

ГИСТОГЕНЕЗ И РЕГЕНЕРАЦИЯ ТКАНЕЙ

Алексеева Н. Т.¹, Никитюк Д. Б.²

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК ПРИ РЕГЕНЕРАЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ В КОЖЕ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ КРОВИ

¹*Кафедра нормальной анатомии человека (заведующая – доц. Н. Т. Алексеева) Воронежской государственной медицинской академии им. Н. Н. Бурденко, Воронеж;*

²*Кафедра анатомии человека (заведующий – академик РАМН, проф. М. Р. Сапин) Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова, Москва, e-mail: alexeevani@list.ru*

Изучение участия различных клеточных дифферонов в восстановительных процессах при повреждении кожи представляется важным, так как они являются морфологическим эквивалентом точек приложения различных методов регионального воздействия, что определяет тактику лечебных мероприятий и позволяет прогнозировать течение регенерационного процесса [1, 6, 9]. Известно, что для раневого процесса характерны сложные межклеточные взаимоотношения, которые определяются разнообразием и степенью дифференцировки клеток [2, 4, 7], при этом особое место в регенерации занимают тучные клетки. Они являются регуляторами как сосудистых реакций в зоне травмы, так и иммунологических, защитных и репаративных процессов в ране [8]. Для тучных клеток характерно избирательное накопление в тканях, обеспечивающих барьерную функцию, так как данные клетки одними из первых инициируют защитные механизмы, что обуславливает актуальность изучения реакции тучных клеток при заживлении кожных ран.

Цель работы – провести анализ морфологической реакции тучных клеток при репаративной регенерации кожных ран под воздействием обогащенной тромбоцитами плазмы крови.

Материалы и методы. Исследования проведены на 196 белых лабораторных крысах-самцах массой $240 \pm 12,5$ г.

Эксперимент включал два блока исследований. Первый блок направлен на изучение оптимизации течения регенерационного процесса в асептических ранах. Второй блок посвящен изучению репаративной регенерации в гнойных ранах. Для моделирования асептической раны под наркозом («Золитил-100» в дозе 8 мг/кг) на выбритом от шерсти участке наружной поверхности средней трети бедра производили линейный разрез кожи, подкожной жировой клетчатки длиной 1,0 см. Рану закрывали давящей марлевой асептической повязкой; лечение начинали сразу после моделирования. Животные были разделены на три группы: контрольную и две опытные. В первой опытной группе проводили гидроимпульсную санацию (ГИС) дефекта тканей 0,9 % раствором хлорида натрия. Во второй опытной группе на ткани наносили обогащенную тромбоцитами плазму крови (ОТПК). Для получения ОТПК из хвостовой вены каждого животного прово-

дили забор 4 мл крови, которую центрифугировали при 6000 оборотов в минуту. В контрольной группе лечение не проводилось.

Для моделирования гнойной раны после линейного разреза кожи и подкожной жировой клетчатки длиной 1,0 см стенки и дно раны раздавливали зажимом Кохера. В рану вносили марлевый тампон со взвесью суточной культуры *Staphylococcus aureus* в дозе 10^{10} в одном мл физиологического раствора, затем на кожу накладывали адаптационные швы шелковой нитью 1,0. Рану закрывали асептической повязкой. Для моделирования гнойных ран во всех случаях применялся один и тот же штамм стафилококка. На третьи сутки развивалась модель острого гнойного воспаления с обильным гнойным отделяемым. Швы снимали, края раны разводили, марлевый тампон удалялся. Выделялось около 3 мл гноя. В результате получалась гнойная рана, используемая в эксперименте. Данный блок исследований включал четыре группы: контрольную и три опытные. Для удаления некротических тканей проводили хирургическую обработку во всех группах. В контрольной группе воздействие заключалось в ежедневной смене асептической повязки. В первой опытной группе на рану воздействовали ГИС. Во второй опытной группе применяли ОТПК. В третьей опытной группе проводили комбинированное воздействие ГИС и ОТПК. Для взятия материала животных выводили из эксперимента на 1, 3, 5 и 7 сутки с целью оценки особенностей репаративной регенерации в различные фазы раневого процесса [5]. Биологический материал забирали таким образом, чтобы захватывалась область раны и неизмененных тканей. Полученный материал фиксировался в 10 % нейтральном формалине с последующим обезвоживанием и заливкой в парафин. Тучные клетки подсчитывали в тканях, окружающих рану, с учетом общего числа и морфофункциональных типов при окраске толуидиновым синим при $pH = 5,6$. Плотность тучных клеток определяли с помощью светового микроскопа при увеличении 40×10 . Подсчет клеток и их типирование проводили в 20 полях зрения с последующим перерасчетом на единицу площади ($S = 0,01 \text{ мм}^2$). Функциональную активность тучных клеток оценивали по индексу дегрануляции (ИД), который представляет собой отношение числа дегранулированных клеток к общему числу анализируемых клеток, выраженное в процентах. Значение ИД в дальнейшем сравнивалось в экспериментальных и контрольных группах.

Одним из параметров, характеризующих восстановление целостности кожного покрова, является скорость заживления кожных ран, как величина, характеризующая изменение площади раны за единицу времени. Для определения скорости заживления производили расчет по формуле $V_s = (S_0 - S_n)/n$, где S_0 – исходная площадь раны; S_n – площадь ран в соответствующий экспериментальный срок; n – изучаемый экспериментальный срок.

Статистическая обработка включала сравнение доли дегранулированных тучных клеток с помощью углового критерия Фишера, полученных средних значений скоростей заживления ран – с помощью непараметрического критерия U -критерий Вилкоксона-Манна-Уитни; различия между группами признавались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для анализа взаимосвязи параметров использовали регрессионный и корреляционный анализы.

Результаты исследования и их обсуждение. При асептическом течении раневого процесса в контрольной группе и под действием ГИС отмечалась сходная

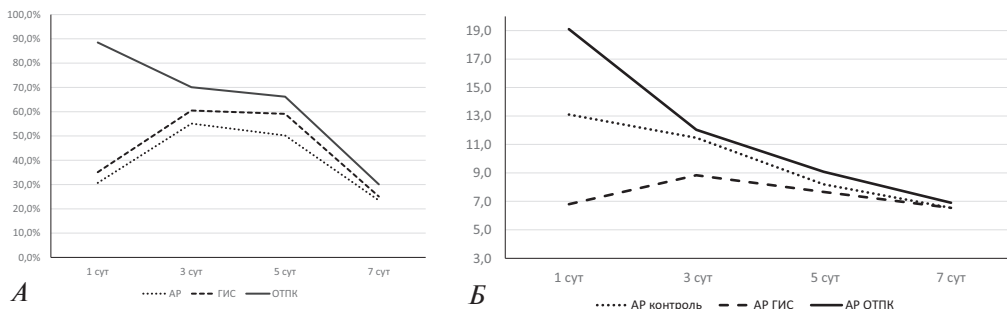


Рис. 1. А – динамика индекса дегрануляции в асептических ранах; Б – скорость регенерации асептических ран в различные сроки исследования по данным планиметрии, кв. мм/сут.

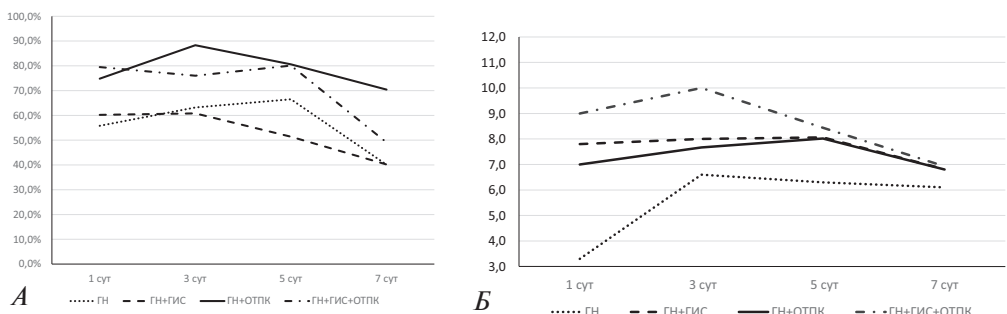


Рис. 2. А – динамика индекса дегрануляции в гнойных ранах; Б – скорость регенерации гнойных ран в различные сроки исследования по данным планиметрии, кв. мм/сут.

реакция – повышение ИД с увеличением сроков регенерационного процесса. Под действием ОТПК наблюдался массивный выброс ТК секретируемых веществ, что сопровождалось значительным повышением ИД на 1-е сутки, к 3-м суткам ИД понижался, данный уровень сохранялся до 5-х суток. В период пролиферативных преобразований (5-е сутки) максимальное значение ИД определялось во второй опытной группе. Дегрануляция ТК обеспечивает поступление продуцируемых этими клетками факторов роста (фибробластический фактор роста, васкулярный эндотелиальный фактор роста), что способствует не только неоангиогенезу, но активации фибробластов и, соответственно, коллагеногенезу [10]. С нарастанием пролиферативных процессов (7-е сутки) уменьшается ИД во всех группах, что косвенно указывает на уменьшение воспалительной реакции (рис. 1А).

Скорость эпителизации имела наибольшее значение в 1-е сутки под действием ОТПК, что свидетельствовало о потенцировании восстановительных процессов данным фактором. В последующие сроки во всех группах отмечались близкие значения скорости сокращения раневого дефекта (рис. 1Б).

Изучение регенерационного процесса в гнойных ранах показало, что селективное и комбинированное воздействие ОТПК вызывало увеличение количества ТК в околограневой зоне и сопровождалось максимальными значениями ИД (рис. 2А).

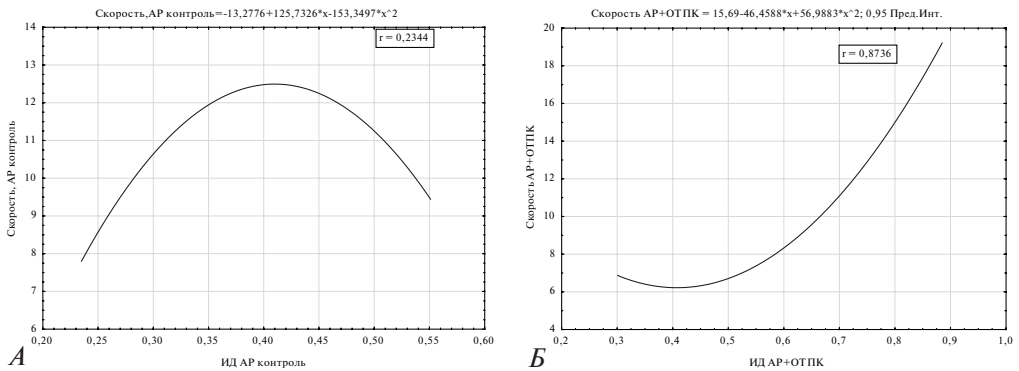


Рис. 3. Результаты регрессионного и корреляционного анализов зависимости скорости регенерации ран от доли дегранулированных клеток при асептическом течении. А – контрольная группа; Б – 2 опытная группа, ОТПК

Под действием ОТПК и ГИС реакция тучноклеточной популяции сохранялась до 5-х суток, а затем ИД начинал снижаться. Улучшение планиметрических показателей в виде увеличения скорости заживления раневого дефекта (рис. 2Б) на фоне значительного повышения ИД при действии ОТПК свидетельствовало о их модулирующем влиянии на репаративный процесс, что можно объяснить купированием нейтрофильной реакции и, как следствие, контролем альтеративных явлений, а также стимуляцией макрофагов с последующим привлечением и активацией фибробластов. Следовательно, ТК оказывали двойное воздействие на течение регенерационного процесса: опосредованное – через нейтрофилы и моноциты и непосредственное – активирующим влиянием секретируемых продуктов на фибробласты [3].

При асептическом течении раневого процесса в контрольной группе отмечался рост скорости заживления раны до определенных значений ИД, а затем рост дегрануляции ТК не приводил к увеличению скорости (рис. 3А). Вероятно, это обусловлено тем, что происходит истощение регенерационных способностей тканей и дальнейшая стимуляция не дает адекватного ответа. Для контрольной группы коэффициент корреляции не имел высоких значений, использование же любого из применяемых методов приводило к росту интенсивности зависимости между долей дегранулированных ТК и скоростью заживления. Использование ОТПК обеспечивало положительную динамику процессов регенерации, выражавшуюся в увеличении скорости заживления раневого дефекта (рис. 3Б).

Проведенный анализ показал наличие высоко достоверных отличий коэффициентов корреляции скорости заживления раны и ИД между контрольной и экспериментальными группами, при этом отличия между экспериментальными группами были статистически недостоверными. Вероятно, это является отражением тесной связи между скоростью репаративных изменений и ИД вне зависимости от метода регионального воздействия. Изучение полученных данных показало, что оптимум ИД при асептическом течении находится в меньших значениях по сравнению с гнойными ранами (рис. 3А, 4А).

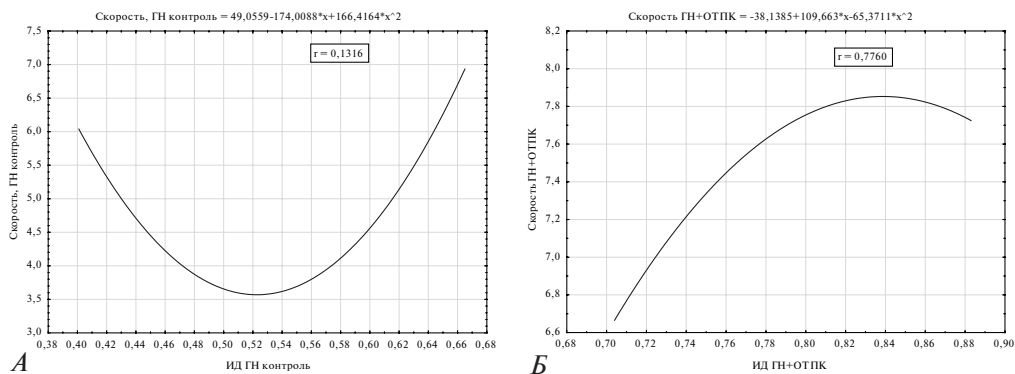


Рис. 4. Результаты регрессионного и корреляционного анализов зависимости скорости регенерации ран от доли дегранулированных клеток при гнойном течении: А – контрольная группа; Б – 3 опытная группа, ГИС+ОТПК

Вне зависимости от вида регионального воздействия в гнойных ранах увеличение ИД приводило к прогрессивному увеличению скорости заживления раны, особенно – при использовании комбинации ОТПК и ГИС (рис. 2Б, 4Б).

Выводы. Сопоставление морфологических изменений в области раны с морфофункциональными характеристиками тучных клеток этой зоны позволяет констатировать, что с первых суток после нанесения раны отмечался процесс дегрануляции тучных клеток. Наибольшая выраженность данной реакции выявлялась в асептических ранах при селективном действии ОТПК, а также при комбинированном воздействии ГИС и ОТПК на гнойное течение раневого процесса. Применение метода ГИС, отличающегося высокой очищающей способностью, при асептическом течении раневого процесса, характеризующегося минимальным некротическим компонентом, нецелесообразно из-за повышенной травматизации тканей. В гнойных ранах применение ГИС позволяло купировать интенсивную воспалительную реакцию и создать условия для пролиферативных процессов. ОТПК играло роль каркаса, обеспечивающего регенерацию и создающего условия для раскрытия репаративных способностей тканей. В ответ на применение ОТПК происходила активация процесса дегрануляции тучных клеток. При заживлении кожных ран процесс дегрануляции тучных клеток и изменение численности данной популяции следует рассматривать как составную часть компенсаторно-приспособительной реакции на повреждение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабушкина И. В. Влияние наночастиц металлов на регенерацию экспериментальных ран // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2013. Т. VI. № 2 (19). С. 217–221.
2. Данилов Р. К. Раневой процесс: гистогенетические основы. СПб.: ВМедА, 2008.
3. Клименко Н. А., Татарко С. В. Роль тучных клеток в репаративных явлениях при воспалении // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1995. № 3. С. 262–265.

4. Клочков Н. Д. Гистион как элементарная морфофункциональная единица // Морфология. 1997. Т. 112. № 5. С. 87–88.
5. Кузин М. И., Костюченко Б. М. Раны и раневая инфекция. М.: Медицина, 1990.
6. Нузов Б. Г., Стадников А. А., Нузова О. Б. Оптимизация репаративной регенерации тканей. М.: Медицина, 2012.
7. Одинцова И. А. Закономерности процессов регенерационного гистогенеза в кожно-мышечной ране // Анатомия и военная медицина: материалы науч. конф. СПб. : ВМедА, 2003. С. 41–43.
8. Жукова О. В. и др. Патогенез и гистоморфологические особенности рубцовых изменений кожи // Клиническая дерматология и венерология. 2009. Т. 3. № 4. С. 4–9.
9. Алипов В. В. и др. Экспериментальное обоснование сочетанного применения наночастиц меди и низкоинтенсивного лазерного облучения при хирургическом лечении инфицированных ожоговых ран кожи // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2013. Т. VI, № 4 (21). С. 411–417.
10. Somasundaram P. et al. Mast cell tryptase may modulate endothelial cell phenotype in healing myocardial infarcts // J. Pathol. 2005. Vol. 205(1). P. 102–111.

Антоненкова Е. В., Ерофеев А. И., Коваль А. А.

ЗАЩИТНЫЕ РЕАКЦИИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ОСТРОЙ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

*Кафедра нормальной физиологии (заведующий – член-корр. РАН, проф. В. О. Самойлов)
Военно-Медицинской академии им. С. М. Кирова,
Санкт-Петербург, e-mail: evavta@mail.ru*

При гипоксии происходит изменение функционирования ряда органов и систем организма, в том числе системы иммунитета [5]. Важную роль в определении вектора развития адаптивного иммунного ответа при недостатке кислорода играют эффекторные клетки. Среди эффекторных клеток особое место принадлежит макрофагам, обеспечивающим реализацию реакций неспецифической и специфической резистентности. Эти клетки в силу своих физиологических особенностей и органной принадлежности сталкиваются с условиями гипоксии наиболее часто и, соответственно, обладают механизмами коррекции своих функций и адаптации. Одним из критериев, отражающих изменение реактивности макрофагов под действием экстремальных факторов, является оценка динамики кислород-зависимых процессов и генерации активных форм кислорода (АФК) [2]. АФК, включая супероксидный радикал, относятся к продуктам нормального клеточного метаболизма, но ослабление или чрезмерное усиление их синтеза, особенно при недостаточности систем антиоксидантной защиты, чреваты неблагоприятными последствиями для организма, включая нарушения иммунитета [1].

Целью исследования явилось изучение влияния острой нормобарической гипоксической гипоксии на интенсивность клеточного дыхания и уровень