

Структурные и ультраструктурные особенности раннего повреждения тканей кожи при местном лучевом воздействии в высокой дозе

Р.В. Деев^{1,2}, П.С. Еремин³, И.А. Чекмарева⁴, В.Г. Лебедев⁵, Ю.Б. Дешевой⁵, Т.А. Насонова⁵, Б.Б. Мороз⁵

¹ ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² ПАО Институт стволовых клеток человека, Москва, Россия

³ ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии Минздрава России, Москва, Россия

⁴ ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр хирургии имени А.В. Вишневского Минздрава России, Москва, Россия

⁵ ФГБУ ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

Введение. Проблема исследования патоморфогенеза местных лучевых повреждений сохраняет актуальность в связи с развитием в широкой медицинской практике лучевых методов диагностики и терапии. **Материалы и методы.** Проведено изучение структурных и ультраструктурных особенностей воздействия на кожу ионизирующей радиации в высокой дозе (110 Гр, рентгеновское излучение) на ранних сроках повреждения – 3-и, 8-е и 14-е сутки. Исследование выполнено на крысах, которые получали однократное облучение кожи спины при помощи рентгеновского аппарата ЛНК-268 (РАП 100-10) (Россия). Морфологическое исследование включало световую микроскопию (окрашивание гематоксилином и эозином), исследование полутонких срезов (окрашивание толуидиновым синим) и трансмиссионную электронную микроскопию биоптатов.

Результаты. Выявлено, что уже на 3-и сутки вне зависимости от клинических проявлений в области воздействия лучевой энергии имеются формирующий субэпидермальный отек, межклеточный отек и нарушение контактов в эпителиальном пласте, повреждение митохондрий кератиноцитов и гистиоцитов дермы. Указанные признаки нарастают к 8-м и 14-м суткам, что приводит к гибели тканей как в эпицентре облучения, так и на периферии. На 8–14-е сутки отмечали повреждение эндотелиоцитов кровеносных сосудов, основным из которых является гибель митохондрий. Морфометрические данные свидетельствуют о нарастающем отеке эпидермиса вплоть до его десквамации к 14-м суткам и увеличении «общей клеточности» за счет различных форм лейкоцитов в сосочковом и сетчатом слоях дермы в указанный период наблюдений.

Заключение. Локальное облучение в дозе 110 Гр приводит к необратимым изменениям в изученных клетках, их некрозу в течение двух недель и к созданию таким образом предпосылок к язвообразованию в более поздний период.

Ключевые слова: лучевая язва, повреждение, кожа, клеточная гибель, ультраструктура

Для корреспонденции: Роман Вадимович Деев. E-mail: romdey@gmail.com

Для цитирования: Деев Р.В., Еремин П.С., Чекмарева И.А., Лебедев В.Г., Дешевой Ю.Б., Насонова Т.А., Мороз Б.Б. Структурные и ультраструктурные особенности раннего повреждения тканей кожи при местном лучевом воздействии в высокой дозе. Клини. эксп. морфология. 2021;10(3):55–64. DOI: 10.31088/CEM2021.10.3.55-64.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 15.12.2020. Получена после рецензирования 25.01.2021. Принята в печать 11.02.2021.

Structural and ultrastructural features of early skin damage after local high-dose radiation exposure

R. V. Deev^{1,2}, P. S. Eremin³, I. A. Chekmareva⁴, V. G. Lebedev⁵, Yu. B. Deshevoy⁵, T. A. Nasonova⁵, B. B. Moroz⁵

¹ I. I. Mechnikov North-Western State Medical University, Saint Petersburg, Russia

² Human Stem Cells Institute, Moscow, Russia

³ National Medical Research Center of Rehabilitation and Balneology, Moscow, Russia

⁴ A. V. Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery, Moscow, Russia

⁵ A. I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Introduction. Research on skin radiation injury remains topical due to the development of X-ray diagnosis and therapy in medical practice.

Materials and methods. We studied structural and ultrastructural features of high-dose ionizing radiation exposure to the skin (110 Gy, X-ray) at early stages of damage (days 3, 8, and 14). The study was conducted on Wistar rats (N=39) that were exposed to a single irradiation on the interscapular skin region with an LNK-268 (RAP 100-10) X-ray machine (Russia). To analyze the morphologic changes, light (hematoxylin and eosin stain and toluidine blue stain) and transmission electron microscopy were used.

Results. Regardless of clinical manifestations on day 3, subepidermal edema, intercellular edema and epithelial layer contact disruption, mitochondria damage to the keratinocytes, and dermal histiocytes developed in the area of radiation exposure. These signs intensified by days 8 and 14, leading to tissue death both at the central and peripheral parts of irradiation. On days 8-14, damage to the vascular endothelial cells became noticeable, the mitochondrial death being the major one. Morphometric data indicate an increase both in the epidermis edema up to its desquamation by day 14 and in total cellularity due to various forms of leukocytes in the papillary and reticular dermis.

Conclusion. Local 110-Gy irradiation leads to irreversible changes in the cells and their necrosis within two weeks that may result in ulcer formation later in life.

Keywords: radiation ulcer, damage, skin, cell death, ultrastructure

Corresponding author: Roman V. Deev. E-mail: romdey@gmail.com

For citation: Deev R.V., Eremin P.S., Chekmareva I.A., Lebedev V.G., Deshevoy Yu.B., Nasonova T.A., Moroz B.B. Structural and ultrastructural features of early skin damage after local high-dose radiation exposure. Clin. exp. morphology. 2021;10(3):55-64. DOI: 10.31088/CEM2021.10.3.55-64 (In Russ.).

Funding. The study was carried out within the framework of state budget funding.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 15.12.2020. **Received in revised form** 25.01.2021. **Accepted** 11.02.2021.

Введение

Проблеме реактивности, особенностям гибели и восстановления покровных тканей млекопитающих и человека под воздействием различных видов ионизирующих излучений (ИИ) посвящен целый пласт литературы [1-4]. Вместе с тем нельзя не отметить, что в последние десятилетия был выдвинут ряд научно-теоретических обобщений, позволяющих детализировать клеточные и тканевые закономерности повреждения и восстановления, такие как учения о раневом процессе, о гистогенезе и клеточно-дифференной организации [5, 6].

Несмотря на существующую систему профилактики поражения человека ионизирующими излучениями в мирное время, ежегодно на лечение в профильные специализированные медицинские учреждения поступает много пациентов [4, 7]. Существенную долю среди всех облученных составляют имеющие местные лучевые поражения (МЛП) как ятрогенного, так и неятрогенного генеза. Высказано обоснованное мнение, что хуже всего изучены самые тяжелые формы МЛП – лучевые некрозы [3]. Разработка и внедрение новых, в том числе биотехнологических, методов лечения МЛП нуждаются в современной качественной модели, а также надлежащей морфологической характеристике ранних и поздних процессов, развивающихся в коже в связи с локальным облучением в высокой дозе [7].

Цель исследования – структурная и ультраструктурная характеристика тканей кожи у лабораторных животных (крыс) в ранние сроки (3-и, 8-е, 14-е сутки) после моделирования МЛП в дозе, вызывающей формирование хронических лучевых язв (110 Гр).

Материалы и методы

Моделирование местного лучевого поражения

Воспроизведение длительно незаживающего лучевого дефекта покровов осуществляли у лабораторных животных (крыс) по ранее описанной методике [7]. В эксперимент включали самцов породы Вистар массой 180-200 граммов (общее число животных – 39). При помощи рентгеновского аппарата ЛНК-268 (РАП 100-10) (Россия) воспроизводили модель тяжелых незаживающих МЛП кожи спины. Дозиметрические характеристики исследовали посредством тканеэквивалентного фантома, состоящего из тонких термолюминесцентных детекторов ТТЛД-580 и прокладок из фторопласта общей толщиной 30 мм, помещенных в плексигласовый цилиндр. Животных облучали в течение 380 секунд до достижения дозы на поверхности кожи 110 Гр (мощность дозы 17,5 Гр/мин.).

При работе неукоснительно соблюдали положения Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях [8]. Эксперимент одобрен этическим комитетом ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России (протокол № 1 от 20 июня 2012 года).

Взятие материала и его фиксация

После выведения животных из эксперимента (передозировка эфирного наркоза) получали лоскуты кожи в пределах области облучения общей площадью 3×3 см с захватом фасции. Полученный лоскут фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина.

Для трансмиссионной электронной микроскопии вырезали участки кожи размером 1,5×1,5 мм, включающие эпидермис и дерму. При этом кусочки брали

как из центральной части зоны облучения, так и из периферической. Материал немедленно фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида и в тот же день доставляли в лабораторию для последующей обработки.

Гистологические исследования

Стандартная гистологическая обработка включала проводку, изготовление парафиновых блоков, гистологических срезов толщиной 5–7 мкм, окрашивание гематоксилином и эозином. Препараты изучали в световом микроскопе Leica DM1000 (Германия). Оценивали ряд морфометрических параметров – среднюю толщину эпидермиса, среднюю толщину дермы, среднюю толщину кожной мышцы, среднее количество кератиноцитов в вертикальной колонке эпидермиса, общую клеточность в сосочковом слое дермы, общую клеточность в сетчатом слое дермы. Общую клеточность считали отдельно в центральных и периферических участках тканевого образца, а также отдельно в субэпидермальной части. Под клеточностью понимали среднее количество ядродержащих клеток в поле зрения при иммерсионном увеличении ($\times 1000$). Подсчеты проводили не менее чем в 12 полях зрения.

Электронномикроскопические исследования

После доставки в лабораторию материал дофиксировали четырехокисью осмия и подвергали стандартной пробоподготовке с заливкой в аралдитовую смолу. Полутонкие срезы толщиной 1,5–2 мкм окрашивали толудиновым синим. Ультратонкие срезы толщиной 100–200 нм получали на ультрамикротоме фирмы LKB (Швеция), срезы контрастировали уранил ацетатом и цитратом свинца. Ультраструктурное изучение препаратов проводили при помощи электронного микроскопа JEM 100-CX (JEOL, Япония) в трансмиссионном режиме при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Результаты

Феноменология изменений, происходящих в тканях после местного облучения в дозе 110 Гр, включает последовательную смену событий повреждения клеток, межклеточного вещества и сосудов; гибель необратимо поврежденных элементов, транзиторные реактивные изменения обратимо поврежденных клеток. На более поздних сроках за этим следуют процессы восстановления.

3 суток после повреждения

Эпидермис. В центральной части эпителиальный пласт выглядит поврежденным даже на световом уровне. Детектируются признаки субэпидермального отека – под базальной мембраной сформированы неправильной формы полости с трансудатом и единичными блуждающими клеточными элементами типа гистиоцитов. Базальная мембрана частично разрушена. Под ней – фрагментированные разнонаправленные

пучки коллагеновых волокон. Базальные кератиноциты в основном имели крупные округлые ядра с гомогенной или мелкозернистой нуклеоплазмой низкой электронной плотности (рис. 1). В некоторых случаях ядро окружено электронносветлым перинуклеарным пояском; цитоплазма вакуолизирована. В кератиноцитах вышележащих слоев существенные признаки повреждения не выявлены.

При исследовании ультраструктуры кератиноцитов установлено, что обнаруживаемый перинуклеарный поясок обусловлен расширением перинуклеарного пространства и тотальным повреждением митохондрий, то есть видимые на светооптическом уровне вакуоли являются митохондриями с полностью разрушенной, фрагментированной или лизированной внутренней мембраной и кристами. В большинстве случаев также повреждена и наружная мембрана органоида. Указанные находки характерны не только для клеток базального слоя – они встречаются и в вышележащих слоях (рис. 1).

На расстоянии 1,2–1,5 см от центра зоны облучения в целом происходят похожие события, однако с меньшей степенью выраженности. Для этих участков характерно мозаичное повреждение кератиноцитов с тенденцией к затуханию в центробежном направлении. На светооптическом уровне они проявляются появлением оптически пустых вакуолей вокруг ядер и некоторым расширением пространств между контактами клеток шиповатого слоя.

Дерма. При изучении в световом микроскопе выраженные структурные изменения со стороны межклеточного вещества дермы, в частности волокна центрального вещества, не выявлены. Следует констатировать большую лабильность показателя общей клеточности в сосочковом слое, что объясняется конституционально высоким количеством кровеносных сосудов в этой области. Различия выявлены для количества клеток в центральном и периферических участках сосочкового слоя. Клеточный состав относительно брадитрофного сетчатого слоя остается практически неизменным в количественном выражении (табл.).

Определено, что средняя толщина дермы в центральном участке больше, чем на периферии, что объясняется выраженностью отека в данном участке.

При исследовании ультраструктуры клеток фибробластического ряда зарегистрированы в основном обратимые изменения органелл. Одновременно с этим наблюдали полное или частичное разрушение энергообеспечивающих органелл. Изменения включали весь диапазон – от просветления матрикса и фрагментации крист митохондрий до множественных разрывов наружной мембраны.

На периферии пораженного участка кожи грубые повреждения волокнистой основы дермы в большинстве участков также не выявлены.

Кожная мышца. Через 3 дня после облучения существенные изменения в структуре мышечной ткани

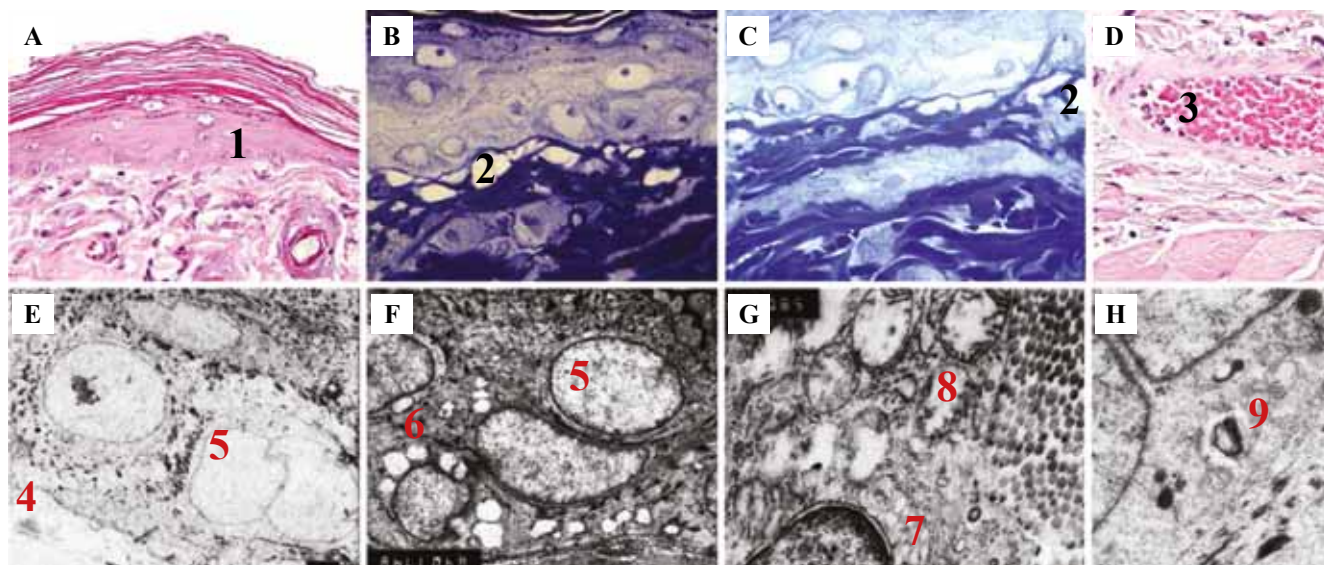


Рис. 1. Кожа экспериментальных животных через 3 суток после однократного облучения.

А–С – эпидермис и поверхностный слой дермы, D – кровеносный сосуд в дерме с активированным эндотелием и краевым стоянием лейкоцитов, E–G – ультраструктура кератиноцитов базального слоя эпидермиса (F – фрагмент рис. 1 E), H – ультраструктура фибробласта дермы. 1 – просветление ядер и фрагментация гетерохроматина в базальных кератиноцитах; 2 – субэпидермальный (вакуолизация) отек; 3 – активация эндотелиоцитов, мобилизация лейкоцитов; 4 – отежная базальная мембрана; 5 – тотальное просветление ядер базальных кератиноцитов и появление в них глубоких инцизур; 6 – перинуклеарное накопление митохондрий с разрушенными кристами и просветленным матриксом; 7 – расширение перинуклеарного пространства фибробласта; 8 – митохондрии с разрушенными кристами, растворенной внутренней мембраной и частично просветленным матриксом; 9 – миелиноподобная структура в цитоплазме кератиноцита. А, D – световая микроскопия, B, C – полутонкие срезы, E–H – трансмиссионная электронная микроскопия. Окрашивание: А, D – гематоксилин и эозин, B, C – толуидиновый синий.
А, D $\times 250$, B, C $\times 800$, E $\times 5900$, F $\times 8900$, G $\times 23\ 000$, H $\times 24\ 000$

Fig. 1. Skin tissue on day 3 after a single exposure irradiation.

A–C – epidermis and superficial dermis, D – blood vessel in the dermis with activated endothelium and leukocyte margination, E–G – ultrastructure of the epidermis basal layer keratinocyte (F – fragment of Fig. 1 E), H – dermal fibroblast ultrastructure. 1 – nuclei clearing and heterochromatin fragmentation in basal keratinocytes; 2 – subepidermal edema (vacuolization); 3 – endothelial cell activation, leukocyte mobilization; 4 – edematous basement membrane; 5 – total clearing of the basal keratinocyte nuclei and the deep incisures in them; 6 – perinuclear accumulation of mitochondria with destroyed cristae and a cleared matrix; 7 – expansion of the fibroblast perinuclear space; 8 – mitochondria with destroyed cristae, a dissolved inner membrane, and a partially cleared matrix; 9 – myelin-like structure in the keratinocyte cytoplasm. A, D – light microscopy, B, C – semifine sections, E–H – transmission electron microscopy (TEM). A, D – H&E stain, B, C – toluidine blue stain.
A, D $\times 250$, B, C $\times 800$, E $\times 5900$, F $\times 8900$, G $\times 23\ 000$, H $\times 24\ 000$

в проекции центрального участка фрагмента кожи не выявлены. Признаки отека, дисконфлексии мышечных волокон не обнаружены. Тинкториальные свойства не изменены.

Обращает внимание состояние мелких кровеносных сосудов в составе мышцы – в основном в них обнаружен сладж эритроцитов. На полутонких срезах и срезах с парафиновых блоков следует констатировать явление плазмаконцентрации (гиалиновые тромбы). Однако эритроцитарные или фибриновые тромбы не формируются, что на данном сроке позволяет говорить преимущественно о функциональном нарушении микроциркуляции в кожной мышце. Периферические участки препаратов также включают интактную, по данным световой микроскопии, мышцу.

Подкожная жировая клетчатка и кровеносные сосуды. Заметным изменением явилось излитие капель

жира за пределы адипоцитов в центральном участке поврежденной кожи. Жировые капли внутри клеток существенно уменьшены в размерах, часто составляя около 10–25% от предсуществовавшего объема. Нередки адипоциты, полностью лишенные жира. В некоторых полях зрения имеются свободные капли жира в межклеточном пространстве.

На ультратонких срезах можно различить эндотелиоциты со светлой и темной цитоплазмой. Наряду с этим обнаруживаются участки с десквамированными эндотелиоцитами и оголенным субэндотелиальным слоем; признаками плазмаконцентрации. Гетероморфные изменения эндотелиоцитов отчетливо выявляются в центральных участках местного лучевого поражения. Несмотря на то, что через 3 суток после воздействия явные признаки гибели эндотелия, его десквамации и следующих за этим тромбозов не отме-

**Морфометрическая характеристика кожи животных после местного лучевого поражения в дозе 110 Гр |
Morphometric characteristics of animal skin after 110-Gy local radiation exposure**

Параметр Indicator	3-и сутки Day 3		8-е сутки Day 8		14-е сутки Day 14	
	центральная часть central part	периферическая часть peripheral part	центральная часть central part	периферическая часть peripheral part	центральная часть central part	периферическая часть peripheral part
Средняя толщина эпидермиса, мкм Mean epidermis thickness, μm	32,3 \pm 0,7	32 \pm 5	33,8 \pm 11,5	23,7 \pm 3,7	–	32,7 \pm 3
Средняя толщина дермы, мкм Mean dermis thickness, μm	1140 \pm 82,4	739 \pm 101	1067 \pm 138	795 \pm 38	1488 \pm 211	1323 \pm 100
Средняя толщина кожной мышцы, мкм Mean cutaneous muscle thickness, μm	320 \pm 54,7	272,5 \pm 47	238,4 \pm 25	197 \pm 31	–	240 \pm 36,2
Общая клеточность в сосочковом слое (клеток в поле зрения) Total cellularity of papillary dermis (cells per field of view)	25,6 \pm 13	17,3 \pm 5,5	30,6 \pm 11,6	21,9 \pm 8,8	–	24 \pm 9,4
Общая клеточность в сетчатом слое (клеток в поле зрения) Total cellularity of reticular dermis (cells per field of view)	14,4 \pm 6	13,4 \pm 6,2	14,5 \pm 6	13,3 \pm 4,8	24 \pm 5,4	26 \pm 6,8

чены, выраженные реактивные изменения приводят к сладжу эритроцитов и нарушению микроциркуляции в коже.

На периферии выявлены периваскулярные отеки. Эндотелиоциты выступают в просвет сосуда, мембрана люминальной поверхности с неровным рельефом, множеством отростков, которые увеличивают свободную поверхность клеток, а при соединении цитоплазматических отростков и формировании везикул усиливается трансэндотелиальный транспорт.

На полутонких срезах следует констатировать большое (больше обычного) содержание гранулярных лейкоцитов и макрофагов с реактивно измененными ядрами; часто они находятся в непосредственном контакте с сосудистой стенкой – адгезированы к эндотелию.

8 суток после повреждения

Через 8 суток в эпицентре облучения детектируются признаки гибели тканей кожи. Преимущественными процессами становятся десквамация эпителия, лейкоцитарная инфильтрация погибших и погибающих

тканей, а также миграция блуждающих клеточных элементов стромально-мезенхимального генеза; разрушение коллагенового остова дермы.

Эпидермис. Макроскопически зона повреждения гиперемирована, местами покрыта полупрозрачными корками. Субэпидермальную трансудация приводит к отслаиванию больших по площади эпителиальных лоскутов. Обращает на себя внимание то, что субэпидермальные полости с прозрачным содержимым сливаются в обширные цистерны, роль крышек которых выполняет погибший и частично отслоившийся эпидермис. В цистернах обнаружены разнообразные клеточные элементы, включая гистиоциты.

Эпидермис с признаками дисконфлексии кератиноцитов. Вокруг ядер – просветленный пояс, включавший в основном погибшие митохондрии. В некоторых клетках – жировые капли. В качестве редких находок обнаружена вакуолизация ядер (рис. 2).

На периферии существенные различия по сравнению с центральными участками выявить не удалось. К данному сроку наблюдения проявляется мозаичность

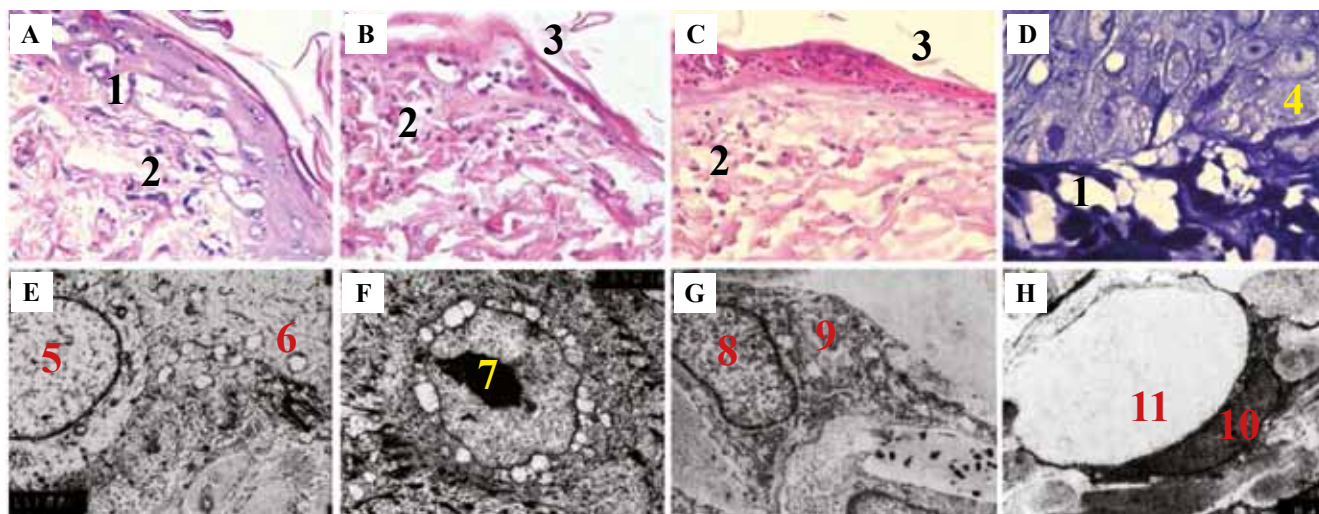


Рис. 2. Кожа экспериментальных животных через 8 суток после однократного облучения.

А–D – эпидермис и поверхностный слой дермы, E, F – ультраструктура кератиноцитов базального слоя эпидермиса, G, H – ультраструктура фибробластов дермы. 1 – субэпидермальные вакуоли (отек); 2 – лейкоцитарная инфильтрация сосочкового слоя дермы; 3 – формирование струпа на месте погибшего эпидермиса; 4 – субтотальная вакуолизация кератиноцитов; 5 – просветление ядра базального кератиноцита; 6 – митохондрии с разрушенными кристами, растворенной внутренней мембраной и просветленным матриксом; 7 – электронноплотное ядрышко; 8 – гомогенизация хроматина фибробласта дермы; 9 – фрагментация мембранных ультраструктур; 10 – уплощенное, сдавленное ядро фибробласта; 11 – крупная вакуоль. А–С – световая микроскопия, D – полутонкий срез, E–H – трансмиссионная электронная микроскопия. Окрашивание: А–С – гематоксилин и эозин, D – толуидиновый синий. А–С $\times 250$, D $\times 1000$, E $\times 12\,000$, F $\times 8900$, G $\times 12\,000$, H $\times 8900$

Fig. 2. Skin tissue on day 8 after single exposure irradiation.

A–D – epidermis and superficial dermis, E, F – ultrastructure of the basal epidermis layer keratinocyte, G, H – dermal fibroblast ultrastructure. 1 – subepidermal vacuoles (edema); 2 – leukocyte infiltration in the papillary dermis; 3 – scab formation at the dead epidermis site; 4 – subtotal vacuolization of keratinocytes; 5 – basal keratinocyte nuclei clearing; 6 – mitochondria with destroyed cristae, dissolved inner membrane, and a cleared matrix; 7 – electron-dense nucleolus; 8 – chromatin homogenization in a dermal fibroblast; 9 – membrane ultrastructure fragmentation; 10 – flattened, compressed fibroblast nucleus; 11 – large vacuole. A–C – light microscopy, D – semi-fine sections, E–H – TEM. A–C – H&E stain, D – toluidine blue stain. A–C $\times 250$, D $\times 1000$, E $\times 12\,000$, F $\times 8900$, G $\times 12\,000$; H $\times 8900$

повреждений, которые в ряде случаев по выраженности деструкции не уступают эпицентру.

Дерма. На светооптическом уровне при сравнении с дермой на предыдущем сроке после повреждения отмечаются фрагментация коллагеновых волокон, отек и полиморфноядерная лейкоцитарная инфильтрация. Морфометрически через 8 суток была выявлена лишь та же тенденция, что и через 3 суток: утолщение дермы в центральных участках по сравнению с периферией, что, вероятно, является следствием более выраженного отека.

Необычной находкой стали «перстневидные клетки» в дерме. При электронной микроскопии они выглядят как одиночные округлые или полигональные клетки, чье серповидно деформированное ядро с электронноплотным мелкодисперсным хроматином оттеснено к одному из полюсов. В ободке цитоплазмы в некоторых случаях можно обнаружить поврежденные митохондрии. Большой объем клетки занят вакуолью, заполненной электроннопрозрачным содержимым (рис. 2).

Кожная мышца, подкожная жировая клетчатка и кровеносные сосуды. Признаки повреждения про-

являются отеком, разобщающим мышечные волокна. Обнаруживаются локальные коагуляционные некрозы по ходу миофибрилл. При этом поперечная исчерченность сохранена.

В подкожной жировой клетчатке сохраняется выраженный отек. В остальном описанные ранее признаки повреждения адипоцитов сохранены. Отмечена имбиция свободным жиром тканей дермы и кожной мышцы.

Кровеносные сосуды, как правило, расширены, без признаков тромбоза или сладжа, характерно полнокровие. В просветах сосудов часто обнаруживается рыхлая сеть фибрина, большое количество полиморфноядерных лейкоцитов. Сосудистая стенка разволокнена, ее слои разобщены отеком. Эндотелиоциты, как правило, в обычном состоянии, без ярких признаков реактивных изменений, межклеточные контакты сохранены.

14 суток после повреждения

Толщина центральной и периферической части дермы на 14-е сутки после облучения значительно увеличена – 1488 ± 211 и 1323 ± 100 мкм, соответственно, по сравнению с предыдущим сроком исследования

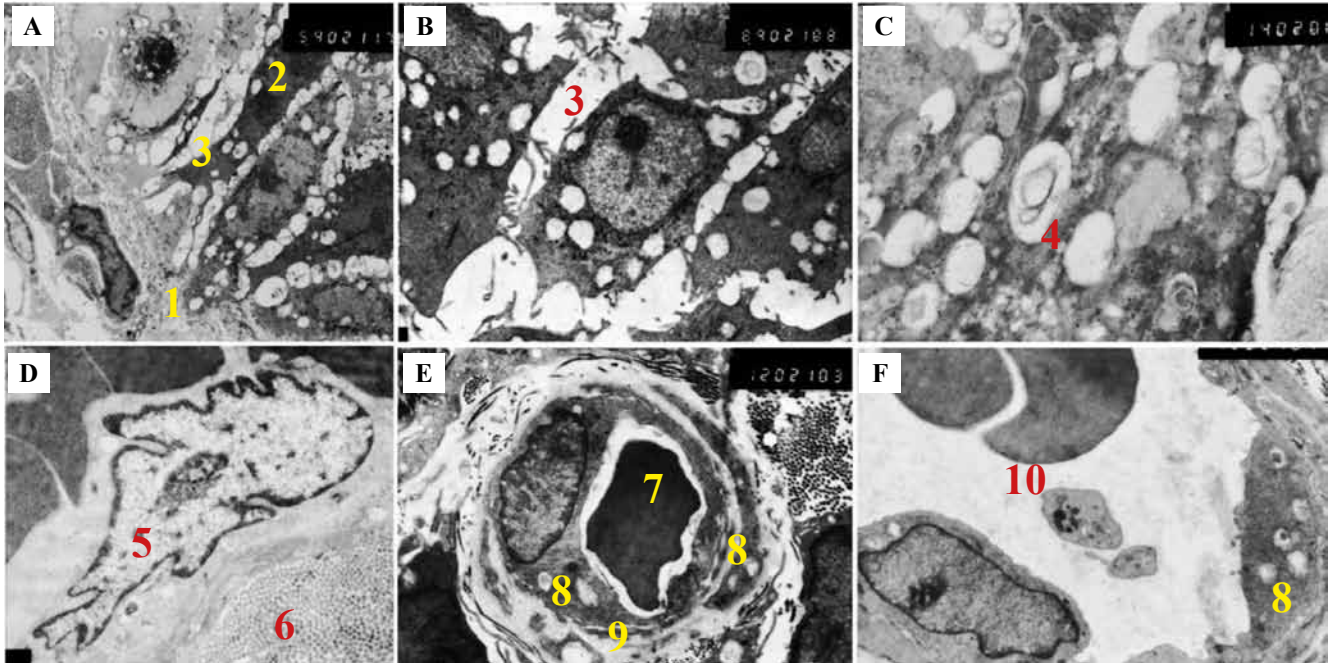


Рис. 3. Кожа экспериментальных животных через 14 суток после однократного облучения. А, В – кератиноциты, С – фрагмент цитоплазмы фибробласта дермы, D–F – эндотелий и периваскулярные структуры. 1 – отек базальной мембраны; 2 – деформированные вакуолизированные кератиноциты; 3 – расширение межклеточных контактов; 4 – внутрицитоплазматические вакуоли и миелиноподобные структуры в фибробласте дермы; 5 – эндотелиоцит с реактивно измененным ядром; 6 – коллагеновые волокна в дерме; 7 – эритроцит в просвете капилляра; 8 – вакуоли в цитоплазме эндотелиоцита и перицита; 9 – отек периваскулярного пространства; 10 – эритроциты и тромбоциты в просвете сосуда. Электроннограммы: А ×5900, В ×8900, С ×9000, D ×8000, E ×9000

Fig. 3. Skin tissue on day 14 after single exposure irradiation.

A, B – keratinocytes, C – cytoplasm fragment of the dermal fibroblast, D–F – endothelium and perivascular structures. 1 – basement membrane edema; 2 – deformed vacuolated keratinocytes; 3 – intercellular contact expansion; 4 – intracytoplasmic vacuoles and myelin-like structures in the dermal fibroblast; 5 – reactively altered nucleus in an endotheliocyte; 6 – dermal collagen fibers; 7 – erythrocyte in the capillary lumen; 8 – cytoplasmic vacuoles in the endothelial cells and pericytes; 9 – perivascular space edema; 10 – erythrocytes and platelets in the vessel. TEM. A ×5900, B ×8900, C ×9000, D ×8000, E ×9000

(1067±138 и 795±38 мкм, соответственно). Эпителий некротизируется уже к середине второй недели после облучения. Дерма кожи погибает позже, не сразу на всю глубину зоны острого лучевого некроза. Гибель ее происходит поэтапно, с образованием нескольких лейкоцитарных валов. Окончательная величина зоны некроза определяется к концу третьей недели после облучения. Ультраструктурные изменения включают признаки необратимого повреждения (рис. 3).

Обсуждение

Ранее было установлено, что местное лучевое поражение в форме острого лучевого некроза кожи имеет типичную стадийность: период первичных реакций; латентный период (5–7 суток); период экссудации и выраженных клинических проявлений, сменяющийся регенерацией [1]. В то же время с точки зрения тканевой реакции принято разделять патоморфогенез МЛП на две фазы – деструктивную, в которой превалируют дистрофические и некротические процессы, и фазу регенерации, которая в некоторых случаях может завершиться репарацией повреждения, но часто характеризуется не-

завершенностью с формированием хронической лучевой язвы [1]. Больше того, и в той, и в другой фазе явления деструкции выявляются параллельно с признаками репарации, и лишь общее направление течения патологического процесса позволяет рассматривать эти фазы отдельно.

Процессы повреждения, реактивных изменений, гибели, регенерации в области местного лучевого поражения протекают гетерохронно, в зависимости от радиочувствительности различных клеток, входящих в покровы и собирательное понятие «мягкие ткани», а также от удаленности от эпицентра лучевого воздействия. Кроме этого, степень повреждения ткани и (или) органа зависит от дозы лучевого воздействия [1, 4]. Чем в большей степени суммарная поглощенная доза излучения превышает толерантность облучаемых тканей, тем чаще и сильнее будут проявляться местные лучевые повреждения. В проведенном эксперименте доза на поверхности кожи 110 Гр (мощность дозы 17,5 Гр/мин) в 2 раза превосходила толерантную дозу (50–65 Гр), чего стало достаточно для развития раннего и позднего лучевого повреждения в виде хронической лучевой язвы.

Принято считать, что к концу первой недели область МЛП может быть разделена на две зоны – зону лучевого некроза и находившуюся дистальнее от источника облучения зону реактивных изменений [1]. По нашим данным, процесс формирования и демаркации указанных зон занимает гораздо большее время, и даже за весь период наблюдений раннего периода – 14 дней – он еще не завершен. Больше того, установлено формирование вторичных некрозов в МЛП, чей генез связан с повреждением микрососудов регенерирующих тканей, усиливающегося при посредстве хронического воспаления и иммунологических механизмов [1, 9].

Патоморфогенез МЛП следует рассматривать с учетом вовлечения в патологический процесс двух мишеней: 1) радиационное поражение стволовых и пролиферирующих клеток эпидермиса; 2) повреждение эндотелия сосудов, фибробластов и соединительнотканного матрикса [10].

В выполненном исследовании установлены ранние структурные и ультраструктурные признаки повреждения базальных кератиноцитов, включающие как прямой некроз, так и гибель митохондрий, ведущую за собой нарастание внутриклеточного отека и явления так называемой зернистой и баллонной дистрофии. Кроме этого, отслаивание эпителиального пласта субэпидермальным трансудатом приводит к полному разобщению покровной ткани от приносящих кровеносных сосудов. Важно, что на ультраструктурном уровне указанные изменения детектируются уже на 3-и сутки, в то время как ранее они были описаны при использовании световой микроскопии на более поздних сроках [1]. Таким образом, в момент клинического проявления МЛП в виде эритемы и в латентный период в эпителии уже развернуты необратимые процессы повреждения. Деструктивные процессы прогрессируют и на 8-е сутки, эпидермис разрушается, отмечается клеточная инфильтрация, и процесс разрешается десквамацией эпителия.

Л.А. Африканова (1975) указывает, что особенностью развития так называемого лучевого воспаления в области демаркации поврежденных тканей является пониженная миграционная активность лейкоцитов [1]. Указанное положение отчасти подтверждается данными оценки общей клеточности. Угнетение репаративных и миграционных процессов в зоне повреждения иллюстрируется морфометрическими данными – значимого увеличения клеточности ни в сосочковом, ни в сетчатом слое на 8-е сутки не происходит. Развитие функциональных расстройств, в первую очередь нарушения кровообращения в зоне повреждения, подтверждает изменения структурно-функционального состояния эндотелиоцитов начиная с 8-х суток.

Объем некроза соединительной ткани дермы и иных тканевых структур – сосудов и жировой ткани – наи-

более вероятно является фактором прогноза для возможной самостоятельной эпителизации обширного повреждения. Это положение косвенно подтверждено исследованиями, в которых были применены биотехнологические способы восстановления так называемых мягких тканей, что являлось предиктором успеха роста эпителия по раневой поверхности [11].

Важная особенность МЛП – нарастание возникших морфологических изменений. Так, дифференцированные фибробласты, основные клеточные элементы фибробластического дифферона, на всех сроках исследования имели выраженные в разной степени деструктивные ультраструктурные изменения энергообеспечивающих органелл. Изменения в митохондриях прогрессировали от набухания и укорочения крист до вакуолизации органелл с полной потерей складок внутренней мембраны и просветления матрикса. Повреждение белоксинтезирующих органелл приводит к снижению продукции коллагена, эластина. Кроме этого, А.В. Барабанова (2010) связывает угнетение репарации соединительной ткани дермы с тем, что клеточное обновление фибробластов и эндотелиоцитов занимает больший промежуток времени в отличие от кератиноцитов [10]. Однако, если принять во внимание ранние дистрофические и некротические процессы в дерме, а также возможности миграции клеточных предшественников, едва ли эта точка зрения справедлива.

Таким образом, результаты проведенного комплексного морфологического анализа кожи экспериментальных животных в ранние сроки после высокой дозы облучения (110 Гр) показали тяжелые структурно-функциональные изменения во всех слоях кожи с тенденцией к прогрессированию. Глубокое нарушение энергообеспечения клеточных и тканевых процессов приводит к выраженному нарушению кинетики клеточных популяций и создает предпосылки к развитию язвенного дефекта в дальнейшем. Считается, что присоединение на последующих этапах морфогенеза лучевой язвы аутоиммунного компонента формирует длительно незаживающую язву. Последняя может быть рассмотрена как модель хронических язв, в том числе сосудистого генеза.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Б.Б. Мороз, Р.В. Деев.
Сбор и обработка материала – Р.В. Деев, П.С. Еремин,
И.А. Чекмарева, В.Г. Лебедев, Ю.Б. Дешевой, Т.А. Насонова.
Написание текста – Р.В. Деев.
Редактирование – Р.В. Деев.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – B.B. Moroz,
R.V. Deev.
Collected the data and performed the analysis – R.V. Deev,
P.S. Eremin, I.A. Chekmareva, V.G. Lebedev, Yu.B. Deshevoy,
T.A. Nasonova.
Wrote the paper – R.V. Deev.
Edited the manuscript – R.V. Deev.

Литература/References

1. *Африканова Л.А.* Острая лучевая травма кожи. Москва: Медицина, 1975. 192 с.
Africanova LA. Acute radiation skin injury. Moscow: Medicine, 1975. 192 p. (In Russ.).
2. *Пиголкин Ю.И., Квачева Е.Ю.* Современные возможности судебно-медицинской экспертизы местной радиационной травмы. Судебно-медицинская экспертиза. 2012;55(3):52–55.
Pigolkin YuI, Kvacheva EYu. The current potential of forensic medical expertise of a local radiation injury. Forensic medical expertise. 2012;55(3):52–55 (In Russ.).
3. *Заргарова Н.И., Владимировая О.О., Легеца В.И., Гребенюк А.Н.* Моделирование глубоких лучевых поражений кожи в эксперименте на крысах. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2014;59(3):5–11.
Zargarova NI, Vladimirova OO, Legeza VI, Grebenyuk AN. Modeling of the deep injures of skin in experiment on rats. Medical radiology and radiation safety. 2014;59(3):5–11 (In Russ.).
4. *Галстян И.А., Надежина Н.М., Барабанова А.В., Кретов А.С., Каширина О.Г.* Диагностика, лечение местных лучевых поражений и их отдаленных последствий. Федеральные клинические рекомендации. ФКР ФМБА России, 2015. 61 с.
Galstyan IA, Nadezhina NM, Barabanova AV, Kretov AS, Kashirina OG. Diagnostics and treatment of local radiation injuries and their long-term consequences. Federal clinical guidelines. FKR FMBA Rossii, 2015. 61 p. (In Russ.).
5. *Герасимов С.М., Шипилов В.М.* Лучевая болезнь. В кн.: С.А. Повзун, Н.Д. Ключков, М.В. Рогачев (ред.). Патологическая анатомия боевых поражений и их осложнений. Санкт-Петербург: ВМедА, 2002. С. 163–186.
Gerasimov SM, Shipilov VM. Radiation sickness. In: SA Povzun, ND Klochkov, MV Rogachev (eds.). Pathological anatomy of combat injures and their complications. Saint Petersburg: VMedA, 2002. P. 163–186 (In Russ.).
6. *Данилов Р.К.* Раневой процесс: гистогенетические основы. Санкт-Петербург: ВМедА, 2008. 379 с.
Danilov RK. Wound process: histogenetic basis. Saint Petersburg: VMedA, 2008. 379 p. (In Russ.).
7. *Котенко К.В., Мороз Б.Б., Насонова Т.А., Добрынина О.А., Липенгольц А.А., Гимадова Т.И. и др.* Экспериментальная модель тяжелых местных лучевых поражений кожи после действия рентгеновского излучения. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2013;57(4):121–123.
Kotenko KV, Moroz BB, Nasonova TA, Dobrynina OA, Lipengolz AA, Gimadova TI et al. Experimental model of severe local radiation injuries of the skin after x-rays. Pathological physiology and experimental therapy. 2013;57(4):121–123 (In Russ.).
8. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes. Available from: <http://www.worldlii.org/int/other/treaties/COETSER/1986/1.html>.
9. *Пасов В.В., Терехов О.В., Постнов Ю.Г., Ульянов А.А., Белая Н.С., Жариков А.А.* Новые подходы в консервативном лечении глубоких поздних лучевых повреждений мягких тканей. Радиация и риск. 2010;19(2):58–64.
Pasov VV, Terekhov OV, Postnov YuG, Ulyanov A.A., Belaya N.S., Zharikov A.A. New approaches to the conservative treatment of late radiation soft tissues injuries. Radiation and risk. 2010;19(2):58–64 (In Russ.).
10. *Барабанова А.В.* Местные лучевые поражения кожи. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2010;55(5):79–84.
Barabanova AV. Local radiation injury skin. Medical radiology and radiation safety. 2010; 55(5):79–84 (In Russ.).
11. *Дешевой Ю.Б., Насонова Т.А., Добрынина О.А., Деев Р.В., Лебедев В.Г., Лыршичкова А.В. и др.* Опыт применения сингенных мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) жировой ткани для лечения тяжелых радиационных поражений кожи в эксперименте. Радиационная биология. Радиоэкология. 2020;60(1):26–33. DOI: 10.31857/S0869803120010063.
Deshevoj YuB, Nasonova TA, Dobrynina OA, Deev RV, Lebedev VG, Lyrshchikova AV et al. Experience of application of syngeneic multipotent mesenchymal stem cells (MMSK) adipose tissue for treatment of severe radiation skin lesions at various intervals after exposure in the experiment. Radiation biology. Radioecology. 2020;60(1):26–33 (In Russ.). DOI: 10.31857/S0869803120010063.

Информация об авторах

Роман Вадимович Деев – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой патологической анатомии Северо-Западного государственного медицинского университета имени И.И. Мечникова; директор по науке Института стволовых клеток человека.

Петр Серафимович Еремин – научный сотрудник Национального медицинского исследовательского центра реабилитации и курортологии.

Ирина Александровна Чекмарева – доктор биологических наук, заведующая лабораторией электронной микроскопии Национального медицинского исследовательского центра хирургии имени А.В. Вишневского.

Владимир Георгиевич Лебедев – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории радиационной патологии центра биомедицинских технологий Федерального медицинского биофизического центра имени А.И. Бурназяна.

Юрий Борисович Дешевой – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории радиационной патологии центра биомедицинских технологий Федерального медицинского биофизического центра имени А.И. Бурназяна.

Тамара Алексеевна Насонова – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории радиационной патологии центра биомедицинских технологий Федерального медицинского биофизического центра имени А.И. Бурназяна.

Борис Борисович Мороз – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий лабораторией радиационной патологии центра биомедицинских технологий Федерального медицинского биофизического центра имени А.И. Бурназяна.

Author information

Roman V. Deev – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Head of the Pathology Department, I.I. Mechnikov North-Western State Medical University; Science Director, Human Stem Cells Institute.

<https://orcid.org/0000-0001-8389-3841>

Petr S. Eremin – Researcher, National Medical Research Center of Rehabilitation and Balneology.

<https://orcid.org/0000-0001-8832-8470>

Irina A. Chekmareva – Dr. Sci (Biol.), Head of the Laboratory of Electron Microscopy, A.V. Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery.

<https://orcid.org/0000-0003-0126-4473>

Vladimir G. Lebedev – Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Radiation Pathology, Center of Biomedical Technologies, A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center.

<https://orcid.org/0000-0002-4622-7329>

Yuriy B. Deshevoy – Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Radiation Pathology, Center of Biomedical Technologies, A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center.

<https://orcid.org/0000-0003-2755-5674>

Tamara A. Nasonova – Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Radiation Pathology, Center of Biomedical Technologies, A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center.

<https://orcid.org/0000-0003-1511-4329>

Boris B. Moroz – Dr. Sci (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Radiation Pathology, Center of Biomedical Technologies, A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center.

<https://orcid.org/0000-0002-9982-723X>