMA5), который кодирует laminin alpha 5 и вызывает регенерацию эпидермиса [8].

Эпидермально-соединительнотканное взаимодействие в ходе заживления раны влияет на уровень экспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), играющего важную роль в ангиогенезе во время заживления. Взаимодействие кератиноцитов и фибробластов дермы кожи модулирует уровень экспрессии и секреции эндотелиального фактора роста и ангиогенез [7]. Получены данные о том, что кератиноциты стимулируют фибробласты к синтезу факторов

роста, которые, в свою очередь, будут стимулировать пролиферацию кератиноцитов в двойном паракринном образе. Кроме того, под контролем кератиноцитов фибробласты могут приобрести фенотип миофибробластов, участвующих в контракции раны. Это взаимодействие зависит от баланса между противовоспалительным и трансформирующим факторами роста (TGF), в котором β доминирует [10]. В нашем исследовании формирование грануляционной ткани к 6-м суткам опыта способствует росту пролиферативной активности базальных эпителиоцитов. ИМЯ базальных кератиноцитов репаративного регенерата эпидермиса, мигрирующего по подлежащим грануляциям, равен 24 % (см. табл.). Однако синтез ДНК завершается не митозом, а полиплоидизацией клеточных элементов базального слоя регенерата. Именно этим можно объяснить гигантские размеры клеток, характерные для эпидермальных регенератов. Толщина покрова многократно превышает толщину нормального эпителия, особенно если росту эпителия препятствует состояние подлежащей соединительной ткани — очаги вторичного некроза, недоразвитие грануляционной ткани.

На 6-е сутки опыта в грануляционной ткани клетки фибробластического ряда, находящиеся S-периоде клеточного цикла, составляют более 7 %, причем ДНК-синтезирующие фибробласты локализуются преимущественно в поверхностных слоях грануляционной ткани, тогда как в глубоких слоях уже начинается процесс их дифференцировки, сопровождающийся образованием межклеточного вещества. Доля меченых периваскулярных клеток во входной ране равна 46,6 %, в выходной — 38,6 %, что в 1,5–1,75 раза превышает долю периваскулярных клеток соединительной ткани дермы кожи перинекротической области раны. На 6-е сутки опыта индекс пролиферации клеток фибробластического дифферона перинекротической области в области соединительнотканного футляра кожной мышцы превышает таковой в грануляционной ткани в 2–2,5 раза, пролиферация протекает примерно с одинаковой интенсивностью как в поверхностных, так и в глубоких слоях кожи (см. табл.). Высокая концентрация клеток фибробластического ряда в грануляционной ткани при сравнительно умеренной пролиферативной активности клеток (относительно периферии раны) свидетельствует о миграции клеток в центростремительном направлении, что обеспечивает скорейшее заживление кожной раны. Миграция, пролиферация и дифференцировка клеток фибробластического дифферона совпадает с одноименными гистогенетическими процессами в эпителиальном регенерате и происходит синхронно с ростом новообразующихся сосудов из хорошо васкуляризованных глубоких слоев кожи. В эпителии перинекротической области сохраняется пролиферация как покровного эпителия, так и эпителия волосяных влагалищ. Несмотря на активную пролиферацию и гипертрофию, к 6-м суткам еще не вся рана эпителизирована. Передний свободный край эпителия имеет форму уплощенного пласта, постепенно мигрирующего по новообразованной грануляционной ткани к центру дефекта.

К 25-м суткам опыта область повреждения полностью заполняется грануляционной тканью, покрытой несколько утолщенным эпителием, расположенным на ровной базальной мембране. Волосяные фолликулы отсутствуют. Новообразованный эпителий перинекротической области, расположенный между волосяными фолликулами, быстрее восстанавливает свою нормальную структуру, чем

Таблица 1

ИНДЕКС МЕЧЕННЫХ ³H-ТИМИДИНОМ ЯДЕР ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК И КЛЕТОК ФИБРОБЛАСТИЧЕСКОГО ДИФФЕРЕНА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ В ОБЛАСТИ ВХОДНОЙ (ЗНАЧЕНИЯ В ЧИСЛИТЕЛЕ) И ВЫХОДНОЙ (ЗНАЧЕНИЯ В ЗНАМЕНАТЕЛЕ) ОГНЕСТРЕЛЬНОЙ РАНЫ КОЖИ КРЫС

Зоны кож. Сроки опыта	Репаративный регенерат		Перинекротическая область						Эпидермис 6–9 мм от зоны некроза
	Эпидермис	Грануляц. ткань	Эпидермис 1,5–5,5 мм от зоны некроза	Эпителий волосяных влагалищ в радиусе 3 мм от зоны некроза	Соединительная ткань (0–500мкм от базальной пластинки)	Соединительная ткань над кожной мышцей (500– 700мкм)	Соединительно- тканый футляр кожной мышцы (700–900 мкм)	Типодерма (900 мкм и более)	
6 ч	нет	нет	2,7±0,1	нет	нет нет	нет нет	2,3±0,9 нет	нет нет	
24 ч	нет	нет	нет	42,0±0,2	нет нет	0,2±0,1 2,3±0,7	0,2±0,1 0,2±0,1	0,8±0,3 3,4±0,6	22,4±0,4
3 сут	11,2±2,3	нет	43,3±0,5	39,4±0,4	10,9±2,5 7±1	6,2±1,3 4,2±0,7	17,3±1,6 17,6±1,4	11,2±1,4 13,8±1,9	11,3±0,4
6 сут	24,1±2,0	7,4±0,6 7,1±0,7	12,1±0,3	64,1±0,5	11±2 13,2±2,6	9±1 19,2±2,7	12±1 16,3±2,4	8,4±1,4 6,4±2,1	5,2±1,3
25 сут	нет	0,6±0,2 0,62±0,2	4,5±0,1	7,1±0,1	2,9±0,5 0,7±0,3	0,9±0,5 0,5±0,3	нет 0,6±0,2	нет 0,8±0,7	0,9±0,1
Контроль (интактн. кожа)			0,8±0,2	0,24±0,07	0,6±0,2	нет	нет	0,4±0,1	

эпидермис, покрывающий грануляционную ткань. Пролиферация фибробластов сохраняется преимущественно в поверхностном слое регенерата и субэпителиальном слое дермы перинекротической области. В зоне бывшего раневого канала выявляется участок эпидермиса, расположенный на ровной базальной мембране. Здесь нет волосяных фолликулов. По литературным данным, наиболее вероятными предшественниками фибробластов являются малодифференцированные периваскулярные клетки. Результаты собственных исследований также показали, что одним из источников раневых фибробластов могут являться периваскулярные клетки сосудов перинекротической области глубоких слоев кожи, а также фибробласты соединительнотканного футляра кожной мышцы и свободнолежащие фибробласты.

Таким образом, в процессе регенерации кожи после повреждения между ведущими клеточными дифферонами эпидермиса и дермы как регенерата, заполняющего дефект, так и тканей перинекротической области существует постоянное взаимодействие, обуславливающее фазность и синхронизацию течения процесса восстановления кожи, и включает регенерацию по заместительному типу (развитие грануляционной ткани), отражающую срочную реакцию организменного уровня, и регенерационный гистогенез, наблюдаемый в перинекротической области. Взаимодействие этих двух форм регенерации влияет на реализацию гистобластических потенций и индивидуальные особенности заживления раны.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Графова Г. Я.* Регенерация эпидермиса после огнестрельного ранения кожи // *Фундаментальные и прикладные проблемы гистологии: гистогенез и регенерация тканей. Труды Военно-медицинской академии / Под ред. Р. К. Данилова.* СПб.: ВМедА, 2004. Т. 257. С. 68–76.
2. *Данилов Р. К.* Раневой процесс: гистогенетические основы. СПб.: ВМедА, 2008.
3. *Данилов Р. К., Хилова Ю. К., Русакова С. Э.* Морфофункциональные особенности регенерации соединительной ткани дермы крыс после огнестрельного повреждения // *Морфология.* 1997. Т. 111. № 1. С. 70–74.
4. *Количественные методы исследования функциональной активности клеток и тканей: методические рекомендации / Сост. Р. К. Данилов, В. В. Сперанский.* Уфа: Изд-во БГМИ, 1988.
5. *Langton A. K., Herrick S. F., Headon D. J.* An extended epidermal response heals cutaneous wounds in the absence of a hair follicle stem cell contribution // *J. Invest. Dermatol.* 2008. Vol. 128. N 5. P. 1059–1061.
6. *Li Y., Fan J., Chen M., Li W., Woodley D. T.* Transforming growth factor – alpha: a major human serum factor promotes human keratinocyte migration // *J. Invest. Dermatol.* 2006. Vol. 210. N 1. P. 2096–2105.
7. *Ong C. T., Khoo Y. T., Tan E. K., Mukhopadhyay A., Do D. V., Han H. C., Lim I. J., Phan T. T.* Epithelial – mesenchymal interactions in keloid pathogenesis modulate vascular endothelial growth factor expression and secretion // *J. Pathol.* 2007. Vol. 211. N 1. P. 95–108.

8. *Paquet-Fifield S., Li A., Aitken T., Gangatirkar P. et al.* A role for pericytes as microenvironmental regulators of human skin tissue regeneration // *J. Clin. Invest.* 2009. Vol. 119. N 9. P. 2795–2806.
9. *Pivarcsi A., Kemeny L., Dobozy A.* Innate immune functions of the keratinocytes. A review // *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2004. Vol. 51. N 3. P. 303–310.
10. *Werner S., Krieg T., Smola H.* Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing // *J. Invest. Dermatol.* 2007. Vol. 127. N 5. P. 998–1008.

Силантьева Т. А.

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕПАРАТИВНОГО КОСТЕОБРАЗОВАНИЯ ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ ИЗОЛИРОВАННЫХ ПЕРЕЛОМОВ КОСТЕЙ ТАЗА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

ФГУ Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. академика Г. А. Илизарова Росмедтехнологий, Курган, e-mail: tsyl@mail.ru

Проблема репаративной регенерации остается одной из центральных среди теоретических основ ортопедии и травматологии. Успехи, достигнутые в изучении репаративной регенерации кости, позволили сформулировать положения о биологических свойствах и реактивности костной ткани [1, 2, 3]. Сегодня, благодаря ряду технических усовершенствований, все шире используют известные пластические свойства различных видов соединительной ткани. В этом плане следует упомянуть получившие признание и распространение во всем мире аппараты Г. А. Илизарова, позволяющие на основе чрескостного остеосинтеза достигать восстановления кости после перелома в исходной длине и форме [4]. Одним из развиваемых направлений является изучение репаративного процесса при заживлении переломов костей таза в условиях внешней аппаратной фиксации. Интерес к этой проблеме обусловлен, во-первых, тяжестью травмы и высоким процентом выхода на инвалидность после применения консервативных способов лечения [5, 6], во-вторых – отсутствием экспериментальных морфологических работ, за исключением единичных и не рассматривающих применение фиксирующих средств [7].

Целью исследования являлось сравнительное изучение гистологических особенностей репаративного остеогенеза при заживлении переломов костей таза при консервативном лечении и в условиях чрескостного остеосинтеза.

Материал и методы исследования. Работа основана на анализе результатов эксперимента, проведенного на 78 взрослых беспородных собаках. Операции выполнены в экспериментальном отделе ФГУ РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова под руководством д. м. н. К. П. Кирсанова. У животных моделировали переломы крыла (I группа, $n = 10$) и тела (II группа, $n = 8$) подвздошной кости; на модели центрального поперечного перелома вертлужной впадины исследовали заживление внутрисуставных повреждений костей таза (III группа, $n = 25$). После получения модели перелома осуществляли чрескостный остеосинтез таза аппаратом