

УДК 591.169:577.344

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ТУЧНЫХ КЛЕТОК КОЖИ МЫШЕЙ В ХОДЕ ЗАЖИВЛЕНИЯ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЫ

О.В. Столбовская<sup>1</sup>, Е.Е. Лаврушина<sup>2</sup>, Е.С. Панюшева<sup>1</sup>, Р.М. Хайруллин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ульяновский государственный университет,

<sup>2</sup>Димитровградский технический колледж

В данном исследовании представлены результаты изучения морфофункционального состояния тучных клеток в ходе репаративной регенерации ожоговых ран у мышей в условиях воздействия светодиодного излучения красного диапазона.

**Ключевые слова:** тучные клетки, регенерация ожоговых ран кожи мышей, светодиодное излучение красного диапазона.

**Введение.** Кожа формирует внешнюю поверхность тела, обеспечивает поддержание целостности организма. Повреждение кожи влечет за собой развитие разнообразных патологических состояний. Термический ожог кожи – один из видов травмы, возникающей при действии на ткани организма высокой температуры (пламя, кипяток и др.) [12, 13]. Отличительными особенностями процесса заживления ожоговых ран являются торможение лейкоцитарно-макрофагальной реакции на ранних стадиях травматического воспаления, вторичное углубление деструктивных изменений в ожоговой ране, длительная задержка нормализации сосудисто-тканевой проницаемости, угнетение функциональной активности клеток лимфоидно-гистиоцитарного и фибробластического рядов [3, 6, 10, 13]. Ожоговая травма часто сопровождается развитием деструктивных процессов в лимфоидных органах [1, 4, 11]. В клинической практике при комплексном лечении последствий ожоговых травм наряду с лекарственными препаратами используется фототерапия с применением низкоинтенсивного лазерного излучения красной и инфракрасной частей спектра, светодиодного излучения красного диапазона (СДИКД) [2, 5, 6, 9, 10]. СДИКД обладает хорошей проницаемостью, выраженными биологическими эффектами на различные клеточные и тканевые структуры, что определяет успех его применения при коррекции функциональных нарушений и лечения пато-

логических процессов [6, 7, 9, 10, 16]. Эффективность фототерапии СДИКД при заживлении раневого регенерата определяется также и локализацией места облучения. Так, при прямом воздействии красного света на ожоговую рану кожи и при опосредованном действии СДИКД на проекцию тимуса регенерация сопровождается сокращением сроков формирования полноценной соединительной ткани, изменениями функциональной активности клеток соединительной ткани на отдельных звеньях регенерационного процесса [1, 8, 15]. Для понимания механизмов, лежащих в основе модулирующего влияния красного излучения на процессы репаративной регенерации соединительной ткани ожоговой раны кожи, важным является изучение функциональной активности тучных клеток. Тучные клетки синтезируют и секретируют биологически активные вещества, с помощью которых регулируется проницаемость капилляров и гомеостаз соединительной ткани на протяжении всего процесса заживления ран [11, 13, 14].

**Цель исследования.** Сравнительное изучение реакции тучных клеток раневого ожогового регенерата в ходе заживления у мышей при различных способах воздействия СДИКД: непосредственно на ожоговую рану и чрескожно на область проекции тимуса.

**Материалы и методы.** Для нанесения ожоговой травмы применялся термокоагулятор. Подаваемое на него напряжение регули-

ровалось с помощью трансформатора. Температура нагрева обжигающей поверхности (пластинки размером 1×5 мм) во всех опытах составляла  $360 \pm 20$  °С. За двое суток до нанесения контактного ожога животным проводили депиляцию участков кожи с помощью сернистого натрия, а затем под нембуталовым наркозом моделировали термическую рану в центре спины (площадью 5 мм<sup>2</sup> каждая). Время контакта обжигающей пластинки было выбрано экспериментально и составило 2 с. Термическое воздействие в выбранном диапазоне приводило к поражению кожи, сходному с ожогом IIIб степени у человека [8, 12], с формированием плотного струпа белого цвета, отчетливо заметного на фоне интактной кожи. При этом развивался некроз, поражающий все слои и структуры дермы.

В качестве источника СДИКД нами использовался прибор, излучающим устройством которого являются арсенид-галлий-алюминиевые кристаллы красного спектра свечения с длиной волны 0,62–0,68 мкм, помещенные в пластмассовый корпус типа «карандаш», в сочетании с блоком питания. Источник характеризуется следующими параметрами: средняя мощность излучения – 2,5 мВт; импульсная мощность излучения – 5 мВт; частота повторения импульса – 50 Гц; длительность импульса – 5 мс.

При определении дозы светотерапии учитывались средняя мощность излучения источника (мВт), диаметр светового пятна, попадающего на рану или кожу (см), и время (экспозиция), в течение которого проводилось облучение (с) [8, 15]. Плотность мощности вычисляли по формуле  $ПМ = W / (\pi r^2)$ , где ПМ – плотность мощности излучения, мВт/см<sup>2</sup>; W – средняя мощность излучения, мВт;  $\pi = 3,142$ ; r – радиус пятна, см. Плотность энергии (ПЭ), выраженную в мДж/см<sup>2</sup>, рассчитывали по формуле  $ПЭ = (W / (\pi r^2)) \cdot t$ , где t – время облучения, с. Суммарная доза облучения (Д, мДж/см<sup>2</sup>), полученная животными, определялась путем умножения дозы за одну процедуру на количество процедур (n), т.е.  $Д = ПМ \cdot t \cdot n$ .

Животные были разделены на 4 группы: 1-ю группу (интактную) составляли животные, не подвергавшиеся никаким экспери-

ментальным воздействиям, 2-ю группу (контрольную) – животные, которым имитировалось облучение ожоговой раны при выключенном источнике красного света (имитационный контроль), 3-ю – животные, у которых область раны подвергалась облучению красным светом, 4-ю – животные с ожоговыми повреждениями, у которых чрезкожному воздействию изучаемого излучения подвергалась область проекции тимуса.

Воздействие светом осуществлялось ежедневно с  $8^{00}$  до  $10^{00}$  в течение 28 дней. Время облучения СДИКД области ожогового повреждения (для животных 2-й и 3-й экспериментальных групп) определялось опытным путем и составило 2 мин [8, 15]. Поскольку при прохождении через неповрежденную кожу в условиях эксперимента теряется до 75 % мощности излучения [6], то для 4-й и 5-й экспериментальных групп животных нами было решено увеличить время экспозиции света на область проекции тимуса до 4 мин. Весь период эксперимента животные содержались в идентичных условиях вивария и имели одинаковый рацион питания.

ПМ светодиодного излучения для животных экспериментальных групп была одинаковой и составляла 1,41 мВт/см<sup>2</sup>, ПЭ для животных 3-й группы составляла 169,8 мДж/см<sup>2</sup>, для 4-й и 5-й групп – 338, 4 мДж/см<sup>2</sup>.

Выведение животных из эксперимента для проведения гистологических исследований производили на исходе 3, 5, 9, 11, 15, 21, 28-х сут. В качестве объекта исследования были взяты участки кожи с нанесенной травмой. Для выявления тучных клеток в соединительной ткани регенерата кожи использовали модифицированный способ окраски азуровым красителем [8]. Для каждого препарата тканевые базофилы подсчитывались в 20 полях зрения с последующим пересчетом на площадь одного поля зрения, которое было принято за единицу. Подсчитывались все тучные клетки, и отмечалось количество каждого типа мастоцитов (I, II, III, VI). Для характеристики степени активности в целом тучноклеточной популяции определяли средний индекс дегрануляции (КД):  $КД = N/n$ , где n – общее количество тканевых базофилов, N – число дегранулированных форм [8]. Все

эксперименты проводились в соответствии с «Правилами проведения работ и использования экспериментальных животных», утвержденными Приказом МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755, а также положениями Хельсинкской декларации от 1964 г., дополненной в 1975, 1983 и 1989 гг.

Оценку статистической значимости полученных данных проводили по t-критерию Стьюдента, достоверность различий определяли по критерию Фишера–Стьюдента (Statistica 6).

**Результаты и обсуждение.** Тучные клетки характеризуются выраженным полиморфизмом, который проявляется в значительной вариабельности их размеров, формы, химического состава содержимого гранул в за-

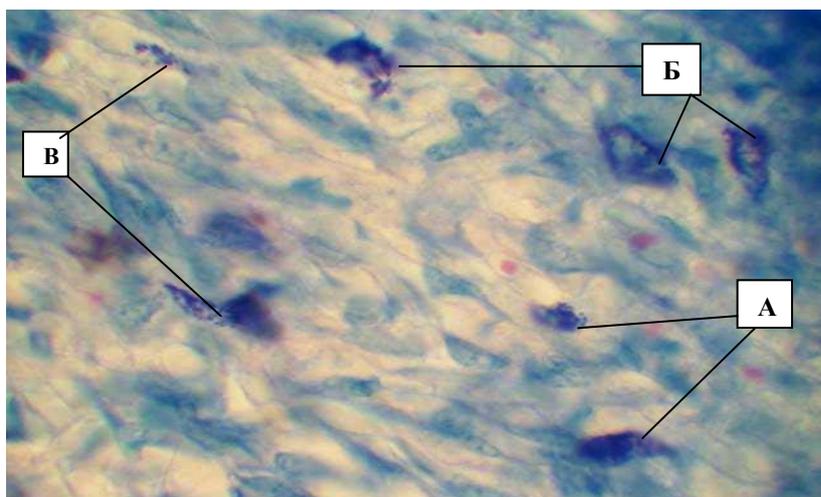
висимости от функционального состояния клеток. В соответствии с классификацией В.В. Серова и А.Б. Шехтера [3] выделяют следующие типы тучных клеток (рис. 1):

I – относительно мелкие клетки с ортохроматической зернистостью при окраске толуидиновым синим;

II – более крупные клетки с обильной метакроматической зернистостью;

III – клетки с выраженной дегрануляцией и большим количеством гранул в межклеточном веществе, не имеющие четких контуров, с отчетливо просматриваемым ядром;

IV – опустошенные в результате секреции тучные клетки, которые почти или совсем не содержат гранул, имеют слабую гомогенную окраску и хорошо заметное ядро.



**Рис. 1.** Дегрануляция тучных клеток в глубоких слоях предсуществующего дефекта (окраска азур-II-эозином; микрофото,  $\times 1000$ ):  
А – клетки II типа; Б – клетки III типа; В – клетки-тени IV типа

Все перечисленные типы клеток были обнаружены нами в коже интактных животных. Соотношение между клетками различных типов составляло соответственно 8, 30, 37 и 23 %. Тучные клетки располагались преимущественно небольшими группами или цепочками вдоль кровеносных сосудов, а в межсосудистых участках – обособленно или группами по 3–5 клеток. Количество клеток на исследуемой площади составляло  $94,310 \pm 1,727$ . Коэффициент дегрануляции (отношение количества дегранулированных форм к общему количеству клеток) составлял  $0,62 \pm 0,01$  усл. ед. (табл. 1, рис. 1, 4).

У животных контрольной группы на 3-и сут после нанесения ожоговой травмы наблюдалась массовая дегрануляция и гибель тучных клеток. Количество последних в этот период было минимальным и составляло  $34,110 \pm 2,214$ , КД составлял  $0,850 \pm 0,027$ . Следует отметить, что клетки IV типа принимали к этому времени вид «теней»: они утрачивали зернистость, имели бледно-голубую цитоплазму и бледно окрашенное ядро. В течение последующих 6-и дней происходило постепенное восстановление общего числа тучных клеток, и на 9-е сут эксперимента было отмечено превышение нормы на 30 % (табл. 1, рис. 4).

Таблица 1

## Коэффициент дегрануляции тучных клеток, усл. ед.

Сроки наблюдения, сут	Группы животных			
	1-я (интактная)	2-я (контрольная)	3-я (облучение раны СДИКД)	4-я (облучение тимуса с нанесением раны)
3-и	0,62±0,01	0,850±0,027*	0,800±0,012* <sup>0</sup>	0,760±0,025* <sup>0+</sup>
5-е		0,840±0,025*	0,860±0,028* <sup>0</sup>	0,870±0,009
9-е		0,770±0,012*	0,900±0,009* <sup>0</sup>	0,870±0,004 <sup>+</sup>
11-е		0,730±0,014*	0,790±0,015* <sup>0</sup>	0,820±0,016* <sup>0+</sup>
15-е		0,700±0,015*	0,830±0,013* <sup>0</sup>	0,740±0,010 <sup>0+</sup>
21-е		0,670±0,021*	0,750±0,019* <sup>0</sup>	0,710±0,011* <sup>0+</sup>
28-е		0,640±0,032*	0,620±0,016* <sup>0</sup>	0,650±0,011* <sup>+</sup>

**Примечание.** \* – достоверные отличия от показателей интактных животных ( $p < 0,05$ ); <sup>0</sup> – достоверные отличия от показателей животных контрольной группы ( $p < 0,05$ ); <sup>+</sup> – достоверные отличия от показателей животных, на рану которых воздействовали светодиодным излучением красного спектра света ( $p < 0,05$ ).

На 11-е сут наблюдалось максимальное для данной группы увеличение этих показателей, среднее количество тканевых базофилов составляло  $156,20 \pm 4,862$ . При этом удельное количество активно дегранулирующих форм оставалось выше среднего количества клеток у животных интактной группы. Коэффициент дегрануляции на 9-е и 11-е сут составлял соответственно  $0,770 \pm 0,012$  и  $0,730 \pm 0,014$ . В этот период отмечалось увели-

чение числа клеток I и II групп (рис. 1, 3, 4).

Клетки-тени выявлялись у животных контрольной группы до 15-х сут эксперимента, при этом количество их постепенно уменьшалось с 87 до 7%. Примечательно, что в этот период, как и во все предшествующие сроки наблюдения, тучные клетки отсутствовали в замещающей раневой дефект грануляционной ткани, располагаясь в прилегающих к ней участках.

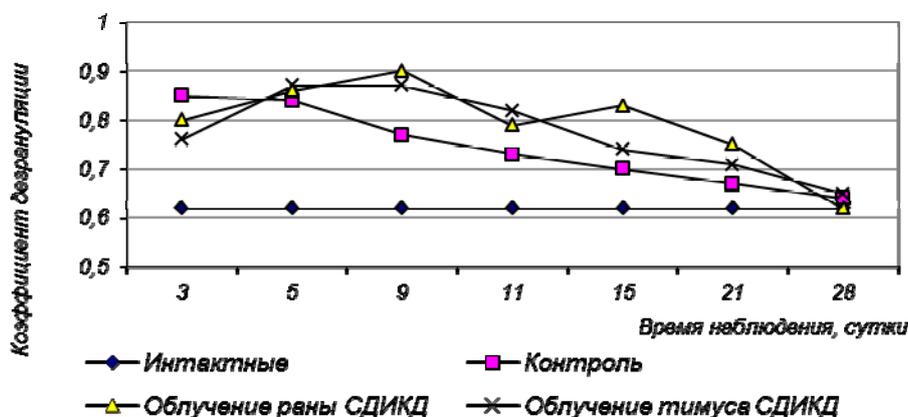


Рис. 2. Коэффициент дегрануляции тучных клеток в различные периоды раневого процесса, усл. ед.

Спустя 15 сут после нанесения травмы количество тучных клеток вокруг зоны раны уменьшилось, в среднем на единице площади их количество составляло  $99,210 \pm 2,905$ , еди-

ничные клетки выявлялись в глубоких слоях реорганизуемой соединительной ткани.

В течение последней недели эксперимента количество тучных клеток на исследуемой

площади оставалось на уровне показателей животных интактной группы, а доля активно дегранулирующих форм в популяции лишь незначительно превышала их.

Снижение общего числа тканевых базо-

филов в области раневого дефекта и их массовая дегрануляция отмечались также у животных 3-й и 4-й экспериментальных групп, однако характер изменений имел некоторые особенности (табл. 1, рис. 2–4).

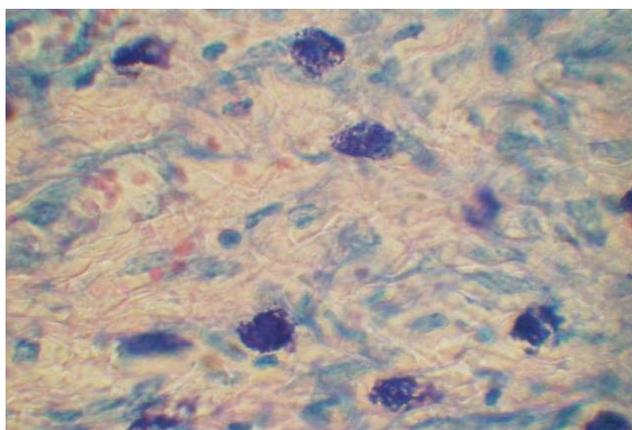


Рис. 3. Тучные клетки с различной степенью дегрануляции в зоне формирующихся сосудов (окраска азур-II-эозином; микрофото,  $\times 1000$ )

Уже на 3-и сут после начала терапевтических мероприятий у мышей обеих групп количество тучных клеток превышало показатели животных контрольной группы в 2 раза. Своего максимума численность лейкоцитов у животных 4-й группы достигала на 5-е сут, 3-й группы – на 9-е сут эксперимента ( $146,20 \pm 2,71$  и  $144,40 \pm 7,26$  клетки соответственно), после чего наблюдалось постепенное снижение этих показателей до  $96,6$ – $110,1$  клетки на исследуемой площади (рис. 4). На протяжении всего периода светового воздействия в регенератах животных

обеих групп доля дегранулирующих типов клеток оставалась преобладающей, при этом на 3-и сут заживления коэффициенты дегрануляции были достоверно ниже, а в последующие периоды – значительно выше аналогичных показателей контрольной группы (рис. 4). Клетки-тени встречались лишь в течение первых трех суток эксперимента и локализовались преимущественно в тканях, непосредственно граничащих с зоной раны. На 11-е сут отдельные тучные клетки выявлялись в молодой вновь образованной соединительной ткани.

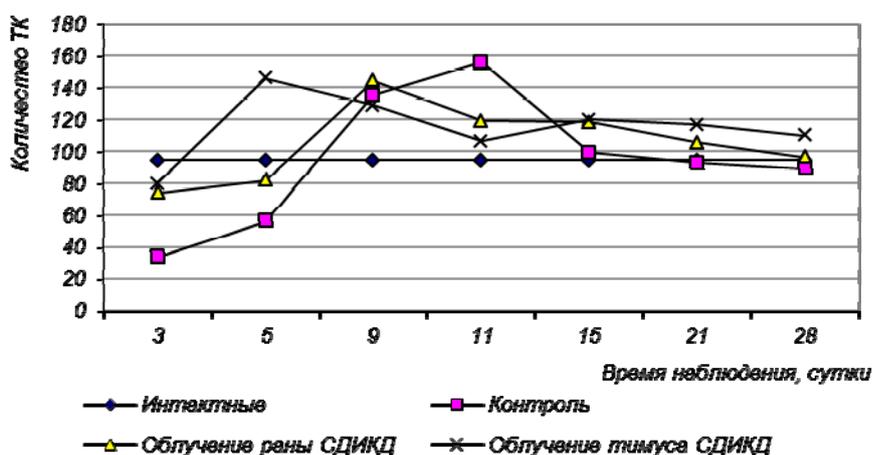


Рис. 4. Количество лейкоцитов в различные периоды заживления раны, на единицу площади

**Заключение.** Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что воздействие светодиодного излучения красного диапазона на раневую поверхность и область проекции тимуса увеличивает функциональную активность тучных клеток в регенерирующей соединительной ткани, которая выражается в интенсивной миграции клеток к зоне воспаления в первые дни после нанесения ожоговых повреждений и повышении количества дегранулирующих форм в более поздние сроки репаративных процессов.

1. *Бабаева А. Г.* Прошлое, настоящее и будущее проблемы лимфоидной регуляции пролиферации нелимфоидных клеток / А. Г. Бабаева // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 1995. – Т. 120, № 9. – С. 230–234.

2. *Гейниц А. В.* О подготовке кадров по лазерной медицине / А. В. Гейниц // Материалы Международной конференции «Лазерные и информационные технологии в медицине XXI века». – СПб., 2001. – С. 9–11.

3. *Герасимова Л. И.* Лазеры в хирургии и терапии термических ожогов : руководство для врачей / Л. И. Герасимова. – М. : Медицина, 2000. – 224 с.

4. *Долгушин И. И.* Нейтрофилы и гомеостаз / И. И. Долгушин, О. В. Бухарин. – Екатеринбург : УрО РАН, 1989. – 221 с.

5. Использование квантового излучения красного диапазона в клинической медицине / Т. В. Соколова [и др.] // Материалы Международной конференции «Лазерные и информационные технологии в медицине XXI века». – СПб., 2001. – С. 389–390.

6. *Карандашов В. И.* Фототерапия (светолечение) : руководство для врачей / В. И. Карандашов, Е. Б. Петухов, В. С. Зродников. – М. : Медицина, 2001. – 392 с.

7. *Кару Т. Й.* Фотобиология регуляций мета-

болизма клетки низкоинтенсивным лазерным светом / Т. Й. Кару. – Троицк, 1995. – 57 с.

8. *Лаврушина Е. Е.* Применение светодиодного излучения для коррекции процессов регенерации кожи / Е. Е. Лаврушина, О. В. Столбовская, Г. М. Топурия. – Ульяновск : УГСХА, 2008. – 128 с.

9. *Миронова В. В.* Использование светодиодного излучения красного диапазона в лечении пародонта / В. В. Миронова, С. В. Булярский, Т. Я. Тарарак // Итоги и перспективы развития современной медицины в контексте 21 века. – Бишкек, 1998. – С. 579–580.

10. *Неулыбин В. И.* Функциональная морфология процессов заживления ожоговой раны : автореф. дис. .... канд. мед. наук / В. И. Неулыбин. – Киев, 1990. – 16 с.

11. *Пагава К. И.* Морфо-функциональные сдвиги при воздействии на организм монохроматическим светом / К. И. Пагава. – Тбилиси : МЕЦНИЕРЕБА, 1988. – 105 с.

12. *Парамонов Б. А.* Методы моделирования термических ожогов кожи при разработке препаратов для местного лечения / Б. А. Парамонов, В. Ю. Чеботарев // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т. 134, № 11. – С. 593–597.

13. *Серов В. В.* Воспаление : руководство для врачей / В. В. Серов, В. С. Пауков. – М. : Медицина, 1995. – 640 с.

14. *Серов В. В.* Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология) / В. В. Серов, А. Б. Шехтер. – М. : Медицина, 1981. – 312 с.

15. *Столбовская О. В.* Состояние регенераторных процессов в ожоговой ране в условиях локального воздействия некогерентным красным светом / О. В. Столбовская, Е. Е. Лаврушина // Материалы Всероссийской научно-практической конф. «Наука в современных условиях: от идеи до внедрения». – Дмитровград, 2008. – С. 174–176.

16. *Barolet D.* Light – Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology / D. Barolet // Semin Cutan Med Surg. – 2008. – № 27. – P. 227–238.

## MORPHOFUNCTIONAL STATE OF THE FAT CELLS OF THE SKIN OF THE MICE IN THE COURSE OF THE HEALING THERMAL BURN

O.V. Stolbovskaya<sup>1</sup>, E.E. Lavrushina<sup>2</sup>, E.S. Panusheva<sup>1</sup>, R.M. Khairullin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ulyanovsk State University,  
<sup>2</sup>Dimitrovgrad Technical College

This study presents results of a study of morphofunctional status of mast cells in the course of reparative regeneration of burn wounds in mice under the influence led radiation in the red spectrum light.

**Keywords:** mast cells, regeneration of burn wounds of the skin of mice, led red radiation light spectrum.