

Соотношение пролиферации и апоптоза в клетках соединительных тканей кожи при заживлении механической травмы в эксперименте

Т.И. Березовская, И.А. Одинцова
Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Важным аспектом течения раневого процесса являются процессы пролиферации и апоптоза в зоне повреждения. Особый интерес представляет характеристика регенерационного гистогенеза тканей кожи в перинекротической области раны, а именно соединительнотканые слои — дерма и гиподермис. Специфика перинекротической области состоит в том, что в ней располагаются камбиальные элементы эпителиальных и соединительных тканей, за счёт которых осуществляется регенерация, а процессы клеточной гибели имеют характерные особенности. Для изучения закономерностей гистогенетических процессов, в том числе пролиферации и клеточной гибели, в тканях с различной камбиальностью чаще всего используют иммуногистохимические методы. Однако по-прежнему сохраняет свою актуальность проблема выбора маркеров, отражающих соотношение процессов пролиферации и апоптоза на разных этапах регенерации.

Цель исследования — провести иммуногистохимическую оценку соотношения пролиферации и апоптотической гибели клеток соединительных тканей кожи на разных этапах заживления механической раны.

Методы. Проведено экспериментальное одноцентровое сплошное контролируемое рандомизированное неослепленное исследование. Материалом служили образцы кожи бедра крыс линии Wistar на разных этапах заживления после механического повреждения (нанесения глубокой резаной раны). Животных разделили на 9 групп: контрольная группа — интактные крысы ($n=3$); остальные группы соответствуют срокам после нанесения механической травмы — 12 ч, 24 ч, 2, 3, 6, 10, 15 и 25 суток ($n=3$ в каждой группе). Из фрагментов кожи готовили препараты для гистологического и иммуногистохимического исследования. Для выявления процессов пролиферации использовали антитела к фосфорилированному гистону H3, для выявления апоптоза — антитела к белку p53 и каспазе 3.

Результаты. В соединительных тканях кожи крыс всех экспериментальных групп обнаружены иммунопозитивные клетки, экспрессирующие фосфогистон H3, каспазу 3 и белок p53. Определён индекс пролиферации клеток и проанализирована динамика экспрессии проапоптотических белков в интактной коже и в перинекротической области на разных этапах процесса регенерации. На основании полученных данных были рассчитаны пролиферативно-апоптотическое соотношение и числовой показатель (индекс), характеризующий оба процесса. Показано, что пролиферативно-апоптотический индекс достигает наиболее высоких значений в периоды преобладания пролиферации над процессами клеточной гибели — в интактной коже и на завершающих этапах регенерации, минимальные значения индекс принимает при преобладании процессов апоптоза — в фазу воспаления и некроза.

Заключение. В работе впервые использована иммуногистохимическая реакция с антителами к фосфогистону H3 для исследования процесса регенерации кожной раны. Этот маркер экспрессируется пролиферирующими клетками и в совокупности с маркерами апоптоза позволяет определить пролиферативно-апоптотическое соотношение на разных этапах регенерации.

Ключевые слова: кожа; дерма; гиподермис; раневой процесс; иммуногистохимия; каспаза 3; фосфорилированный гистон H3; белок p53.

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Березовская Т.И., Одинцова И.А. Соотношение пролиферации и апоптоза в клетках соединительных тканей кожи при заживлении механической травмы в эксперименте // Морфология. 2025. Т. 163, № 4. С. XX–XX. DOI: 10.17816/morph.677204 EDN: KVVQXI

© Эко-Вектор, 2025

Статья доступна по лицензии CC BY-NC-ND 4.0 International

Рукопись получена: 16.03.2025

Рукопись одобрена: 24.05.2025

Опубликована online: 18.08.2025

The ratio of proliferation and apoptosis in connective tissue cells of the skin during the healing of mechanical injury in an experiment

Tatyana I. Berezovskaya, Irina A. Odintsova
Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: An important aspect in assessing the course of the wound process is the study of proliferation and apoptosis in tissue damage zones. Of particular interest in the characterization of regenerative histogenesis of skin tissues is the perinecrotic area of the wound (namely, connective tissue layers - dermis and hypodermis), the specificity of which is that cambial elements of epithelial and connective tissues are located here, due to which regeneration is carried out, and the processes of cell death have a certain specificity. Immunohistochemical methods make a significant contribution to the study of the patterns of histogenetic processes, including proliferation and cell death in tissues with different cambiality. However, the problem of choosing markers that reflect the proliferative-apoptotic ratio at the stages of regeneration remains relevant.

AIM - to quantitatively characterize the ratio of proliferation and apoptotic death of dermal cells at the stages of healing of a mechanical skin wound.

METHODS: An experimental single-center continuous controlled randomized unblinded study was conducted. Skin pieces from Wistar rats taken from the middle third of the thigh at different stages of healing after an incised wound were used. The animals were divided into 9 groups: Group 1 — intact individuals (n=3), the remaining groups corresponded to the periods of withdrawal from the experiment (n=3 in each group) at 12 hours, 24 hours, 2nd, 3rd, 6th, 10th, 15th and 25th days after the injury. Skin fragments were used to prepare preparations for histological and immunohistochemical studies. Antibodies to histone H3 phosphorylated at serine 10 (H3S10ph) were used to detect proliferation processes, and reactions with antibodies to p53 and caspase 3 were used to detect apoptosis.

RESULTS: Cells immunopositive to phosphohistone H3, caspase 3 and p53 were found in the connective tissues of the skin of experimental animals of all groups. The proliferation index of connective tissue cells of the dermis was determined and the dynamics of expression of proapoptotic proteins in intact skin and in the perinecrotic area of the wound during regeneration was analyzed. Based on the analysis of the obtained results, the balance of apoptosis and proliferation processes was assessed and an index reflecting their activity was proposed. It was shown that a higher proliferative-apoptotic index is determined during periods of prevalence of proliferation over death processes (in intact skin and at the final stages of regeneration), the lowest index values were detected when apoptosis processes prevailed over proliferation (the phase of inflammation and necrosis).

CONCLUSION: In this work, an immunohistochemical reaction with antibodies to phosphohistone H3 was used for the first time in the study of skin wound regeneration. The marker correctly identifies proliferating cells, and in combination with apoptosis markers, it allows determining the proliferative-apoptotic ratio at the stages of regeneration.

Keywords: skin; dermis; hypodermis; wound process; immunohistochemistry; caspase 3; phosphorylated histone H3; p53.

TO CITE THIS ARTICLE:

Berezovskaya TI, Odintsova IA. The ratio of proliferation and apoptosis in connective tissue cells of the skin during the healing of mechanical injury in an experiment. *Morphology*. 2025;163(4):XX-XX.
DOI: 10.17816/morph.677204 EDN: KVVQXI

© Eco-Vector, 2025

Article can be used under the CC BY-NC-ND 4.0 International License

Received: 16.03.2025

Accepted: 24.05.2025

Published online: 18.08.2025

ОБОСНОВАНИЕ

При механических ранениях кожи выделяют три зоны: раневой канал, зону прямого травматического некроза и перинекротическую область, границу которой определяют по первому жизнеспособному волосяному фолликулу (рис. 1–4). В процессе репарации именно в перинекротической области происходят ключевые гистологические процессы, для правильного развития которых критически важен баланс между пролиферацией и клеточной гибелью [1–3]. С позиций изучения посттравматической регенерации кожи наименее исследованной областью остаётся дерма как источник основных клеточных компонентов, обеспечивающих гомеостаз и восстановление морфофункциональной организации в постраневом периоде. В работах многих авторов подчёркивается важность взаимной регуляции механизмов пролиферации и запрограммированной клеточной гибели в процессе заживления ран [4, 5]. Значительный интерес представляет изучение молекулярных факторов, контролирующих эти процессы, а одним из наиболее информативных методов в подобных исследованиях является иммуногистохимический анализ [6, 7]. Согласно данным литературы, некоторые из иммуногистохимических маркеров пролиферации и гибели клеток уже нашли своё место в диагностике, тогда как значимость и потенциальная область применения других продолжает изучаться [8–10]. В морфологических исследованиях последних лет для определения пролиферативной активности в основном применяют маркеры Ki-67, PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) и другие [11–13]. Относительно недавно в подобных работах для определения пролиферативной активности клеток начали применять маркер H3S10ph — гистон H3, фосфорилированный по серину 10 [10]. Распространённым маркером проапоптотической активности является транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл — белок p53 [14]. Он выполняет роль супрессора роста злокачественных опухолей, а соответствующий ген *TP53* относится к антионкогенам [15]. Повышенная экспрессия белка p53 отражает активацию митохондриального пути апоптоза, однако этот маркер не позволяет детектировать каспаза-зависимый путь клеточной гибели. В этой связи, для определения количества всех апоптотических клеток, независимо от пути активации, в качестве маркера мы дополнительно использовали каспазу 3. Несмотря на то, что процессы пролиферации и клеточной гибели являются неотъемлемой частью физиологического и регенерационного гистогенеза, в литературе встречается крайне мало публикаций, в которых авторы характеризуют динамику обоих процессов при заживлении ран после механической травмы кожи с использованием иммуногистохимических реакций, а также проводят оценку сдвига пролиферативно-апоптотического баланса. Существует практическая необходимость в разработке унифицированных иммуногистохимических методов, позволяющих сравнивать соотношение этих закономерных гистогенетических процессов в повреждённых тканях. Кроме того, перспективным направлением видится создание универсального индекса, отражающего процессы пролиферации и апоптоза.

Цель исследования — количественно охарактеризовать соотношение процессов пролиферации и апоптотической гибели клеток в соединительной ткани кожи на разных этапах заживления механической раны.

МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Проведено одноцентровое сплошное контролируемое рандомизированное неослеплённое исследование. Объект исследования — фрагменты кожи бедра самцов крыс линии Wistar на разных этапах заживления после нанесения механического повреждения — глубокой резаной раны. Полученные после стандартной гистологической проводки парафиновые срезы окрашивали иммуногистохимическим методом с использованием антител к фосфорилированному гистону H3, каспазе 3 и белку p53. Препараты оцифровывали для дальнейшего анализа динамики количественных параметров — подсчёта общего числа иммунопозитивных клеток к каждому из маркеров на разных сроках после травмы. Проводили статистическую обработку полученных данных.

Критерии соответствия

В исследование включены 27 самцов крыс с исходной массой тела 180–200 г, в возрасте 30–45 суток.

УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ

Экспериментальная часть работы выполнена в условиях сертифицированного вивария Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны РФ (Соглашение о научном сотрудничестве № 15 между Военно-медицинской академией имени С.М. Кирова и ГНИИИ ВМ МО РФ от 13.09.2023 г.). Морфометрическая и статистическая обработка выполнены на кафедре гистологии с курсом эмбриологии ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ.

Материал для исследования (фрагменты кожи) получали в следующих временных точках: спустя 12 ч, 24 ч, 2, 3, 6, 10, 15 и 25 суток после нанесения механической травмы кожи.

ОПИСАНИЕ МЕДИЦИНСКОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА

Крыс содержали по группам, соответствующим срокам выведения из эксперимента, в отдельных промаркированных клетках при комбинированном освещении без применения систем автоматизации. Манипуляции проводили в утренние часы. В качестве наркоза использовали смесь тилетамина и золазепама (препарат Золетил®; Vibrac, Франция, доза 10 мг/кг) в сочетании с ксилазином (10 мг/кг; Pharmamagist Ltd., Венгрия). Препараты вводили внутримышечно, после чего скальпелем выполняли глубокий длинный (около 2 см) поперечный разрез кожи в области средней трети бедра правой нижней конечности. без проведения антисептической обработки. После нанесения травмы животных возвращали в клетку, обезболивание не применяли. Образцы кожи получали после эвтаназии крыс путём передозировки наркоза на разных этапах заживления раны — спустя 12 ч, 24 ч, 1, 2, 3, 6, 10, 15 и 25 суток после травматического воздействия. В качестве контроля использовали фрагменты кожи интактных крыс.

ИСХОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основной исход исследования

С помощью иммуногистохимического метода с использованием антител к каспазе 3 и белку p53 удалось проследить динамику общего количества гибнущих клеток дермы и гиподермиса в перинекротической области на разных этапах раневого процесса. Установлено, что иммуногистохимическая реакция с антителами к фосфорилированному гистону H3 демонстрирует высокую специфичность в отношении делящихся клеток в соединительных тканях дермы, но метод имеет функциональные ограничения. Статистическая обработка количественных данных позволила рассчитать пролиферативно-апоптотический индекс, который может быть использован в качестве критерия для определения фазы раневого процесса.

Методы регистрации исходов

Иммуногистохимическое исследование

При проведении иммуногистохимических реакций использовали: кроличьи поликлональные антитела к H3S10ph (ab14955, Abcam, Великобритания; разведение 1:1200); мышинные моноклональные антитела к белку p53 (M700129-2, Dako, Дания; клон DO-7, разведение 1:200); кроличьи поликлональные антитела к каспазе 3 (A11021, ABclonal Biotechnology Co, Китай; разведение 1:700). Подготовку и окрашивание образцов проводили по следующей схеме:

- фрагменты кожи фиксировали в забуференном 10% растворе формалина в течение 24 часов;
- затем образцы перекладывали в 96% этиловый спирт и после поэтапной проводки заливали в парафин на пластиковых кассетах;
- парафиновые срезы толщиной 5 мкм изготавливали на санном микротоме (Sakura, Япония) и переносили на предметные стёкла, покрытые полилизинном;
- готовые срезы просушивали в термостате при температуре 37 °C в течение 12 часов;
- далее препараты депарафинировали в ксилоле, 10 мин;
- на следующем этапе срезы регидратировали в этиловом спирте — 2 раза по 5 мин в 96% этаноле и 1 раз в 80% этаноле, после чего промывали в дистиллированной воде, 5 мин;
- для демаскирования антигенов препараты погружали в предварительно нагретый до 60 °C буфер S1700 (Dako, Дания) и инкубировали в пароварке в течение 25 мин;
- срезы повторно промывали в дистиллированной воде в течение 5 мин и помещали в раствор пероксида водорода — 3% H₂O₂, на 10 мин;
- препараты вновь промывали и выдерживали в фосфатно-солевом буфере PBS (Биолот, Россия), 5 мин;
- неспецифическое связывание вторичных антител блокировали в растворе Protein Block DP-125 (Spring Bioscience, США) при комнатной температуре, в течение 10 мин;

- после удаления блокирующего раствора наносили первичные антитела и инкубировали в термостате при температуре 27 °С при поддержании постоянной влажности (гистон H3 - 48 ч, p53 - 1 ч, каспаза 3 - 20 мин);
- срезы промывали два раза в PBS;
- далее наносили вторичные антитела, конъюгированные с полимером и пероксидазой хрена и инкубировали во влажной камере при температуре 27 °С, 30–40 мин, после чего препараты снова промывали в PBS;
- наносили рабочий раствор 3,3-диаминобензидинтетрагидрохлорида (Dako, Дания) и инкубировали в течение 3 мин для проявления реакции, под визуальным контролем с использованием микроскопа;
- после достижения нужной степени окраски срезы промывали в 3% H₂O₂ и дистиллированной воде — 3 раза по 5 мин;
- препараты обезвоживали в изопропиловом спирте и смеси спирта с ксилолом (1:1);
- просветляли в ксилоле;
- ядра клеток докрашивали толуидиновым синим;
- готовые препараты заключали в среду Cytoseal 60 (Thermo Fisher Scientific, США).

Для визуализации использовали световой микроскоп Zeiss Axio Scope A1 (Zeiss, Германия), оснащённый фотокамерой Zeiss AxioCam ERc 5s (Zeiss, Германия).

Морфометрическое исследование

Морфометрический анализ оцифрованных изображений проводили при помощи лицензионного программного обеспечения Zen 2.3. (Zeiss, Германия). Иммунопозитивные клетки подсчитывали на каждом препарате в автоматизированном режиме в 10 непересекающихся полях при помощи опции «Точки». Индекс пролиферации рассчитывали как процентное отношение числа клеток с иммунореактивными ядрами на 10 полях зрения к общему числу клеток. Пролиферативно-апоптотический индекс (ПАИ) рассчитывали по формуле:

$$\text{ПАИ} = M / (ap + ac) \quad (1)$$

где M — количество делящихся клеток, то есть количество клеток, связывающихся с антителами к фосфорилированному гистону H3; ap — количество клеток в процессе апоптоза, реализующегося по митохондриальному пути, то есть количество p53-позитивных клеток; ac — количество клеток в процессе каспаза-зависимого апоптоза (каспаза 3-позитивные клетки). Числовые данные заносили в таблицы Excel (Microsoft, США) для построения графиков и дальнейшей статистической обработки.

АНАЛИЗ В ГРУППАХ

Животных разделили на 9 групп: контрольная группа — интактные особи ($n=3$); остальные группы соответствуют срокам после нанесения механической травмы кожи — 12 ч, 24 ч, 2, 3, 6, 10, 15 и 25 суток ($n=3$ в каждой группе).

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Запланированный размера выборки

Размер выборки предварительно не рассчитывался.

Статистические методы

Полученные количественные данные обрабатывали с помощью программ Excel (Microsoft, США) и Statistica 10.0 (StatSoft, США). Тип распределения данных определяли при помощи критерия Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса. В случае нормального распределения использовали t-тест Стьюдента. Значения представляли в виде средней величины и стандартного отклонения. Если распределение отличалось от нормального, использовали U-критерий Манна–Уитни для двух групп (парный анализ). Значимыми считали различия при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЫБОРКИ

Фрагменты кожи бедра самцов крыс линии Wistar на разных этапах заживления после нанесения механического повреждения — глубокой резаной раны. Образцы размером 1,5–2,0 см включали раневой канал и окружающие его неповреждённые ткани кожи (оценивали визуально).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В дерме экспериментальных животных всех групп обнаружены иммунопозитивные к фосфогистону H3, каспазе 3 и p53 клетки (рис. 5). В контрольной группе индекс пролиферации в соединительных тканях кожи составил 2,60%. Через 12 ч после травмы этот показатель ниже на 94,6% и составляет 0,14%. В ходе раневого процесса количество делящихся клеток закономерно увеличивается и достигает максимальных значений к концу первых суток и на 6-е сутки эксперимента — индекс пролиферации 8,30% и 8,90% соответственно. Через 25 суток после травматического повреждения кожи индекс пролиферации составил 1,75%, что меньше, чем в контрольной группе на 32,7% (рис. 6). В коже интактных животных встречаются единичные клетки, иммунопозитивные к маркерам апоптоза: к каспазе 3 — $2,8 \pm 2,9$ клеток; к белку p53 — $3,4 \pm 2,5$ клеток. После механической травмы уже через 12 часов наблюдается повышение количества таких клеток. Первым пиковым значений достигает экспрессия белка p53: через 24 часа после повреждения количество иммунопозитивных клеток составляет $48,3 \pm 4,6$ ($p=0,002$ при сравнении с временной точкой 12 ч). Последующие «пики» экспрессии p53 приходятся на 3 и 15-е сутки эксперимента — $36,1 \pm 0,4$ и $35,6 \pm 0,1$ иммунопозитивных клеток на 10 полях зрения соответственно. Наименьшее количество клеток, экспрессирующих p53 выявлено через 2 и 6 суток после травмы — $14,4 \pm 0,2$ и $14,6 \pm 0,2$ клеток на 10 полях зрения соответственно. На 25-е сутки визуализируются единичные p53-позитивные клетки, количество которых сопоставимо со значением в интактной коже. Повышение экспрессии каспазы 3, по сравнению с показателями интактной кожи, обнаружено через 12 и 24 ч после начала эксперимента — $23,3 \pm 1,1$ и $26,8 \pm 0,1$ клеток на 10 полях зрения соответственно. Однако, значимое увеличение количества каспазы 3-позитивных клеток установлено только через 2-е суток после травмы ($81,1 \pm 0,3$ клеток; $p=0,02$ при сравнении с группой 24 ч), а абсолютный максимум пришёлся на 10-е сутки эксперимента ($90,3 \pm 1,2$ клеток; $p=0,05$ при сравнении с группой 6 суток). Необходимо отметить, что общее количество клеток, экспрессирующих каспазу 3, превышает количество p53-иммунопозитивных клеток во всех временных точках (рис. 7). Исследование перинекротической области кожной раны показало, что процессы клеточной гибели на начальных этапах посттравматического гистогенеза преобладают над пролиферативными и отличаются от контроля (см. рис. 7). В то же время количество клеток, находящихся в начальной фазе митоза, свидетельствует о резком снижении интенсивности пролиферации в первые часы после ранения и её статистически значимом повышении ($p=0,003$) уже к концу первых суток эксперимента (см. рис. 6).

Известно, что тканевой гомеостаз регулируется соотношением процессов пролиферации и апоптоза в клетках, поэтому сравнительный анализ этого показателя может служить значимым диагностическим критерием. Рассчитанный по формуле 1 индекс ПАИ (рис. 9) комплексно отражает соотношение делящихся и гибнущих клеток в исследуемой ткани. Наименьшее значение ПАИ является следствием высокого уровня апоптоза и низкой скорости образования новых клеток (пролиферации). Установлено, что наибольшую величину ПАИ (2,25) демонстрируют образцы интактной кожи. В первые часы после травмы показатель резко падает: ПАИ = 0,02 через 12 ч и 0,05 через 24 часа. По мере развития процессов регенерации индекс, отражающий баланс между пролиферацией и апоптозом, постепенно увеличивался и достиг наибольшего значения через 6 суток после травмы, тогда как на 10 и 15 сутки ПАИ снова снизился до 0,20. Вероятно такая динамика индекса связана с отсроченной гибелью клеток в перинекротической области раны. К 25-м суткам регенерационного гистогенеза значение ПАИ стремится к условно нормальному показателю и составляет 1,45 (см. рис. 9).

ОБСУЖДЕНИЕ

РЕЗЮМЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для оценки течения раневого процесса мы предприняли попытку проследить изменения соотношения процессов пролиферации и апоптоза при заживлении механического повреждения кожи в эксперименте. В работе использовали иммуногистохимический метод с последующей статистической обработкой результатов и проведением математических вычислений. Раздельный анализ индекса пролиферации и показателя апоптотической гибели клеток на разных этапах регенерации позволил нам проследить динамику этих процессов и вывести формулу для расчёта пролиферативно-апоптотического индекса. Значения ПАИ в коже интактных крыс приняли за «условно нормальные». Результаты сравнения индексов на разных этапах регенерации подтверждают, что данный показатель отражает характерные для фаз раневого процесса изменения гомеостаза и может служить диагностическим критерием. Однако специфика иммуногистохимического маркера для выявления пролиферации (фосфогистона H3) не позволяет в

полной мере оценить количество делящихся клеток, поскольку он экспрессируется только в клетках, находящихся в поздней G2- и начальной M-фазах клеточного цикла. В связи с этим, для объективной оценки количества пролиферирующих клеток целесообразно использовать дополнительные маркеры.

ОБСУЖДЕНИЕ ОСНОВНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работах некоторых авторов использованы математические методы определения пролиферативно-апоптотического соотношения в тканях со злокачественными новообразованиями [16]. Взяв эти методы за основу, мы вывели простую формулу для определения пролиферативно-апоптотического соотношения в соединительных тканях, что позволило проследить динамику этого показателя на разных этапах регенерации (рис.8). Предлагаемый нами подход является принципиально новым методом определения индекса, характеризующего гомеостаз соединительных тканей кожи в постраневом гистогенезе.

Для физиологической регенерации кожи характерно преобладание пролиферативных процессов над клеточной гибелью, что в нашем исследовании подтвердилось высоким значением пролиферативно-апоптотического индекса в коже интактных животных контрольной группы. Первые часы после механической травмы характеризуются развитием системной воспалительной реакции, которая проявляется значительным увеличением уровня клеточной гибели на фоне угнетения пролиферативных процессов. Эта реакция нашла отражение в величине пролиферативно-апоптотического индекса, который значимо ниже по сравнению с контрольной группой. Известно, что после травмы регенерационный гистогенез, следующий за воспалительной реакцией, характеризуется активной пролиферацией клеток [17]. В настоящем исследовании мы наблюдали отчётливую динамику ПАИ — до 6 суток после травмы индекс повышается. Дальнейшее заживление раны характеризуется постепенным увеличением общего количества клеток в зоне повреждения, как за счёт их миграции из прилежащих тканей, так и путём продолжающейся пролиферации резидентных клеток. На этом фоне наблюдается временное увеличение уровня маркеров клеточной гибели, что объясняется отсроченной гибелью тканевых структур и выражается в снижении ПАИ в период с 10 по 15 сутки эксперимента. При этом в указанные сроки ПАИ в 10 раз превышает значения показателя в первые сутки после травмы.

Несмотря на то, что у части животных регенерация тканей визуально полностью завершается к 25-м суткам эксперимента, необходимо учитывать индивидуальные особенности течения процессов заживления. К концу эксперимента индекс пролиферации ниже, чем в нулевую фазу регенерации (в коже интактных крыс), однако показатели апоптоза сопоставимы с таковыми в контрольной группе. Предложенный нами индекс отражает подобные изменения соотношения пролиферации и апоптоза и на 25-е сутки эксперимента существенно превышает значения в предыдущих временных точках, однако остаётся на 35,6% ниже контрольного показателя.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании предложен индекс, отражающий соотношение пролиферации и апоптоза в клетках соединительных тканей кожи в посттравматическом периоде и позволяющий комплексно охарактеризовать динамику данных процессов. Мы предполагаем, что ПАИ можно рассматривать в качестве критерия для определения фазы регенерационного гистогенеза. Результаты исследования свидетельствуют о том, что уровень апоптоза, реализующегося по митохондриальному и каспаза-зависимому механизмам, возможно определить с помощью комбинации маркеров p53 и каспазы 3. Однако учитывая особенности экспрессии использованного маркера фосфогистона H3, для более объективной оценки пролиферативной активности необходимо продолжить исследования. Рассчитанный нами индекс или аналогичные показатели клеточного баланса в тканях могут использоваться для своевременной классификации ран. Возможно, именно такие критерии позволят объективно определять неблагоприятное течение раневого процесса и предотвращать преобразование острых ран в хронические.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов.

Т.И. Березовская — определение концепции, работа с данными, анализ данных, проведение исследования, обеспечение исследования, валидация, визуализация, написание черновика рукописи, пересмотр и редактирование рукописи;

И.А. Одинцова – руководство исследованием, администрирование проекта, разработка методологии, определение концепции, валидация. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Этическая экспертиза. Условия содержания экспериментальных животных соответствовали принципам биоэтики и «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Хельсинкская декларация, 2000 г.), закону «О защите животных от жестокого обращения» (глава V, ст. 104679-ГД от 01.12.1999 г.), приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г., а также приказу МЗ РФ от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Протокол проведения исследований одобрен комиссией независимого локального этического комитета ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ. Выписка из протокола заседания Локального этического комитета от 17.10.2023 г. (протокол № 283).

Источники финансирования. Отсутствуют.

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При проведении исследования и создании настоящей статьи авторы не использовали ранее полученные и опубликованные сведения (данные, текст, иллюстрации).

Доступ к данным. Все данные, полученные в настоящем исследовании, представлены в статье.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали два внешних рецензента, член редакционной коллегии и научный редактор издания.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contributions:

T.I. Berezovskaya – concept definition, data processing, data analysis, research implementation, research support, validation, visualization, manuscript drafting, manuscript revision and editing;

I.A. Odintsova – research management, project administration, methodology development, concept definition, validation.

Ethics approval: The conditions of keeping the experimental animals complied with the principles of bioethics and the "Rules for Conducting Work Involving Experimental Animals" (Declaration of Helsinki, 2000), the Law "On the Protection of Animals from Cruelty to Animals" (Chapter V, Article 104679-GD of 01.12.1999), Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 267 of 19.06.2003, as well as Order of the Ministry of Health of the Russian Federation of 01.04.2016 No. 199n "On Approval of the Rules of Good Laboratory Practice". The research protocol was approved by the commission of the independent local ethics committee of the Kirov Military Medical Academy of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Extract from the minutes of the meeting of the Local Ethics Committee dated 17.10.2023 (minutes No. 283).

Funding sources: This study was not supported by any external sources of funding.

Disclosure of interests: The authors declare that they have no competing interests.

Statement of originality: When conducting the research and creating this article, the authors did not use previously obtained and published information (data, text, illustrations).

Data availability statement: All data obtained in this study are presented in the article.

Generative AI use statement: No generative artificial intelligence technologies were used in the creation of this article.

Provenance and peer-review: This paper was submitted to the journal on an unsolicited basis and reviewed according to the usual procedure. Two external reviewers, a member of the editorial board, and the scientific editor of the publication participated in the review.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Deev RV. Programmed cell death: new nomenclature. *Morphology*. 2024;162(3):340–346. doi: 10.17816/morph.642457 EDN: [FAEUVI](#)
2. Reva IV, Reva GV, Odintsova IA. Immunohistochemical characteristics of biopsies of pathologically altered gastric

- mucosa. In: Makiev RG, Odintsova IA, editors. *Innovative technologies for studying histogenesis, reactivity and tissue regeneration (Proceedings of the Military Medical Academy)*. Saint Petersburg: Military Medical Academy; 2024. P:136–141. (In Russ.) EDN: BZAWGC ISBN: 978-5-94277-106-5
3. Demyashkin GA, Uruskhanova, ZhE, Koryakin SN, et al. Renal proliferation and apoptosis against ascorbic acid administration in a model of acute radiation nephropathy. *Morphology*. 2024;162(1):16–30. doi: 10.17816/morph.629410. EDN: LVBGZW
 4. Hu S, Xu Y, Meng L, et al. Curcumin inhibits proliferation and promotes apoptosis of breast cancer cells. *Exp Ther Med*. 2018;16(2):1266–1272. doi: 10.3892/etm.2018.6345
 5. Xie R, Tang J, Zhu X, Jiang H. Silencing of hsa_circ_0004771 inhibits proliferation and induces apoptosis in breast cancer through activation of miR-653 by targeting ZEB2 signaling pathway. *Biosci Rep*. 2019;39(5):BSR20181919. doi: 10.1042/BSR20181919
 6. Demyashkin GA, Atyakshin DA, Yakimenko VA, et al. Characteristics of proliferation and apoptosis of hepatocytes after administration of ascorbic acid in a model of radiation hepatitis. *Morphology*. 2023;161(3):31–38. doi: 10.17816/morph.624714 EDN: LDQCJS
 7. Kotov VN, Kostyaeva MG, Ibadullaeva SS, et al. Regulatory role of protein p53 in the functional activity of the central nervous system. *Morphology*. 2023;161(4):113–128. doi: 10.17816/morph.629463 EDN: FGSFQU
 8. Chumasov EI, Maistrenko NA, Romashchenko PN, et al. Immunohistochemical study of the sympathetic innervation of the colon in chronic slow-transit constipation. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2022;11(207):191–197. doi: 10.31146/1682-8658-ecg-207-11-191-197 EDN: [PXTDXG](#)
 9. Shi Y., Zhao Y., Zhang Y., et al. TNNT1 facilitates proliferation of breast cancer cells by promoting G₁/S phase transition. *Life Sci*. 2018;208:161–166. doi: 10.1016/j.lfs.2018.07.034
 10. Korzhenskii DE, Kirik OV, Petrova ES, et al. *Theoretical foundations and practical applications of immunohistochemical methods*: A guide. Saint Petersburg: SpetsLit; 2014. (In Russ.) EDN: [SINOMT](#) ISBN: 978-5-299-00596-7
 11. Campoy EM, Branham MT, Mayorga LS, Roqué M. Intratumor heterogeneity index of breast carcinomas based on DNA methylation profiles. *BMC Cancer*. 2019;19(1):328. doi: 10.1186/s12885-019-5550-3 EDN: [YEIARD](#)
 12. He J, Chen Y, Cai L, et al. UBAP2L silencing inhibits cell proliferation and G2/M phase transition in breast cancer. *Breast Cancer*. 2018;25(2):224–232. doi: 10.1007/s12282-017-0820-x EDN: [ZDLVRG](#)
 13. Zhou Y, Shen JK, Yu Z, et al. Expression and therapeutic implications of cyclindependent kinase 4 (CDK4) in osteosarcoma. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018;1864(5 Pt A):1573–1582. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.02.004 EDN: [YFWUST](#)
 14. Diatlova AS, Dudkov AV, Linkova NS, Khavinson VKh. Molecular markers of caspase-dependent and mitochondrial apoptosis: the role of pathology and cell senescence. *Advances in Modern Biology*. 2018;138(2):126–137. doi: 10.7868/S0042132418020023 EDN: XMRNSH
 15. Hashimoto N, Nagano H, Tanaka T. The role of tumor suppressor p53 in metabolism and energy regulation, and its implication in cancer and lifestyle-related diseases. *Endocr J*. 2019;66(6):485–496. doi: 10.1507/endocrj.EJ18-0565 EDN: [BTRYWO](#)
 16. Kudinova EA, Bozhenko VK, Kulinich TM, et al. Evaluation of the ratio of proliferation and apoptosis in breast tissue in normal and hyperproliferative processes. *Bulletin of the Russian Scientific Center of Radiology*. 2019;19(2):25–39. EDN: PUMevi
 17. Danilov RK. The doctrine of tissue cambiality as a histogenetic basis for understanding the mechanisms of the wound process. *Morphology issues of the 21st century*. Issue 2. St. Petersburg. DEAN.2010.34-8

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

AUTHORS' INFO

*Автор, ответственный за переписку:	
Березовская Татьяна Ионовна; адрес: Россия, 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6; ORCID: 0009-0009-1591-9152; eLibrary SPIN: 2508-7042; e-mail: lapi2@yandex.ru	Berezovskaya Tatyana Ionovna; address: 6 Akademika Lebedeva st, Saint Petersburg, Russia, 194044; ORCID: 0009-0009-1591-9152; eLibrary SPIN: 2508-7042; e-mail: lapi2@yandex.ru
Соавтор:	

Морфология / Morphology

Оригинальные исследования / Original Study Articles

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.677204>

Одинцова Ирина Алексеевна , д-р мед. наук, профессор; ORCID: 0000-0002-0143-7402; eLibrary SPIN: 1523-8394; e-mail: odintsova-irina@mail.ru	Odintsova Irina Alekseevna , Dr. Sci. (Medicine), Professor; ORCID: 0000-0002-0143-7402; eLibrary SPIN: 1523-8394; e-mail: odintsova-irina@mail.ru
--	---

РИСУНКИ

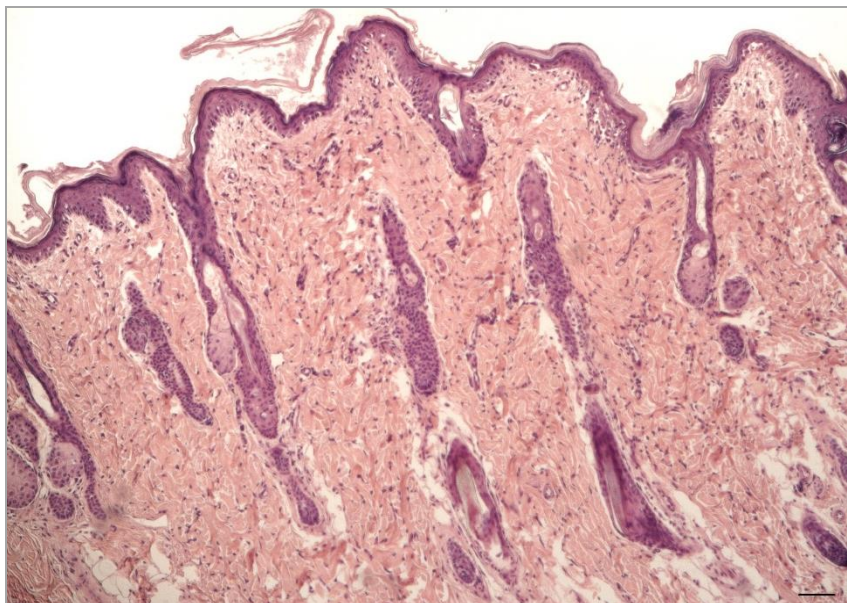


Рис. 1. Интактная кожа бедра крысы: окраска гематоксилином и эозином; объектив $\times 4$, окуляр $\times 10$.

Fig. 1. Intact skin of rat thigh. Staining: hematoxylin and eosin (ob. 4, e. 10).

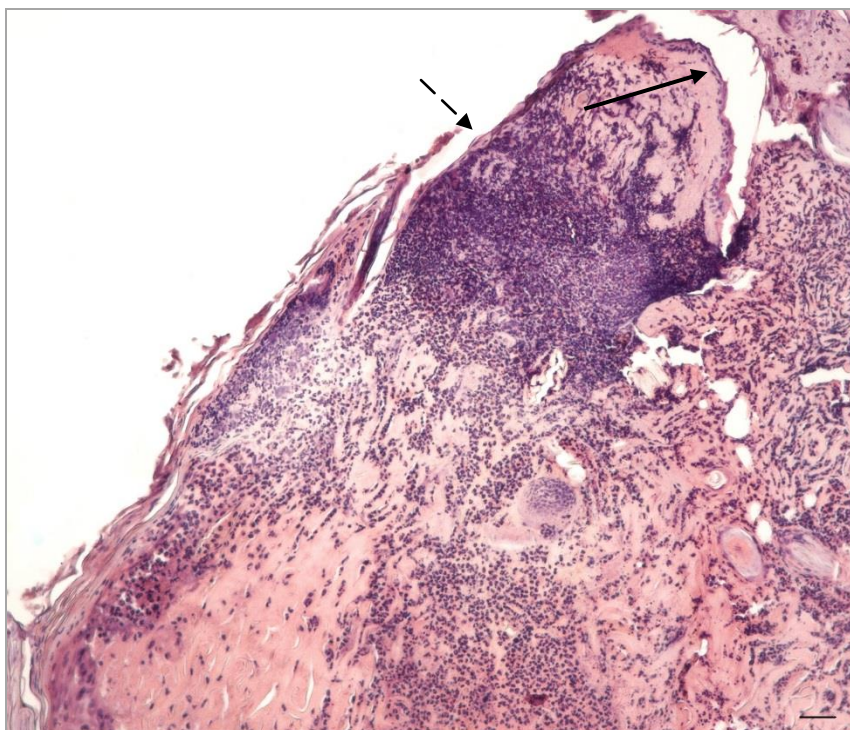


Рис. 2. Кожа бедра крысы спустя 2-е суток после нанесения травмы: чёрная стрелка — раневой канал; пунктирная стрелка — зона первичного некроза; окраска гематоксилином и эозином; объектив $\times 4$, окуляр $\times 10$.

Fig. 2. Skin of rat thigh. Wound channel and zone of primary necrosis. 2 days from the beginning of the experiment. Staining: hematoxylin and eosin (ob. 4, e. 10).

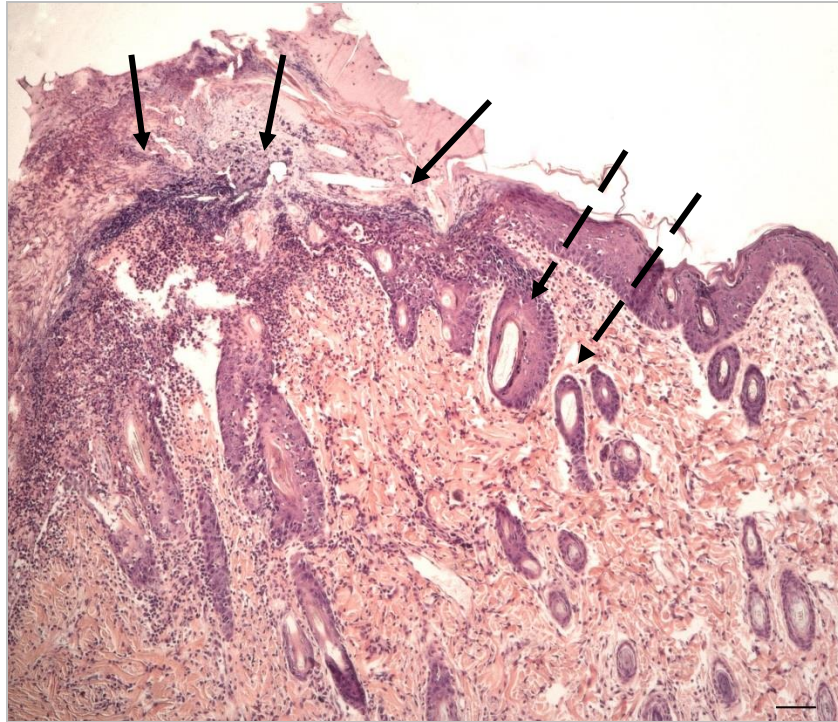


Рис. 3. Кожа бедра крысы спустя 6 суток после нанесения травмы: чёрные стрелки — зона первичного некроза; пунктирные стрелки — перинекротическая область; окраска гематоксилином и эозином; объектив $\times 4$, окуляр $\times 10$.

Fig. 3. Skin of rat thigh. Primary necrosis zone and perinecrotic area. 6 days from the beginning of the experiment. Staining: hematoxylin and eosin (ob. 4, e. 10).

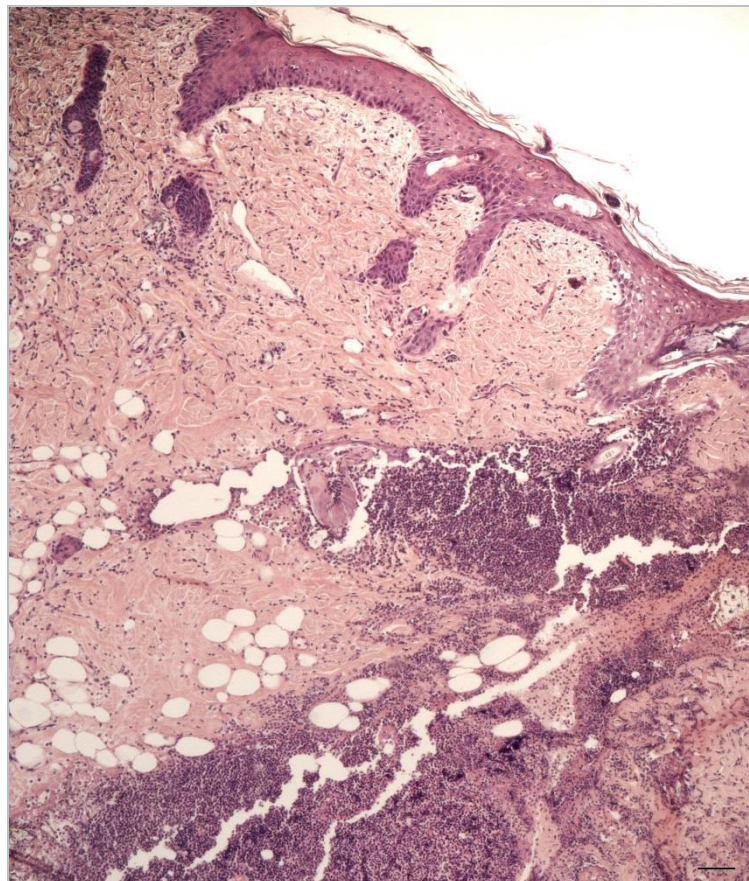
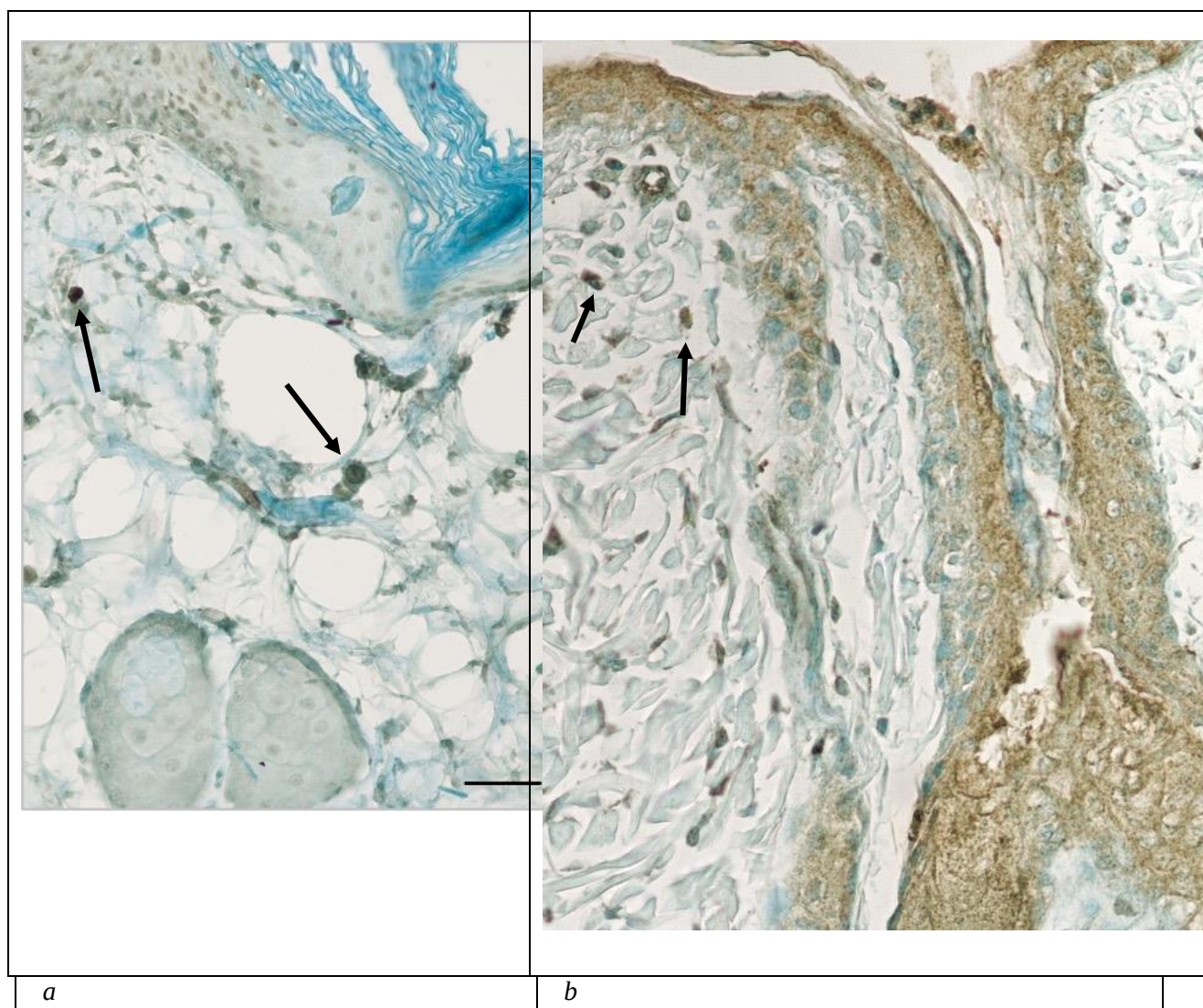


Рис. 4. Кожа бедра крысы спустя 10 суток после нанесения травмы — перинекротическая область: окраска гематоксилином и эозином; объектив ×4, окуляр ×10.

Fig. 4. Skin of rat thigh. Perinecrotic area. 10 days from the beginning of the experiment. Staining: hematoxylin and eosin (ob. 4, e. 10).



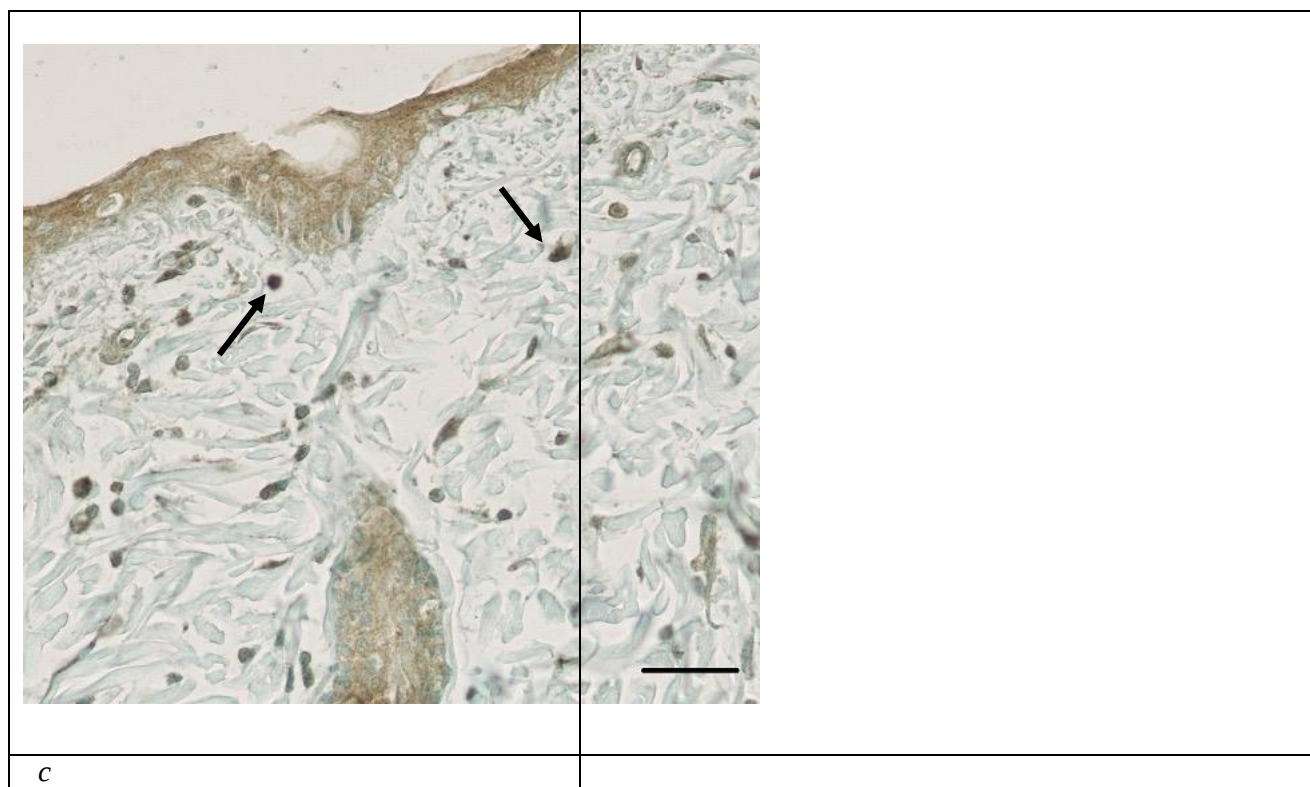


Рис. 5. Кожа бедра крысы спустя 6 суток после нанесения травмы — перинекротическая область: а — иммуногистохимическая реакция с антителами к фосфогистону Н3; б — иммуногистохимическая реакция с антителами к каспазе 3; с — иммуногистохимическая реакция с антителами к р53. Стрелками указаны иммуноположительные клетки; объектив $\times 40$, окуляр $\times 10$.

Fig. 5. Rat thigh skin. 6th day of the experiment. Perinecrotic area. Immunohistochemical reaction with antibodies to phosphohistone H3 (ob. 40, e. 10). Arrows indicate immunopositive cells.



Рис. 6. Динамика индекса пролиферации клеток соединительных тканей кожи в перинекротической области в зависимости от фазы раневого процесса.

Fig. 6. Dynamics of the proliferation index of connective tissue cells of the skin in the perinecrotic area of the wound depending on the phase of the wound process.

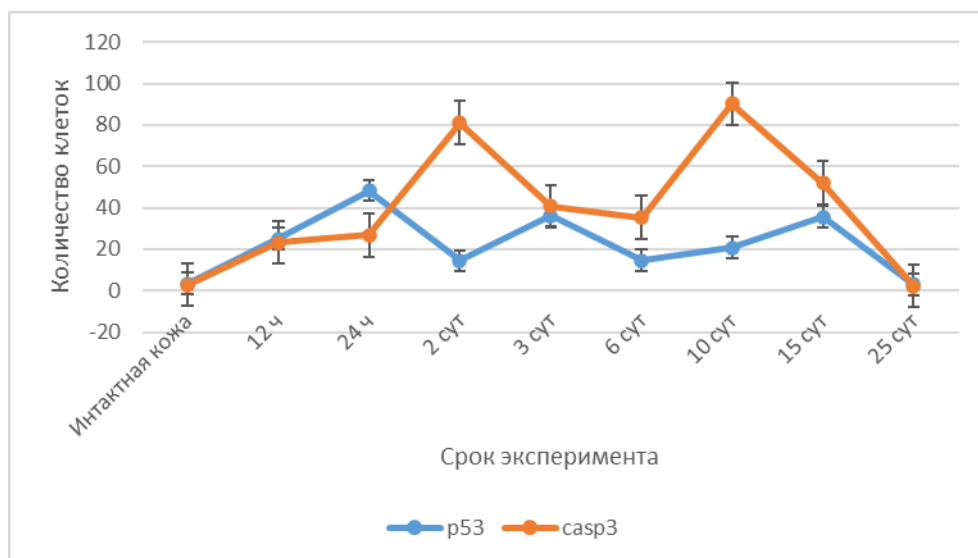
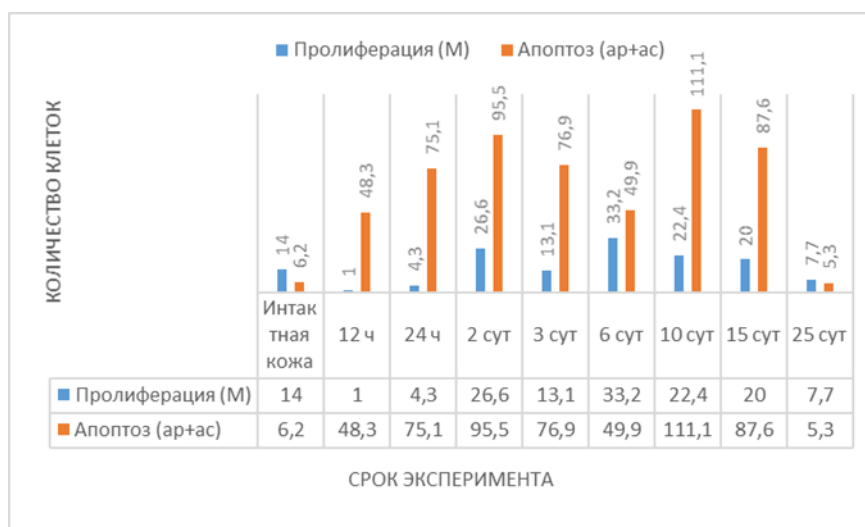


Рис. 7. Динамика количества клеток, экспрессирующих белок p53 и каспазу 3 (casp 3) в зависимости от фазы раневого процесса.

Fig. 7. Dynamics of the number of p53- and caspase 3-immunopositive cells depending on the phase of the wound process.



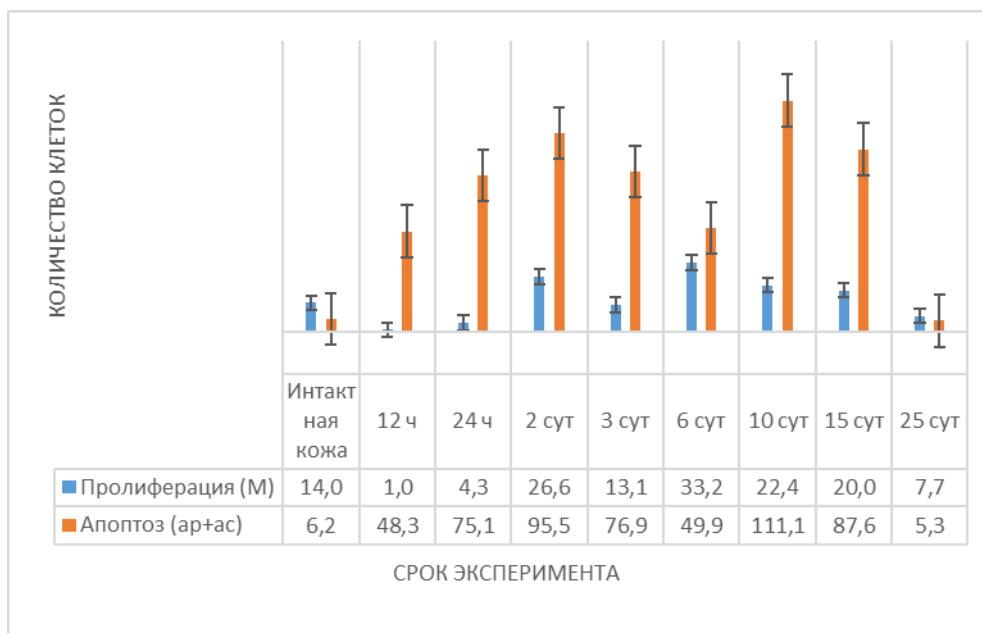


Рис. 8. Динамика количества пролиферирующих и гибнущих клеток в разные сроки после травмы кожи.

Fig. 8. Dynamics of the number of proliferating and dying cells at the stages of the experiment.





Рис. 9. Динамика пролиферативно-апоптотического индекса в зависимости от фазы раневого процесса.

Fig. 9. Dynamics of the proliferative-apoptotic index depending on the phases of the wound process.