

### СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЛИФЕРАЦИИ ФИБРОБЛАСТОВ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В РЕГЕНЕРАЦИОННОМ ГИСТОГЕНЕЗЕ ПОСЛЕ ОГНЕСТРЕЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

В. В. Бирина<sup>1</sup>, И. А. Одинцова<sup>1</sup>, С. Э. Русакова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, г. Санкт-Петербург, Россия

### COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF PROLIFERATION OF FIBROBLASTS AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF MAST CELLS IN REGENERATION HISTOGENESIS AFTER A GUNSHOT WOUND

V. V. Birina<sup>1</sup>, I. A. Odintsova<sup>1</sup>, S. E. Rusakova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>S. M. Kirov Military Medical Academy of the Russian Defense Ministry, Saint Petersburg, Russia

#### Резюме

**Цель.** Дать сравнительную характеристику функциональной активности тучных клеток и пролиферации фибробластов на различных сроках заживления огнестрельной раны кожи.

**Материалы и методы.** Исследовали гистологические препараты, полученные после нанесения огнестрельного повреждения в складку кожи спины крыс выстрелом в упор из пистолета Марголина пулей калибра 5,6 мм. Взятие материала осуществляли через 6 и 24 ч, 3, 6, 15 и 25 сут от начала опыта (по 3 животных на каждый срок). Контрольная группа (без ранения) — 3 животных. Методы исследования — световая микроскопия, метод гистоавтордиографии, количественный анализ и статистическая обработка данных. Исследовались тучные клетки и пролиферирующие клетки фибробластического дифферона в перинекротической области с учетом гистотопографии.

**Результаты.** Срочной реакцией на травму является активная дегрануляция тучных клеток, регистрируемая через 6 ч после повреждения. Впервые пролиферирующие клетки фибробластического дифферона наблюдаются в глубоких слоях кожи на вторые сутки. Регенерационный гистогенез соединительной ткани и формирование грануляционной ткани протекает с 3 по 15 сут из камбиальных источников соединительнотканного футляра кожной мышцы. Дегрануляция тучных клеток отмечается в течение всех сроков наблюдения. К 25-м сут наибольшее количество тучных клеток и фибробластов, включающих H<sup>3</sup>-тимидин, регистрировалось в рыхлой соединительной ткани субэпителиально.

**Заключение.** Количественная, топографическая, временная характеристики изменения популяции и локализации тучных клеток в сравнительном аспекте с такими же критериями по отношению к пролиферирующим клеткам фибробластического дифферона показывают участие биологически активных веществ тучных клеток в привлечении предшественников фибробластов к раневому ложу и регуляции их пролиферации в течение раневого гистогенеза (4 рис., библи.: 5 ист.).

**Ключевые слова:** заживление огнестрельной раны кожи, пролиферация, соединительная ткань, тучные клетки, фибробластический дифферон.

Статья поступила в редакцию 13.03.2020 г.

#### Summary

**Objective.** To give a comparative description of the functional activity of mast cells and the proliferation of fibroblasts in regenerative histogenesis after gunshot damage.

**Materials and methods.** The material for the study was histological preparations, obtained after a gunshot wound in the fold of the rat's back skin with a shot at the stop from the Margolin pistol with a 5.6 mm bullet. Taking the material was carried out 6, 24 hours, 3, 6, 15 and 25 days from the beginning of the experience (3 animals for each term). Control group (without injury) — 3 animals. Methods of research — light microscopy, histoautoradiography method, quantitative analysis and statistical processing of data. Fat cells and proliferating cells of the fibroblast differon in the perinecrotic region were studied, taking into account histotopography.

**Results of the study.** An immediate response to injury is active degranulation of mast cells (MC), recorded 6 hours after the damage. For the first time, proliferating cells of fibroblastic differential are observed in the deeper layers of the skin on the second day. Regenerative histogenesis of connective tissue and the formation of granulation tissue occurs from 3 to 15 days from cambial sources of the connective tissue "case" of the skin muscle. MC degranulation is observed throughout the observation period. By day 25, the largest number of MC and fibroblasts, including H<sup>3</sup>-thymidine, was recorded in subepithelial loose connective tissue.

**Conclusion.** Quantitative, topographical, temporal characteristic of population change and localization of MC in comparative aspect with the same criteria in relation to proliferating cells of fibroblast differon shows the participation of biologically active substances in attracting the precursors of fibroblasts to the wound surface and regulating their proliferation during the wound histogenesis (4 figs, bibliography: 5 refs).

**Key words:** healing of a gunshot wound to the skin, proliferation, connective tissue, mast cells, fibroblastic differon.

Article received 13.03.2020.

## ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия отмечается рост техногенных катастроф и числа локальных военных конфликтов, подтвержденных официальной статистикой ООН [1]. Используемые в современном стрелковом оружии пули калибра 5,45 (5,6) мм из-за присущей им неустойчивости полета характеризуются усложненной раневой баллистикой, определяющей особенности траектории движения ранящего снаряда в тканях. Прямое действие ранящего снаряда приводит к образованию зоны мгновенной гибели клеток и тканей (раневого канала), в результате бокового удара формируется зона молекулярного сотрясения, называемая перинекротической областью [2]. Кожа — орган, занимающий пограничное положение, всегда первым подвергается воздействию ранящего снаряда (пули, осколки) при повреждении.

Интактная кожа спины крыс имеет толщину 1,2–1,4 мм, и покрыта тонким эпидермисом, состоящим из базального, промежуточного и поверхностного слоев. Под эпидермисом располагается рыхлая соединительная ткань толщиной 25 мкм. Основная часть дермы представлена сетчатым слоем, образованным плотной неоформленной соединительной тканью, имеющей протяженность до 500–550 мкм от базальной пластинки эпидермиса. Затем располагается слой рыхлой соединительной ткани толщиной около 200 мкм, под которым в соединительнотканном футляре находится кожная мышца, образованная поперечно-полосатой мышечной тканью, вокруг которой располагаются мелкие и крупные кровеносные сосуды. Толщина данного слоя составляет 190–220 мкм, толщина гиподермы — 110–150 мкм. В сетчатом слое дермы находятся волосные луковицы и сальные железы. К основанию луковицы прикрепляется мышца, поднимающая волос, образованная гладкой мышечной тканью. Ведущим клеточным дифферон дермы является дифферон фибробластов, клетки которого в основном локализируются в субэпидермальной части, около волосных луковиц, в наружной оболочке сосудов и в рыхлой соединительной ткани, образующей футляр вокруг кожной мышцы. Здесь встречаются малодифференцированные и юные фибробласты с крупными светлыми ядрами и большими ядрышками, много адипоцитов. Среди клеток фибробластического ряда большую часть составляют зрелые фибробласты веретеновидной формы с интенсивно окрашивающимися ядрами, что указывает на преобладание в них гетерохроматина.

Образование регенерата обусловлено комплексным взаимодействием клеток — участников посттравматической регенерации. Результатом

репаративного гистогенеза является формирование грануляционной ткани, трансформирующейся в адаптационном периоде в рубец. В соответствии с концепцией клеточно-дифферонной организации тканей и определением понятия «ткань» [2] решающим фактором в закрытии дефекта кожи является синтетическая активность фибробластов, образующих волокнистый компонент межклеточного вещества. Соединительные ткани кожи являются полидифферонными тканями. Ведущий клеточный дифферон — фибробластический. Рекрутирование молодых фибробластов и их предшественников к области раневого канала происходит в результате слаженной интегративной деятельности всех клеток — участниц заживления, в том числе и тучных клеток (ТК). Исследования последних десятилетий показали, что функциональный спектр участия ТК в обеспечении постоянства гомеостаза в соединительных тканях гораздо шире, чем это представлялось ранее. ТК известны как клетки, напрямую связанные с реакциями аллергического типа. В современной литературе имеются сведения об участии ТК в регенерационном гистогенезе рыхлой соединительной ткани, ангиогенезе, а также описывается их способность формировать внеклеточные ловушки, подобные нейтрофильным внеклеточным ловушкам, обеспечивая таким образом, особый способ иммунной защиты организма [3, 4]. Однако в доступных литературных источниках мало данных об участии ТК в регенерационном гистогенезе после огнестрельного повреждения.

## ЦЕЛЬ

Дать сравнительную характеристику функциональной активности ТК и пролиферации фибробластов в различные сроки заживления огнестрельной раны кожи.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве экспериментальных животных были выбраны беспородные крысы-самцы (массой 150–200 г; 21 животное), которым под эфирным ингаляционным наркозом в складку предварительно выбритой кожи спины каудальнее межлопаточной области из пистолета Марголина пулей калибра 5,6 мм в упор через 15–20 слоев марли наносили огнестрельное повреждение.

Взятие гистологического материала осуществляли через 6, 24 ч; 3, 6, 15 и 25 сут от начала опыта

(по 3 животных на каждый срок). Контрольная группа (интактная кожа) — 3 животных.

При работе с животными руководствовались требованиями «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985), Хельсинской декларации «О гуманном отношении к животным» (2000).

Методы исследования — световая микроскопия, метод гистоавторадиографии, количественный анализ и статистическая обработка данных.

Для выявления ДНК-синтезирующих клеток (за 2 ч до забоя) животным внутривенно вводили  $H^3$ -тимидин в дозе 2 мКи/г массы.

Для световой микроскопии кусочки кожи размером 0,5–1 см фиксировали в смеси Бродского: формалин (100%) — спирт (96%) — ледяная уксусная кислота в соотношении 3 : 1 : 0,3 в течение 12–18 ч при 4 °С. Заливку материала осуществляли в парафин по стандартной методике. Срезы изготавливали на ротарном микротоме толщиной 6–7 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином, а также толуидиновым синим.

Количественную оценку внутридифференциальной гетероморфии популяции ТК производили на срезах, окрашенных толуидиновым синим. Выделяли недегранулированные и дегранулированные ТК. Среди последних выделяли клетки с разной степенью дегрануляции. Клетки, в которых цитоплазма плотно заполнена метахроматическими гранулами, считали недегранулированными. Дегранулированными клетками считали клетки, цитоплазма которых наполовину заполнена гранулами, и в которых дегрануляция идет путем экзоцитоза (т. е. в непосредственной близости от клетки находятся метахроматические гранулы). Дифференцирующимися клетками считали клетки в состоянии накопления гранул. Морфологически в такой клетке цитоплазма наполовину заполнена гранулами, а в экстрацеллюлярном матриксе метахроматических гранул нет.

Для гистоавторадиографии препараты освобождали от парафина, высушивали и покрывали фотоэмульсией типа ПР-2 путем погружения. Препараты высушивали в течение 30–40 мин с помощью вентилятора, укладывали в светонепроницаемый ящик с силикагелем, который помещали в холодильник (4 °С). Проявление автографов производили через 4 нед, затем срезы промывали в дистиллированной воде и фиксировали в 30%-ном растворе гипосульфита (не более 6 мин). Индекс меченых ядер (ИМЯ) определяли на 1000 клеток исследуемой зоны кожи крыс. Подсчет ИМЯ проводили с учетом гистотопографии кожи (от базальной пластинки эпидермиса до глубоких слоев).

Подсчет клеток производился с использованием микроскопа фирмы Carl ZEISS Primo Star (объектив 40, окуляр 10). 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. ТК считали в 10 полях зрения микроскопа с учетом гистотопографии кожи на разных сроках после нанесения огнестрельного повреждения.

Цифровой материал обрабатывали статистическими методами с вычислением среднего значения, стандартного отклонения, ошибки средней арифметической. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента при  $P < 0,05$ . Графики и гистограммы на основе количественной оценки популяции ТК строили с использованием Microsoft Office Excel 2007.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

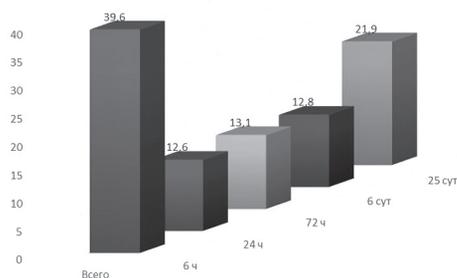
В интактной коже из числа подсчитанных преобладали дифференцирующиеся ТК, локализующиеся преимущественно рядом с кровеносными сосудами.

После травмы в коже происходит гибель тканевых элементов. Массовая дегрануляция ТК приводит к увеличению проницаемости сосудов микроциркуляторного русла и миграции гранулоцитов в окружающую соединительную ткань.

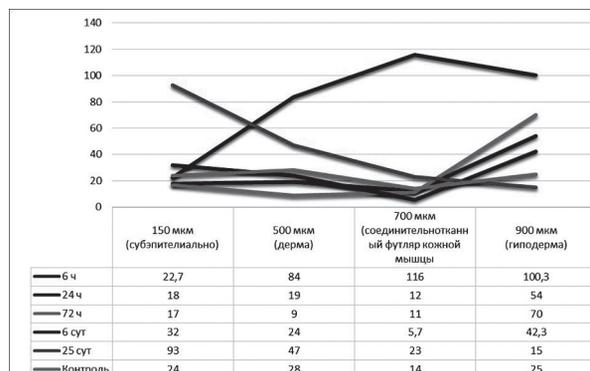
Количественный анализ ТК показал, что максимальное их число среди всех подсчитанных клеток регистрируется на 6 ч после ранения в глубоких слоях кожи, затем происходит их снижение в 3 раза (рис. 1). Через 24, 72 ч и 6 сут после повреждения ТК относительно равномерно распределяются во всех слоях кожи с незначительным увеличением их количества в гиподерме. К 25-м сут наблюдается увеличение количества ТК, сосредоточенных в субэпителиальном слое (рис. 2).

Срочная реакция ТК на травму состоит в их массовой дегрануляции, в которую первоначально вовлекаются клетки соединительнотканного футляра кожной мышцы и гиподермы (рис. 3). Через 6 ч после повреждения количество дегранулированных ТК составляет 35,4% от общего числа их на данный срок.

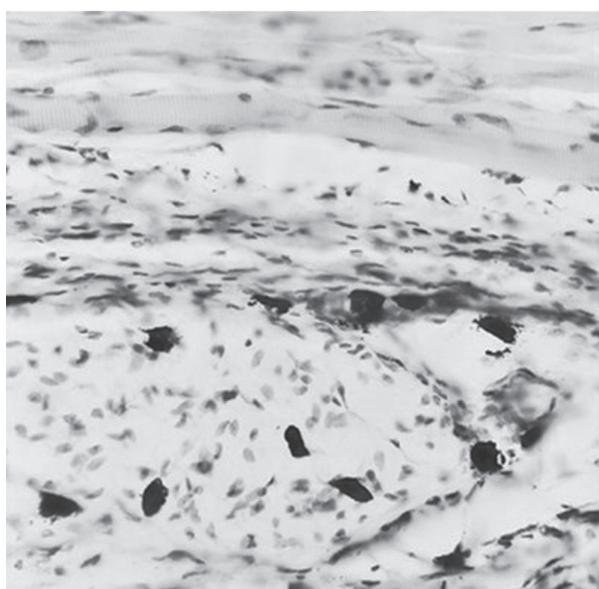
Через 24 ч формируется демаркационная линия — лейкоцитарный вал, отделяющий зону некроза от перинекротической области. Большинство ТК наблюдается в глубоких слоях кожи, преимущественно около кровеносных сосудов. Среди популяции ТК преобладают дегранулированные формы



**Рис. 1.** Сравнительная характеристика дифферона ТК на разных сроках заживления огнестрельной раны (%)



**Рис. 2.** Изменение количества тучных клеток с учетом гистотопографии кожи и сроков заживления огнестрельной раны



**Рис. 3.** ТК в глубоких слоях кожи. 6 ч после повреждения. Окраска — толуидиновый синий. Ув. ×400

и свободно лежащие метакроматичные гранулы в экстрацеллюлярном матриксе.

Через 72 ч после повреждения наибольшее количество ТК также наблюдается в глубоких слоях кожи. Количество дегранулированных ТК уменьшается, и вместе с тем уменьшается и количество свободнолежащих метакроматичных гранул в экстрацеллюлярном матриксе.

К 6-м сут наблюдается формирование грануляционной ткани со дна раны (из глубоких слоев кожи перинекротической области), отмечается количество дегранулированных клеток как субэпителиально, так и в глубоких слоях кожи. Количество дегранулированных клеток и свободнолежащих метакроматичных гранул в экстрацеллюлярном матриксе возрастает.

К 25-м сут в популяции ТК преобладают дегранулированные формы, однако они локализуются



**Рис. 4.** ТК в субэпителиальном слое. 25 сут после повреждения. Окраска — толуидиновый синий. Ув. ×400

субэпителиально (рис. 4). Дифференцирующиеся ТК, находящиеся в состоянии накопления гранул, составляют 6% от общего их числа.

Результаты гистоавторадиографии показали, что через 6 ч после повреждения единичные пролиферирующие клетки наблюдаются только в области соединительнотканного футляра кожной мышцы. Через 24 ч ИМЯ выше всего в глубоких слоях соединительной ткани, над кожной мышцей и в гиподерме. На 3-и сут ИМЯ максимален в соединительнотканном футляре кожной мышцы. К 6-м сут пролиферация протекает относительно равномерно во всех слоях кожи, но ее максимум регистрируется в глубоких слоях, и к 25-м сут наибольший ИМЯ клеток фибробластического дифферона регистрируется субэпителиально. Меченый тимидин включают как малодифференцированные камбиальные клетки в составе сосудов микроциркуляторного

русла (периваскулярные), так и молодые свободно-лежащие фибробласты.

Сравнительный анализ динамики изменения популяции ТК и пролиферации камбиальных элементов фибробластического дифферона (как по срокам заживления, так и по их гистотопографии) показал, что впервые пролиферирующие клетки регистрируются через 24 ч в глубоких слоях кожи, что совпадает с максимальной концентрацией ТК в состоянии дегрануляции. В динамике заживления раны с 24 ч до 25 сут топография клеток фибробластического дифферона, находящихся в S-периоде клеточного цикла, меняется. Из глубоких слоев кожи вновь образующаяся молодая соединительная ткань заполняет раневой канал, и к 6-м сут максимум пролиферирующих клеток регистрируется в глубоких слоях кожи. К 25-м сут пролиферирующие фибробласты сохраняются в поверхностных слоях кожи так же, как и популяция ТК.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гистологический анализ внутридифферонной гетероморфии ТК и пролиферации клеток фибробластического дифферона с позиций основных закономерностей гистогенеза является достаточно информативным для оценки процесса заживления огнестрельной раны.

Данное исследование является продолжением развития учения о тканях в той его части, которая касается детального изучения внутри- и междифферонного взаимодействия тканей перинекротической области кожи и грануляционной ткани, в норме отсутствующей у человека. Грануляционная ткань является временной тканью, формирующейся во время заживления и быстро заполняющей собой раневой дефект.

Количественная, топографическая, временная характеристики изменения популяции и локализации ТК в сравнительном аспекте с такими же критериями по отношению к пролиферирующим клеткам

фибробластического дифферона показывают участие биологически активных веществ ТК в привлечении предшественников фибробластов к раневому ложу и регуляции их пролиферации в течение раневого гистогенеза.

Необходимо использовать целый спектр новых современных методов экспериментальной гистологии, учитывать теоретические положения о камбиальных свойствах тканей, детерминации, дифференцировки, интеграции и адаптации тканевых элементов в поиске механизмов оптимизации и управления регенерационным гистогенезом.

Изучение регенерационных свойств тканей следует проводить с учетом их клеточно-дифферонного состава, меж- и внутридифферонной гетероморфии и междифферонного взаимодействия.

Учение о клеточно-дифферонной организации тканей с различными камбиальными свойствами может служить поиску и выбору оптимальных методов фармакологической коррекции и аппаратного воздействия на восстановительные процессы.

Концепция клеточно-дифферонной организации тканей позволяет объективно оценивать пролиферацию, дифференцировку, внутри- и междифферонную гетероморфию клеток в условиях регенерационного гистогенеза. На ранних сроках заживления массовая дегрануляция ТК приводит к увеличению проницаемости сосудов микроциркуляторного русла, происходит миграция в перинекротическую область раны клеток крови и соединительной ткани, формирующих гистион воспаления, что является триггером для активации камбиальных клеток фибробластического дифферона. Внутридифферонная гетероморфия ТК и пролиферативная активность камбиальных элементов фибробластического дифферона характеризуются гетерохронией, гетероморфией и гетерокинезом. Изменения внутридифферонной гетероморфии и гистотопографии ТК могут служить одним из критериев течения регенерационного гистогенеза [5].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Trishkin D. V., Kryukov E. V., Chuprina A. V., Khominets V. V., Brizhan' L. K., Davydov D. V., Kolobaeva E. G., Grechukhin D. A.* Evolution of the concept of rendering medical care for the wounded and injured with injuries of the musculoskeletal system. *Military Medical Journal*. 2020; 341 (2): 4–11. Russian (Тришкин Д. В., Крюков Е. В., Чуприна А. В., Хоминец В. В., Брижань Л. К., Давыдов Д. В., Колобаева Е. Г., Гречухин Д. А. Эволюция концепции оказания медицинской помощи раненым и пострадавшим с повреждениями опорно-двигательного аппарата. *Военно-медицинский журнал*. 2020; 341 (2): 4–11).
2. *Danilov R. K.* The wound process: histogenetic basis. Saint Petersburg: VMedA Publisher; 2007. 380. Russian (Данилов Р. К. Раневой процесс: гистогенетические основы. СПб.: ВМедА; 2007. 380).
3. *Silva E. Z. M., Jamur M. C., Oliver C.* Mast cell function: a new vision of an old cell. *J. Histochem. Cytochem.* 2014; 62 (10): 698–738.
4. *Möllerherm H., von Köckritz-Blickwede M., Branitzki-Heinemann K.* Antimicrobial Activity of Mast Cells: Role and Relevance of Extracellular DNA Traps. *Front. Immunol.* 2016; 7: 265.
5. *Danilov R. K., Odintsova I. A.* Histogenetic analysis as the basis for understanding the mechanisms of reactivity, regeneration and pathology of organs and systems. In: Questions of morphology of the 21<sup>st</sup> century. Issue 5. Collection of works. *Odintsova I. A., Kostyukevich S. V., ed.* Histogenesis, reactivity and tissue regeneration. Saint Petersburg: DEAN Publishing House; 2018: 37–9. Russian (Данилов Р. К., Одинцова И. А. Гистогенетический анализ как основа для понимания механизмов реактивности, регенерации и патологии органов и систем. В кн.: Вопросы морфологии XXI века. Выпуск 5. Сборник трудов. *Одинцова И. А., Костюкевич С. В., ред.* Гистогенез, реактивность и регенерация тканей. СПб.: ДЕАН; 2018: 37–9).

УВЕДОМЛЕНИЕ

Авторы внесли равный вклад в данную работу и сообщают об отсутствии какого-либо конфликта интересов.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Бирин Виктор Вячеславовна** — ефрейтор, курсант 6-го курса II факультета (подготовки врачей для Ракетных, Сухопутных и Воздушно-десантных войск), ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, 194044, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6, конт. тел.: +7(911)7661951, e-mail: vacheka@mail.ru

**Одинцова Ирина Алексеевна** — докт. мед. наук, профессор, заведующая кафедрой гистологии с курсом эмбриологии, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, 194044, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6, конт. тел.: +7(921)4039334, e-mail: Odintsova-irina@mail.ru

**Русакова Светлана Эдуардовна** — канд. биол. наук, доцент, доцент кафедры гистологии с курсом эмбриологии, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ, 194044, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6, конт. тел.: +7(905)2324578, e-mail: rusakova-svetik@mail.ru

ACKNOWLEDGMENT

Authors contributed equally into this work and declare no conflict of interest.

INFORMATION ABOUT AUTHORS

**Birina Victoria V.** — Corporal, 6<sup>th</sup> year student of the II faculty (training of doctors for the Missile, Ground and Airborne Forces), S. M. Kirov Military Medical Academy of the Russian Defense Ministry, bld. 6, Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, Russia, 194044, cont. phone: +7(911)7661951, e-mail: vacheka@mail.ru

**Odintsova Irina A.** — M. D., D. Sc. (Medicine), Professor, the Head of the Histology with a course of embryology Department, S. M. Kirov Military Medical Academy of the Russian Defense Ministry, bld. 6, Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, Russia, 194044, cont. phone: +7(921)4039334, e-mail: Odintsova-irina@mail.ru

**Rusakova Svetlana E.** — M. D., Ph. D. (Medicine), Associate Professor, Associate Professor of the Histology with a course of embryology Department, S. M. Kirov Military Medical Academy of the Russian Defense Ministry, bld. 6, Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, Russia, 194044, cont. phone: +7(905)2324578, e-mail: rusakova-svetik@mail.ru