

УДК 616.5-001.4—021.4-003.9.02:615.31:547.962.9

Ключевые слова: *заживление ран; соединительная ткань; коллаген; сосуды; морфометрия*

Г. Н. Берченко, В. В. Берченко

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА И ВАСКУЛЯРИЗАЦИИ АСЕПТИЧЕСКИХ РАН КОЖИ КРЫС, ЗАЖИВАЮЩИХ БЕЗ ЛЕЧЕНИЯ И ПРИ СТИМУЛЯЦИИ РЕПАРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ ЭКЗОГЕННЫМ КОЛЛАГЕНОМ

ЦНИЛ (зав проф. А. В. Николаев) I ММ И им. И. М Сеченова, Москва

Представлена акад. АМН СССР А. И. Струковым

Гистохимические и электронно-микроскопические исследования, проведенные на экспериментальном и клиническом материале, свидетельствуют о положительном влиянии коллагеновых препаратов на заживление ран различной этиологии [2, 3]. Однако количественные морфологические исследования, отличающиеся переходом с описательного уровня на уровень объективной математической оценки изучаемых явлений [1,7], ранее не проводились.

Целью настоящей работы являлось сравнительное изучение динамики количественных изменений клеточного состава и васкуляризации асептических ран кожи крыс, заживающих без лечения и при стимуляции репаративных процессов коллагеновым порошком.

Методика исследования. Опыты проведены на 40 крысах-самцах линии Вистар. В полнослойные раны кожи на спине площадью 3

см² с целью исключения влияния контракции и высыхания раны вставляли тefлоновое кольцо, закрывающееся сверху перфорированным целлофаном. У животных контрольной группы раны заживали без применения препаратов. Крысам 2-й группы на раневую поверхность наносили 20 мг коллагенового порошка, полученного из раствора щелочнорастворенного коллагена. Животных под эфирным наркозом забивали на 3, 5, 7 и 10-е сутки после операции (по 5 животных на срок в каждой группе). Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону, толуидиновым синим, ставили реакцию Браше и ШИК-реакцию. Для исследований использовали окулярную сетку С. Б. Стефанова, содержащую 10 квадратов со стороной квадрата 1 мм. В 30 случайно выбранных полях зрения микроскопа при увеличении 600 подсчитывали

Абсолютное и относительное количество клеточных элементов и сосудов ГТ в стандартном по площади поле зрения микроскопа

Тип клеток и сос.удов	Срок после нанесения раны, сут							
	3		5		7		10	
	1-я группа	2-я группа	1-я группа	2-я группа	1-я группа	2-я группа	1-я группа	2-я группа
НЛ								
абс.	43,22 ± 1,56	14,08±0,50	16,62 ±0,40	9,73±0,24	11,96±0,27	7,63±0,30	7,56±0,30	6,63±0,25
%	60,26	18,20	19,11	11,91	16,72	9,86	12,33	9,95
p	—	<0,001	—	<0,001	—	<0,001	—	<0,02
Мф								
абс.	13,41-0,48	21,88 ±0,64	23,21 ±0,32	12,99±0,24	10,15±0,27	7,40±0,30	6,46±0,50	9,87±0,40
%	18,69	28,27	26,69	15,05	14,20	9,56	10,54	14,81
p	—	<0,001	—	<0,001	—	<0,001	—	<0,001
Фб								
абс.	13,09±0,36	36,21 ±0,76	42,71±0,44	53,83±0,30	44,00 ±0,45	54,87 ±0,95	42,03 ±0,78	45,30 ±0,65
%	18,25	46,79	49,12	65,95	61,55	70,91	68,36	68,01
p	—	<0,001	—	<0,001	—	<0,001	—	<0,001
Эц								
абс.	1,21 ±0,28	3,83±0,53	3,78±0,42	5,08±0,30	4,60±0,48	6,66±0,80	4,42 ±0,85	4,20 ±0,33
%	1,69	4,95	4,35	6,22	6,44	8,61	7,21	6,30
p	—	<0,001	—	<0,02	—	<0,05	—	>0,05
Снв								
абс.	0,59-0,16	1,53±0,35	0,90±0,16	0,94 ±0,12	0,30±0,04	0,37±0,20	0,37±0,25	0,13±0,05
%	90,77	75,37	56,60	47,47	17,05	17,62	25,17	13
p	—	<0,02	—	>0,05	—	>0,05	—	>0,05
Св								
абс.	0,06±0,04	0,50±0,10	0,09±0,12	1,04 ±0,12	1,46±0,12	1,73±0,30	1,10±0,25	0,87 ±0,15
%	9,23	24,63	43,40	52,53	82,95	82,38	74,83	87
p	—	<0,001	—	<0,05	—	>0,05	—	>0,05
Сс								
абс.	0,65±0,16	2,03±0,35	1,59±0,20	1,98±0,12	1,76±0,08	2,10±0,20	1,47±0,3	1,00 ±0,10
%	100	100	100	100	100	100	100	100
p	—	<0,001	—	>0,05	—	>0,05	—	>0,05

Примечание: p — по отношению к 1-й группе животных.

нейтрофильные лейкоциты (НЛ), макрофаги (Мф), фибробласты (Фб), эндотелиоциты (Эц), другие клетки тканей и сосуды, попавшие на сетку. Подсчитывали сосуды, не имеющие вертикальной ориентации ($C_{\text{нв}}$), вертикальные сосуды ($C_{\text{в}}$) и суммарное число сосудов ($C_{\text{с}}$). Вычисляли средние значения, а также процентное соотношение клеток и сосудов. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью критерия Стьюдента. Данные количественного исследования клеточного состава и васкуляризации грануляционной ткани (ГТ), рассчитанные на стандартную единицу площади измерительной сетки, представлены в таблице.

Результаты исследования. У животных 1-й группы в стадии воспаления на 3-и сутки основными клеточными элементами в абсолютных и относительных величинах являются НЛ, среди сосудов преобладают $C_{\text{нв}}$. Между 3-ми и 5-ми сутками происходит наиболее интенсивное увеличение числа Мф, Эц и Фб. Так, абсолютное число Фб к 5-м суткам по сравнению с 3-ми сутками увеличивается в 3,26 раза, число Эц — в 3,12 раза. Количество Мф увеличивается более умеренно (в 1,76 раза) и достигает своего максимума и наибольшего удельного веса. В этот же период абсолютное количество $C_{\text{с}}$ возрастает в 2,44 раза, $C_{\text{в}}$ — в 11,5 раза. К 7-м суткам количество НЛ и Мф уменьшается, в то же время максимальных величин достигают число Эц, Фб и $C_{\text{с}}$, а также абсолютные и относительные значения $C_{\text{в}}$. В стадию фиброзной перестройки ГТ и начала формирования рубца (10-е сутки) происходит некоторое уменьшение абсолютного числа (при продолжающемся увеличении относительного количества) Эц и Фб, уменьшается также число $C_{\text{в}}$ и $C_{\text{с}}$.

У животных 2-й группы под влиянием коллагенового порошка абсолютные и особенно относительные значения количества клеточных элементов в ранах на 3-и и 5-е сутки почти идентичны таковым на 5-е и 7-е сутки у животных 1-й группы. Уже к 3-м суткам резко уменьшается абсолютное число НЛ (в 3,06 раза), в то время как количество и удельный вес Мф достигают максимальных величин. Особенно резко увеличивается на 3-й сутки абсолютное число Эц (в 3,16 раза) и Фб (в 2,76 раза). Наибольший удельный вес Эц и Фб в отличие от контроля отмечается к 7-м суткам. Возрастает число сосудистых элементов, особенно в период формирования ГТ. Так, абсолютное число $C_{\text{с}}$ к 3-м суткам увеличивается в 3,12 раза, а число $C_{\text{в}}$ — в 8,33 раза. Максимальное число $C_{\text{в}}$, так же как и в контроле, обнаруживается к 7-м суткам, однако эта величина очень близка к показателям на 3-и и 5-е сутки. К 10-м суткам абсолютное число $C_{\text{нв}}$, $C_{\text{в}}$ и $C_{\text{с}}$, а также количество Эц по сравнению с таковыми у животных 1-й группы

уменьшается.

Таким образом, при заживлении асептических ран у крыс 1-й группы на стадии воспаления (3-и сутки) преобладающими клеточными элементами являются НЛ, очищающие рану от микробов, инородных тел и продуктов распада тканей. Резкое возрастание между 3-ми и 5-ми сутками числа Эц, $C_{\text{с}}$ и $C_{\text{в}}$ свидетельствует о том, что именно в этот период в асептических ранах происходит наиболее интенсивное образование сосудистых элементов.

Максимальная васкуляризация ГТ определяется к 7-м суткам, так как к этому сроку достигают максимального значения число Эц и абсолютные величины $C_{\text{в}}$, характерных для ГТ.

Наиболее активная пролиферация Эц совпадает по времени с наибольшим увеличением содержания в ранах Мф — клеток, играющих ключевую роль в реализации функций специфического и неспецифического иммунитета, воспаления и процессов репарации [2, 6, 8, 11, 14]. В период формирования ГТ они не только осуществляют фагоцитоз тканевого детрита (разрушенные НЛ, фибрин и др.), но и выделяют различные биологически активные вещества, регулирующие межклеточные и клеточно-тканевые взаимодействия. Учитывая сведения о способности Мф выделять индукторы ангиогенеза, стимулирующие пролиферацию Эц [13], можно предположить, что на 3—5-е сутки после травмы Мф, мигрирующие в зону воспаления на смену НЛ, выделяют монокины, стимулирующие пролиферацию Эц и рост сосудов. Кроме того, Мф секретируют фибронектин, усиливающий хемотаксис Фб, а также монокины, стимулирующие пролиферацию Фб [12], что объясняет одну из причин наиболее интенсивного увеличения числа Фб между 3-ми и 5-ми сутками.

Некоторое уменьшение абсолютного числа (при продолжающемся увеличении относительного количества) Эц и Фб к 10-м суткам объясняется фиброзной перестройкой ГТ, при которой часть этих клеток подвергается деструкции, но в меньшей степени, чем другие клетки.

У животных 2-й группы под влиянием экзогенного коллагена наблюдается значительная активация процессов васкуляризации и формирования ГТ, особенно в ранний период заживления ран — на 3-и сутки после операции. Ускорение васкуляризации ГТ можно объяснить следующими причинами. Во-первых, экзогенный коллаген в качестве прямого индуктора ангиогенеза подобно коллагену межклеточного вещества, по-видимому, способствует прикреплению, миграции, пролиферации и дифференцировке Эц. Во-

вторых, в роли непрямого индуктора ангиогенеза коллаген может усиливать рост сосудов через взаимодействие с Мф. Коллаген и продукты его распада, являясь хемотаксическими факторами как для Фб, так и для Мф [10], увеличивают содержание этих клеток в ране [2]. Мф, резорбируя экзогенный коллаген и активируясь, очевидно выделяют монокины, стимулирующие пролиферацию Эц и Фб, синтез последних коллагеновых и неколлагеновых белков [15], что способствует васкуляризации, формированию и созреванию ГТ асептических ран в более ранние сроки.

Активный рост сосудов сопровождается значительным увеличением содержания Фб и ГТ. Нельзя исключить, что одним из путей увеличения количества Фб, как показали автораднографические исследования [4], является их происхождение из наружных слоев стенок мелких сосудов. Очевидно, в стимуляции и регуляции роста Фб участвуют не только Мф и лимфоциты, но также и Эц, что подтверждается способностью последних секретировать факторы роста, усиливающие пролиферацию Фб [9].

Уменьшение абсолютного числа Эц и особенно Фб, а также сосудов ($C_{нв}$, $C_{в}$ и C_c) к 10-м суткам связано с более ранним и активным наступлением стадии фиброзной

перестройки ГТ и формирования рубца. Увеличение количества Мф в этот же период, очевидно, объясняется участием этих клеток в регуляции функциональной активности фиброкластов [2], осуществляющих фагоцитоз коллагеновых фибрилл.

Таким образом, абсолютное и относительное количество клеточных элементов и сосудов в заживающих асептических ранах кожи изменяется соответственно стадиям раневого процесса. В ранах, заживающих без лечения, наиболее интенсивное увеличение числа Мф, Эц и Фб наблюдается к 5-м суткам, максимальная васкуляризация ГТ — к 7-м суткам. При стимуляции репаративных процессов коллагеном в более ранние сроки активизируются макрофагальная реакция, пролиферация Эц и Фб, васкуляризация раны, при этом стереотипная динамика соотношения клеточных элементов в процессе заживления ран не изменяется.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г. Г. // *Арх. пат.* — 1983. — Вып. 5 — С. 60-63.
2. Берченко Г. Н., Шехтер А. Б., Николаев А. В., и др. // *Там же.* — 1985 — Вып. 12. — С. 37—44.
3. *Коллагенопластика в медицине* // Под ред. В. В. Кованова, И. А. Сыченикова. — М., 1978.
4. Саркисов Д. С., Пальцын А. А., Адамян А. А. и др. // *Бюл. эксп. биол.* — 1983 — № 12. — С. 100 — 101.
5. Саркисов Д. С., Костюченко Б. М., Амирасланов Б. М. и др. // *Арх. пат.* — 1985 — Вып. 2 — С. 17—23.
6. Серов В. В., Шехтер А. Б. *Соединительная ткань* — М., 1981.
7. Струков А. И., Какурский Л. В. // *Арх. пат.* — 1979. Вып. 6. — С. 3-9.
8. Шехтер А. Б., Николаев А. В., Берченко Г. Н. // *Там же.* — 1977. — Вып. 5. — С. 25 — 33.
9. DiCorleto P. E., Gajdusek C. M., Schwartz S. M. et al. // *J. cell. Physiol.* — 1983. — Vol. 114. — P. 339 — 345.
10. Diegelmann R. F., Cohen J. K., Kaplan A. M. // *Plast. Reconstr. Surg.* — 1981. — Vol. 68. — P. 107. — 113.
11. Leibovich S. L., Ross R. // *Amer. J. Pathol.* — 1975. — Vol. 78. — P. 71 — 101.
12. Lemaire J., Beaudoin S. M., Grondin C. // *Ibid.* — 1986. — Vol. 122. — P. 205 — 211.
13. Okabe T., Takaku F. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1986. — Vol. 134. — P. 344 — 350.
14. Thiele D. L., Lipsky P. E. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1985. — Vol. 82. — P. 2468 — 2472.
15. Whiteside T. L., Worrall J. G., Prince R. K. et al. // *Arthr. And Rheum.* — 1985. — Vol. 28. — P. 188 — 197.

QUANTITATIVE CHARACTERISTICS OF CHANGES IN CELLULAR COMPOSITION AND VASCULARIZATION OF ASEPTIC WOUNDS ON THE RAT SKIN WITHOUT TREATMENT AND DURING STIMULATION OF REPAIR PROCESSES BY EXOGENOUS COLLAGEN/

G.N. Berchenko, V.V. Berchenko

I.M. Sechenov First Moscow Medical Institute

The changes in cellular composition and vascularization of aseptic wounds on the rat skin were assessed quantitatively using the ocular net without treatment and during stimulation of repair processes by exogenous collagen. An intensive increase in the number of macrophages, endotheliocytes and fibroblasts was observed in wounds without treatment by the fifth day, with maximum vascularization of the granulation tissue occurring by the seventh day. During stimulation of repair processes by collagen the macrophage reaction, proliferation of endotheliocytes and fibroblasts and vascularization of wounds were activated earlier, while the stereotype relationships of the cellular components remained unchanged. The intercellular relationships of the wound healing process are discussed.