

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

EDN: KVVQXI

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 — 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. 327–338. DOI: 10.17816/morph.677204 EDN: KVVQXI

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

EDN: KVVQXI

Proliferation to Apoptosis Ratio in Cutaneous Connective Tissue Cells During Mechanical Injury Healing in an Experiment

Tatyana I. Berezovskaya, Irina A. Odintsova

Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: The proliferation to apoptosis ratio at a wound site is crucial for healing. Regenerative histogenesis of the skin in the perinecrotic zone is of key interest, specifically the connective tissue layers (the dermis and hypodermis). This zone is characterized by cambial elements of epithelial and connective tissues that drive regeneration, as well as distinctive cell death processes. Immunohistochemical methods are typically used to investigate patterns of histogenetic processes, including proliferation and cell death, in tissues with varying regenerative potential. However, selecting markers that reflect the proliferation to apoptosis ratio at different stages of regeneration remains challenging.

AIM: This study aimed to perform an immunohistochemical evaluation of the proliferation to apoptosis ratio in cutaneous connective tissue cells at different stages of mechanical injury healing.

METHODS: An experimental single-center, continuous, controlled, randomized, non-blind study was conducted. Skin samples of the thigh from Wistar rats were obtained at various stages of healing after mechanical injury (deep incised wound). Animals were divided into nine groups: a control group of intact rats ($n = 3$) and eight experimental groups corresponding to post-injury time points of 12 hours, 24 hours, 2 days, 3 days, 6 days, 10 days, 15 days, and 25 days ($n = 3$ per group). Tissue fragments were processed for histological and immunohistochemical examination. Antibodies to phosphorylated histone H3 were used to assess proliferation, whereas apoptosis was detected using antibodies to p53 and caspase-3.

RESULTS: Immunopositive cells expressing phosphorylated histone H3, caspase-3, and p53 were identified in cutaneous connective tissue samples in all experimental groups. The proliferation index was determined, and changes in pro-apoptotic protein expression were analyzed in intact skin and the perinecrotic zone at different stages of regeneration. Based on these data, the proliferation to apoptosis ratio and an index characterizing both processes were calculated. The proliferation to apoptosis ratio was highest when proliferation prevailed over cell death (in intact skin and at the final stages of regeneration) and lowest when apoptosis predominated (inflammation and necrosis phases).

CONCLUSION: For the first time, immunohistochemistry with antibodies to phosphorylated histone H3 was used to investigate regeneration in skin wounds. This marker, which is expressed in proliferating cells, in combination with apoptosis markers, allows assessing the proliferation to apoptosis ratio at different stages of regeneration.

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

To cite this article:

Berezovskaya TI, Odintsova IA. Proliferation to Apoptosis Ratio in Cutaneous Connective Tissue Cells During Mechanical Injury Healing in an Experiment. *Morphology*. 2025;163(4):327–338. DOI: 10.17816/morph.677204 EDN: KVVQXI

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

EDN: KVVQXI

皮肤结缔组织细胞在实验性机械创伤愈合过程中增殖与凋亡的比率

Tatyana I. Berezovskaya, Irina A. Odintsova

Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

摘要

论证。创伤愈合过程中一个重要方面是损伤区细胞增殖与凋亡的平衡。特别值得关注的是坏死周边区的再生性组织发生特征，尤其是真皮和皮下组织等结缔组织层。该区域含有上皮和结缔组织的形成层样细胞成分，由此实现再生，而细胞凋亡过程则具有特征性特点。免疫组化方法常用于研究不同形成层潜能组织中的组织发生过程，包括增殖和细胞凋亡。然而，在再生不同阶段如何选择能够反映增殖与凋亡关系的标志物，仍是一个亟待解决的问题。

目的。在机械创伤不同愈合阶段，对皮肤结缔组织细胞的增殖与凋亡进行免疫组化评估，并计算二者的比率。

方法。开展了一项单中心、全面性、对照、随机、非盲的实验研究。作为研究材料，选取Wistar大鼠股部皮肤样本，这些样本来自在造成机械性损伤（深切口创伤）后的不同愈合阶段。动物分为9组：对照组为完整皮肤大鼠（n=3）；实验组为损伤后12 h、24 h、2、3、6、10、15和25天（各组n=3）。制备皮肤切片用于组织学和免疫组化研究。以磷酸化组蛋白H3作为增殖标志物，以p53蛋白和半胱天冬酶-3作为凋亡标志物。

结果。在所有实验组的大鼠皮肤结缔组织中均检测到表达磷酸化组蛋白H3、半胱天冬酶-3和p53的免疫阳性细胞。确定了细胞增殖指数，并分析了在不同再生阶段完整皮肤和坏死周边区促凋亡蛋白的动态表达。在此基础上计算了增殖 - 凋亡比值及其数值指标（指数），用于表征这两种过程。结果显示，增殖 - 凋亡指数在完整皮肤和再生的后期阶段，当增殖过程占优势时达到最高值，而在炎症期和坏死期，当凋亡过程占优势时则处于最低水平。

结论。本研究首次将磷酸化组蛋白H3的免疫组化检测应用于皮肤创伤再生研究。该增殖标志物在增殖细胞中表达，与凋亡标志物结合，可用于评估不同再生阶段的增殖 - 凋亡比率。

关键词：皮肤；真皮；皮下组织；创伤愈合；免疫组化；半胱天冬酶-3；磷酸化组蛋白H3；p53蛋白。

To cite this article:

Berezovskaya TI, Odintsova IA. 皮肤结缔组织细胞在实验性机械创伤愈合过程中增殖与凋亡的比率. *Morphology*. 2025;163(4):327–338. DOI: 10.17816/morph.677204 EDN: KVVQXI

收到: 16.03.2025

接受: 24.05.2025

发布日期: 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 программированной 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 — количественно охарактеризовать соотношение процессов пролиферации и апоптотической гибели клеток в соединительной ткани кожи на разных этапах заживления механической раны.

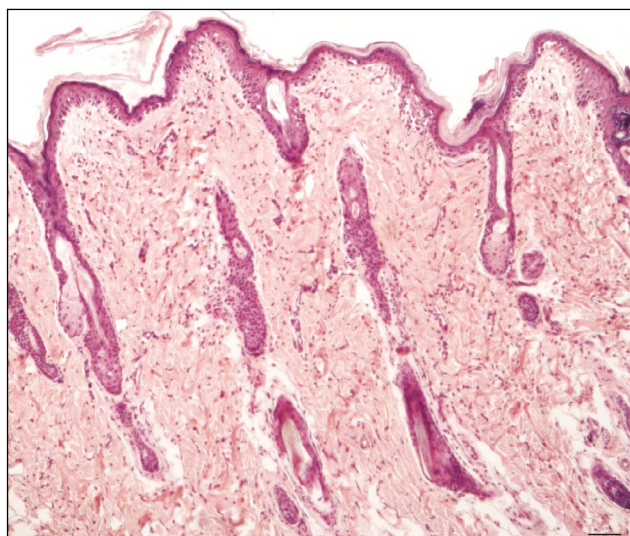


Рис. 1. Интактная кожа бедра крысы: окраска гематоксилином и эозином; объектив $\times 4$, окуляр $\times 10$.

Fig. 1. Intact rat thigh skin: hematoxylin and eosin staining; objective lens $\times 4$, eyepiece lens $\times 10$.

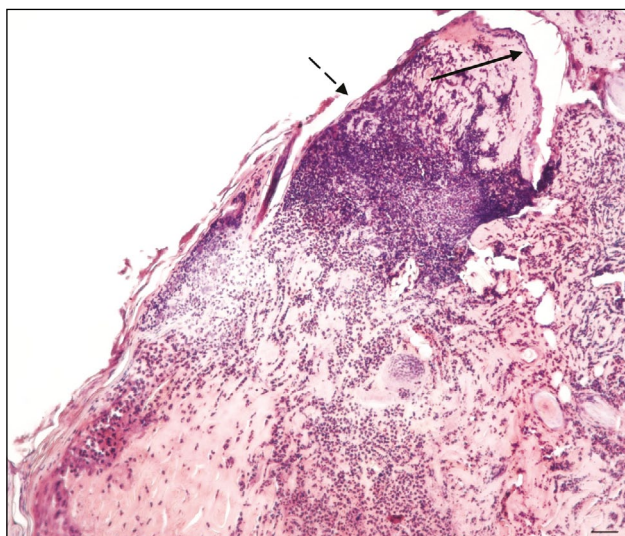


Рис. 2. Кожа бедра крысы спустя 2-е суток после нанесения травмы: чёрная стрелка — раневой канал; пунктирная стрелка — зона первичного некроза; окраска гематоксилином и эозином; объектив $\times 4$, окуляр $\times 10$.

Fig. 2. Rat thigh skin 2 days after injury: black arrow, wound channel; dashed arrow, zone of primary necrosis; hematoxylin and eosin staining; objective lens $\times 4$, eyepiece lens $\times 10$.

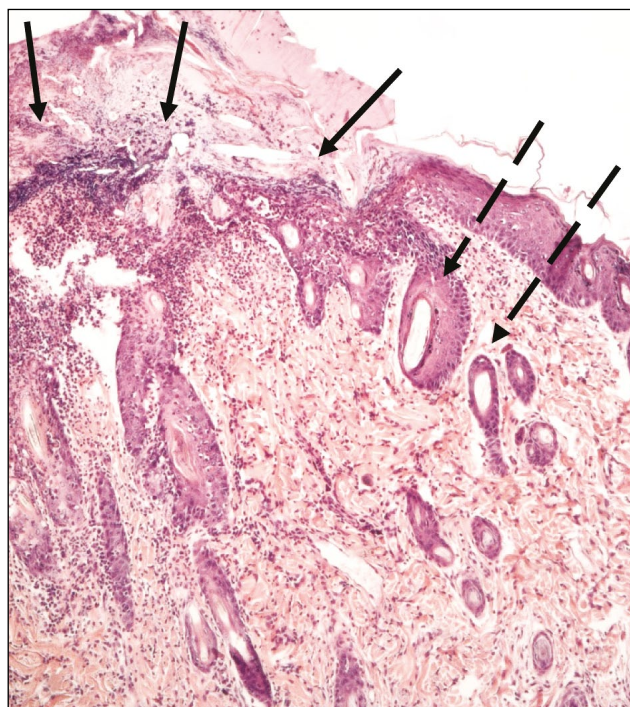


Рис. 3. Кожа бедра крысы спустя 6 суток после нанесения травмы: чёрные стрелки — зона первичного некроза; пунктирные стрелки — перинекротическая область; окраска гематоксилином и эозином; объектив $\times 4$, окуляр $\times 10$.

Fig. 3. Rat thigh skin 6 days after injury: black arrows, zone of primary necrosis; dashed arrows, perinecrotic zone; hematoxylin and eosin staining; objective lens $\times 4$, eyepiece lens $\times 10$.

МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Проведено одноцентровое сплошное контролируемое рандомизированное неослепленное 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

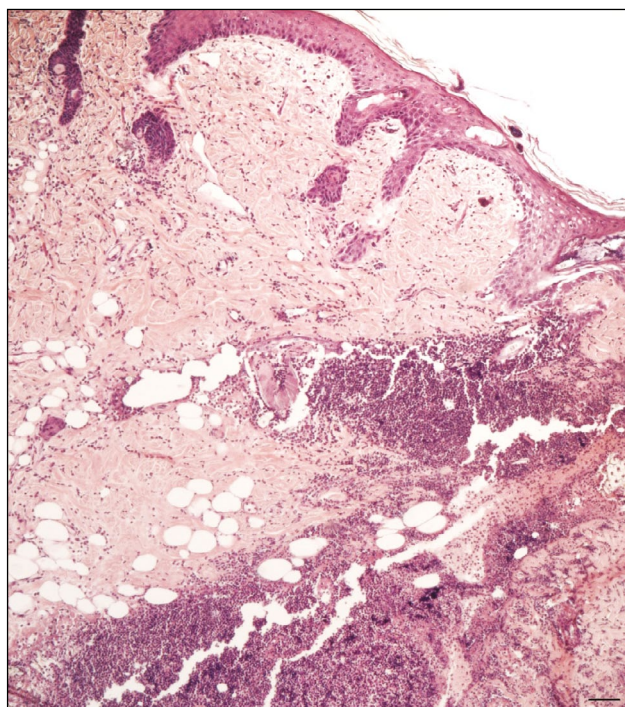


Рис. 4. Кожа бедра крысы спустя 10 суток после нанесения травмы — перинекротическая область: окраска гематоксилином и эозином; объектив $\times 4$, окуляр $\times 10$.

Fig. 4. Rat thigh skin 10 days after injury: perinecrotic zone; hematoxylin and eosin staining; objective lens $\times 4$, eyepiece lens $\times 10$.

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 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 золазепам (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 (кат. № ab14955, Abcam, Великобритания; разведение 1:1200); мышинные моноклональные антитела к белку p53 (кат. № M700129-2, Dako, Дания; клон DO-7, разведение 1:200); кроличьи поликлональные антитела к каспазе 3 (кат. № 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 депарафинизировали 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 °C 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 °C, 30–40 мин, после чего препараты снова промывали в PBS;
- наносили рабочий раствор 3,3-диаминобензидин-тетрагидрохлорида (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-позитивных клеток). Числовые данные

заношили 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 размер 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 — $2,8 \pm 2,9$ клетки; к белку p53 — $3,4 \pm 2,5$ клетки. После механической травмы уже через 12 часов наблюдается повышение количества таких клеток. Первой пиковых 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

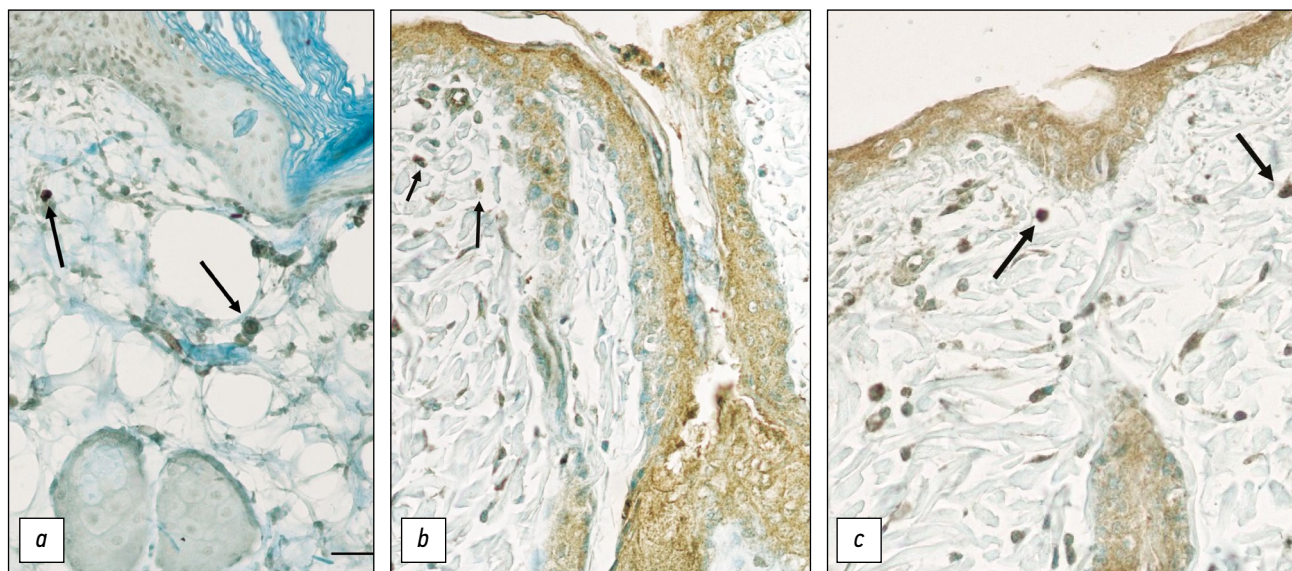


Рис. 5. Кожа бедра крысы спустя 6 суток после нанесения травмы — перинекротическая область: а — иммуногистохимическая реакция с антителами к фосфогистону H3; б — иммуногистохимическая реакция с антителами к каспазе 3; в — иммуногистохимическая реакция с антителами к p53. Стрелками указаны иммуноположительные клетки; объектив $\times 40$, окуляр $\times 10$.

Fig. 5. Rat thigh skin 6 days after injury, perinecrotic zone: a, immunohistochemistry with antibodies to phospho-histone H3; b, immunohistochemistry with antibodies to caspase-3; c, immunohistochemistry with antibodies to p53. Arrows indicate immunopositive cells; objective lens $\times 40$, eyepiece lens $\times 10$.

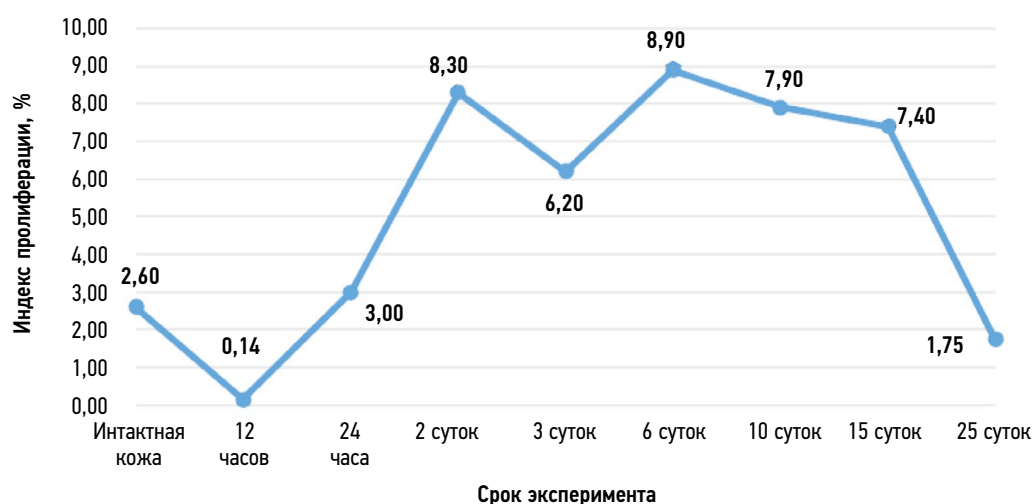


Рис. 6. Динамика индекса пролиферации клеток соединительных тканей кожи в перинекротической области в зависимости от фазы раневого процесса.

Fig. 6. Changes in the proliferation to apoptosis ratio of cutaneous connective tissue cells in the perinecrotic zone depending on the wound healing phase.

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 полей 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. 8) комплексно отражает соотношение делящихся и гибнущих клеток в исследуемой ткани. Наименьшее значение ПАИ является следствием высокого уровня апоптоза

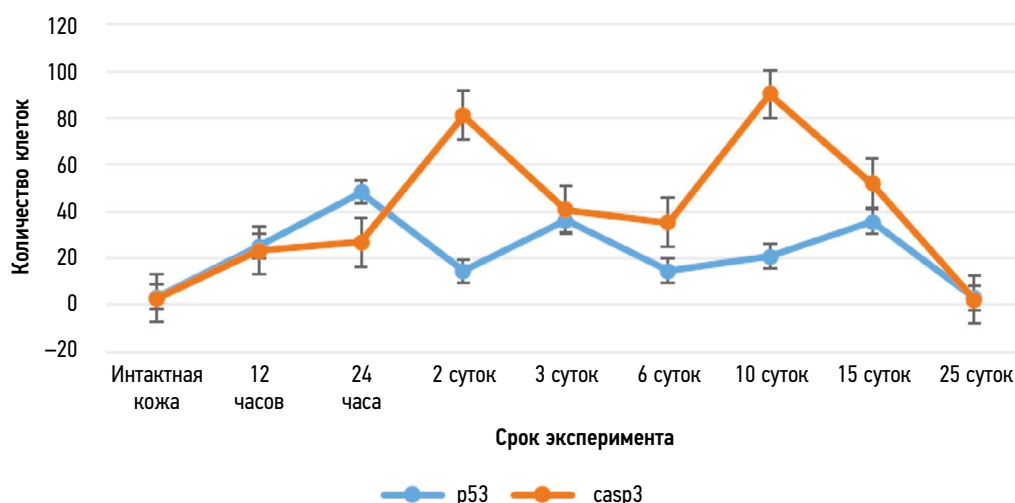


Рис. 7. Динамика количества клеток, экспрессирующих белок p53 и каспазу 3 (casp 3) в зависимости от фазы раневого процесса.

Fig. 7. Changes in the number of cells expressing p53 and caspase-3 (casp 3) depending on the wound healing phase.

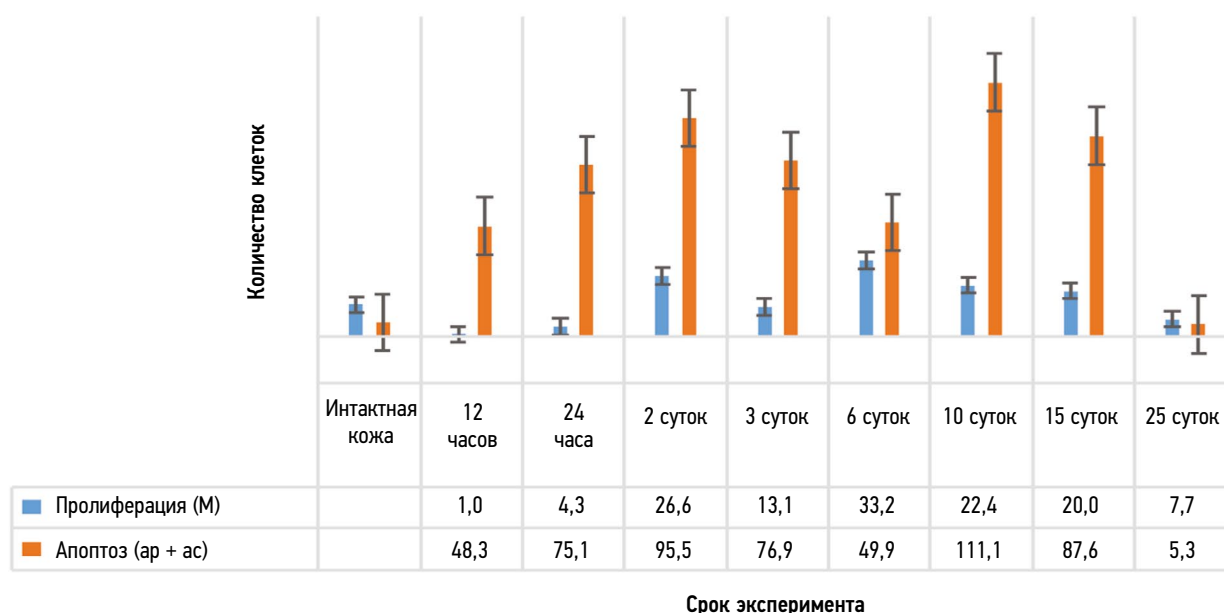


Рис. 8. Динамика количества пролиферирующих и гибнущих клеток в разные сроки после травмы кожи.

Fig. 8. Changes in the number of proliferating and dying cells at different time points after skin injury.

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 увеличивается и достигает наибольшего значения через 6 суток после травмы, тогда как на 10 и 15 сутки ПАИ снова снижается 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.

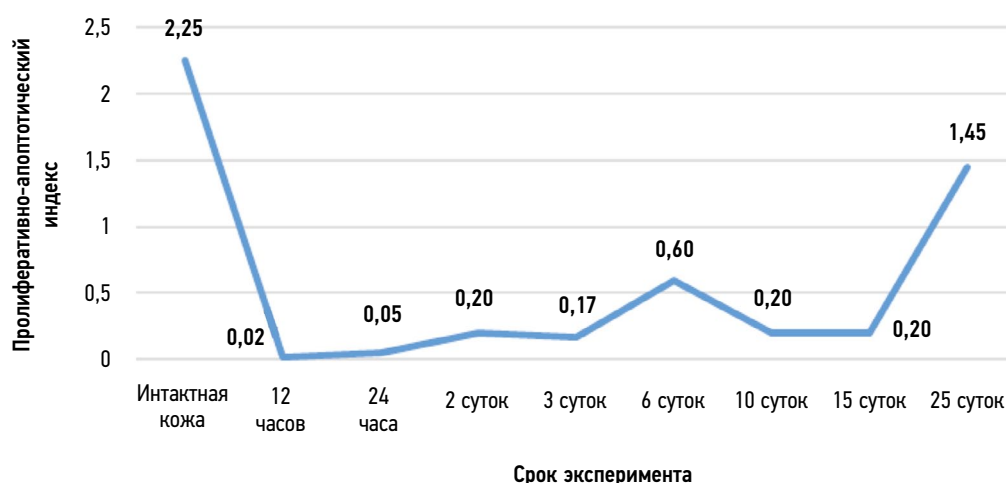


Рис. 9. Динамика пролиферативно-апоптотического индекса в зависимости от фазы раневого процесса.

Fig. 9. Changes in the proliferation to apoptosis ratio depending on the wound healing phase.

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. 9). 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: conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, resources, validation, visualization, writing—original draft, writing—review & editing;

I.A. Odintsova: supervision, project administration, methodology, conceptualization, validation. All the authors approved the version of the manuscript to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Ethics approval: Experimental animal housing complied with the principles of bioethics and the “Rules for Working with Experimental Animals” (Declaration of Helsinki, 2000), the Federal Law of the Russian Federation “On the Protection of Animals from Cruelty” (Chapter V, Article 104679-GD, December 1, 1999), Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 267 of June 19, 2003, and Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 199n of April 1, 2016, “On Approval of the Rules of Good Laboratory Practice.” The study protocol was approved by the Independent Local Ethics Committee of the S.M. Kirov Military Medical Academy. Extract from the minutes of the meeting of the Local Ethics Committee (Minutes No. 283, dated October 17, 2023).

Funding sources: No funding.

Disclosure of interests: The authors have no relationships, activities, or interests for the last three years related to for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

Statement of originality: No previously obtained or published material (text, images, or data) was used in this study or article.

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

Generative AI: No generative artificial intelligence technologies were used to prepare this article.

Provenance and peer review: This paper was submitted unsolicited and reviewed following the standard procedure. The peer review process involved two external reviewers, a member of the Editorial Board, and the in-house scientific editor.

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, Uruskanova, 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. Korzhevskii DE, Kirik OV, Petrova ES, et al. *Theoretical foundations and practical applications of immunohistochemical methods: A guide*. Saint Petersburg: SpetsLit; 2014. (In Russ.) EDN: SINQMT 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 cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) in osteosarcoma. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018;1864(5 Pt A):1573–1582. doi: 10.1016/j.bbdis.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: PUMEV1

17. Danilov RK. The doctrine of tissue cambiality as a histogenetic basis for understanding the mechanisms of the wound process. In: *Morphology issues of the 21st century*. Saint Petersburg: DEAN; 2010. P:34–38 ISBN: 978-5-93630-792-8

ОБ АВТОРАХ

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

Одинцова Ирина Алексеевна, д-р мед. наук, профессор;

ORCID: 0000-0002-0143-7402;

eLibrary SPIN: 1523-8394;

e-mail: odintsova-irina@mail.ru

AUTHORS' INFO

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

Odintsova Irina Alekseevna, Dr. Sci. (Medicine), Professor;

ORCID: 0000-0002-0143-7402;

eLibrary SPIN: 1523-8394;

e-mail: odintsova-irina@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author