

УДК 57:611.018

## КОЛИЧЕСТВЕННАЯ МОДЕЛЬ ПОЭТАПНОГО ЗАЖИВЛЕНИЯ КОЖНОЙ РАНЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Чепурненко М.Н.

ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова»,  
Санкт-Петербург, e-mail: mrgchep@gmail.com

Цель – разработать и апробировать количественную модель межклеточных коопераций регенерата соединительных тканей кожи. Матрица обучающей информации создана на основе гистологического анализа клеточного состава кожной раны экспериментальных животных (мыши), и группирующего признака – срока заживления раны (6 ч, 24 ч, 3, 6, 15 и 25 сут). Для характеристики изменений клеточного состава соединительных тканей кожи в раневом процессе использовано математическое моделирование методом линейного дискриминантного анализа. Этапы математического моделирования включают следующую последовательность: обработка исходной информации в пакете Excel; расчет коэффициентов модели методом дискриминантного анализа в пакете Statistica 6.0; расчет статистической достоверности модели; апробация полученной количественной модели. После гистологического анализа регенерата соединительных тканей кожи создана количественная модель, в которой представлены данные для построения шести линейно-классификационных функций. Количественная модель клеточного состава при регенерации тканей кожи решает задачу классификации по количественным показателям тканевых элементов кожной раны. При сравнении динамики изменений количественных показателей определяется фаза раневого процесса по наибольшему значению линейно-классификационных функций. Качество модели определяется соответствием классификации обучающей выборки выработанным решающим правилам. Точность моделирования регенерации соединительных тканей кожи в эксперименте по решающим правилам достаточно велика (более 90%). Количественные характеристики клеток регенерата соединительных тканей кожи закономерно изменяются во времени и служат надежными критериями для диагностики течения раневого процесса. Данная модель описывает возникновение, развитие и перестройку клеточного состава регенерата соединительных тканей, характеризуя временные особенности изменения их клеточного состава. При подстановке в формулы количественных показателей соединительно-тканного регенерата, позволяет персонализировать заживление раны при механическом повреждении кожи.

**Ключевые слова:** количественная модель, клеточный состав, кожная рана, формула, сроки заживления раны

## A QUANTITATIVE MODEL OF CUTANEOUS WOUND HEALING STAGES IN AN EXPERIMENT

Chepurnenko M.N.

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,  
Saint Petersburg, e-mail: mrgchep@gmail.com

The purpose of research is to develop and test a quantitative model of regenerated skin tissues intercellular cooperation. Learning sample matrix was created on the basis of histological analysis of the research animal (mouse) skin wound cellular composition and classification criterion which is the wound healing period (6 hours, 24 hours, 3, 6, 15 and 25 days). Mathematical modelling linear discriminant analysis was used for skin connective tissues cellular composition change characteristics during wound healing. Mathematical modelling included several stages: learning sample matrix creation; modeling using linear discriminant analysis; model quality evaluation; model testing for problem-solving assessment. After regenerated skin tissues histological analysis a quantitative model which includes data for six linear classification functions construction has been developed. The cellular composition quantitative model during skin tissues regeneration is intended to solve the problem of a skin wound tissue elements quantitative classification. While comparing the quantitative figures dynamics, the healing process phase is identified with the highest linear classification function value. The model quality is verified by the correlation between learning sample classification and the developed decision rules. The skin tissues regeneration modelling accuracy in the decision rules experiment is quite high (more than 90%). Regenerated skin connective tissues cellular quantitative characteristics naturally change over time and are reliable criteria for healing process diagnostics. The given model describes the regenerated connective tissues cellular composition appearance, development and transformation and characterizes their cellular composition specific temporary changes. Using regenerated skin connective tissues quantitative figures in the formulas allows to calculate results which show specific characteristics of individual wound healing process.

**Keywords:** quantitative model, cellular composition, skin wound, formula, wound healing periods

Одним из научных направлений в экспериментальной гистологии является изучение закономерностей посттравматической регенерации тканей и регуляции их восстановительных потенций [1]. В ранее проведенных исследованиях показано, что имеются структурно-функциональные

корреляции между клетками в воспалительной и регенерационной фазе раневого процесса. На всех этапах регенерации постоянно происходят изменения клеточного состава регенерата, которые характеризуются временными, качественными и количественными параметрами [1, 2].

При травме кожи с передачей кинетической энергии снарядами повреждаемым тканям регистрируется характерное для раневого процесса изменение клеточно-дифференцированного состава соединительной ткани перинекротической области. Активация пролиферативной активности фибробластов на третьи сутки опыта в равной мере регистрируется как в рыхлой волокнистой, так и плотной волокнистой соединительных тканях кожи. В дальнейшем ведущими источниками регенерации становятся фибробласты рыхлой волокнистой соединительной ткани, что характеризует проявления регенерационного гистогенеза [1, 3, 4]. Одним из методов изучения закономерностей регенерации тканей является математическое моделирование, при этом проводится количественный и качественный анализ динамики раневого процесса на всех этапах заживления экспериментальной раны [5, 6]. Математическая модель позволяет персонализировать процесс заживления раны при механическом повреждении кожи.

Цель исследования – разработать и апробировать количественную модель межклеточных коопераций регенерата соединительных тканей кожи.

#### Материалы и методы исследования

Объектами исследования регенерационного гистогенеза служили соединительные ткани кожи лабораторных животных (крысы,  $n = 90$ ; мыши,  $n = 50$ ). Забор материала производили с учетом ранее установленных сроков гистологических изменений при нанесении различных видов повреждений в эксперименте (6 ч, 24 ч, на 3, 6, 15 и 25 сут).

Для гистологического исследования развития грануляционной ткани вырезали прямоугольный кожный лоскут так, чтобы в центре находился дефект кожи.

Для оценки клеточных элементов регенерата использовали комплекс гистологических исследований: световая и электронная микроскопия; одноволновая цитоспектрофотометрия, гистохимия и цитохимия, иммуногистохимия. Морфометрические методы применяли для регистрации количественных и качественных изменений в зоне формирующегося регенерата. Полученные результаты статистически обработали для последующего математического моделирования с целью персонализировать процесс заживления раны при механическом повреждении кожи [1].

Математическое моделирование методом линейного дискриминантного анализа позволило верифицировать клеточные из-

менения соединительных тканей кожи в раневом процессе [7, 8].

Обработка исходной информации в электронном виде осуществлялась в редакторе Excel, а последующий статистический анализ – в программе статистического анализа Statistica 6.0.

Этапы математического моделирования включают следующую последовательность действий:

1. Обработки исходной информации в пакете Excel.

2. Расчет коэффициентов модели методом дискриминантного анализа в пакете Statistica 6.0.

3. Расчет статистической достоверности модели ( $p$ ).

4. Апробация полученной количественной модели.

Количественная модель персонализированного течения раневого процесса представляет собой шесть линейных классификационных формул.

В общем виде они выглядят следующим образом:

$$ЛКФ_1 = b_0 + b_1 \times X_1 + b_2 \times X_2 + \dots + b_k \times X_k, \quad (1)$$

где ЛКФ – линейная классификационная функция,  $b_0$  – константа;  $b_1, b_2, \dots, b_k$  – коэффициенты для количественных признаков  $X_1, X_2, \dots, X_k$ ;  $X_1, X_2, \dots, X_k$  – значения количественных признаков модели.

Подставляя данные в линейные классификационные функции, производится классификация исходных показателей по максимальному значению, являющихся классифицирующим основанием [8].

#### Результаты исследования и их обсуждение

Качественные изменения клеток дифферона нейтрофилов периферической крови служит диагностическим критерием фазы воспалительной реакции в регенерационном гистогенезе и сопровождается цитохимическим обнаружением катионных белков. Повышение количества нейтрофильных гранулоцитов в периферической крови с высокой активностью катионных белков к 24 часам эксперимента статистически достоверно. Снижение фагоцитарной активности (снижение цитохимической активности катионных белков) нейтрофильных гранулоцитов регистрируется на третьи сутки и далее отмечается повышение вплоть до завершения эксперимента (25 сут). Что подтверждает факт наличия гетероморфии (активность катионных белков) в клеточной популяции нейтрофилов как у сегментоядерных, так и у палочкоядерных клеток.

В ранее проведенных исследованиях установлено, что «грануляционная ткань – это полидифферонная система, развивающаяся в тесном взаимодействии с кровеносными сосудами» [1]. Формирующийся регенерат содержит клеточные элементы различных дифферонов: лейкоцитов, клеток макрофагического дифферона, лимфоцитов, определяющих междифферонную гетероморфию. Ведущими клетками будут клетки фибробластической дифференцировки. Изменение клеточного состава грануляционной ткани связано с изменением соотношения гематогенных и соединительнотканых клеток в зоне регенерата. А именно фибробластов, макрофагов, эндотелиоцитов, лейкоцитов, нейтрофилов, плазмочитов. Преобладание зрелых, активно продуцирующих коллаген фибробластов устанавливается к 15-м суткам эксперимента. Электронно-микроскопически у таких клеток почти вся цитоплазма занята профилями гранулярной эндоплазматической сети.

К началу фазы дифференцировки (15-е сутки) эксперимента доля фибробластов составляет  $76,16 \pm 9,1\%$ . А также обнаруживается следующее количественное соотношение клеток гематогенного происхождения: нейтрофилы составляют  $0,16 \pm 0,37\%$ , макрофаги –  $19 \pm 3,45\%$ , лейкоциты –  $0,4 \pm 0,7\%$ . Подтверждается выраженная внутридифферонная и междифферонная гетероморфия регенерата (рис. 1).

В клеточном регенерате клетки фибробластического дифферона преобладают среди клеточных дифферонов новообразованной соединительной ткани. В регенерате

обнаруживаются нейтрофилы, макрофаги, лимфоциты, лейкоциты, что обуславливает медленное снижение междифферонной и внутридифферонной гетероморфии.

К 25-м суткам в регенерате начинают преобладать зрелые фибробласты, их количественный показатель –  $96,96 \pm 1,27\%$ . Цитодифференцировка фибробластов сопровождается нарастанием объема канальцев гранулярной эндоплазматической сети, расширением просвета канальцев эндоплазматической сети, заполненных мелкозернистым содержимым, равномерным распределением последних по всей цитоплазме клетки. Наружная поверхность канальцев с многочисленными рибосомами (рис. 2). Встречаются высокодифференцированные клетки – фиброциты.

На первом этапе математического моделирования клеточного состава регенерата формировалась обучающая информация. Матрица обучающей информации создана на основе морфологического анализа клеточно-дифферонного состава перинекротической области раны экспериментальных животных (мыши), и группирующего признака – срока заживления раны (6 ч, 24 ч, 3, 6, 15 и 25 сут).

Сформированная грануляционная ткань имеет новые кооперации клеток, как по типу, так и по степени их дифференцировки. Это подтверждает целесообразность трактовки регенерационных процессов с позиции «функциональных гистионов» [1, 6]. Сложный состав клеточного регенерата закономерно изменяется во времени и позволяет персонализировать заживление раны при механическом повреждении кожи.

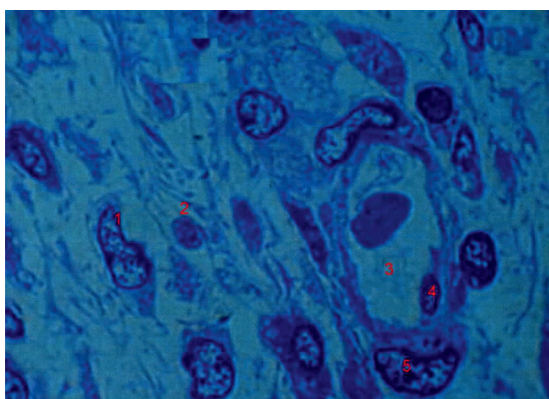


Рис. 1. Клеточные и тканевые элементы регенерата. 15-е сутки опыта. Полутонкий срез. Толуидиновый синий. Ув. 630.  
Обозначения: 1 – фибробласт, 2 – лимфоцит, 3 – просвет капилляра, 4 – эндотелиоцит, 5 – периваскулярная клетка

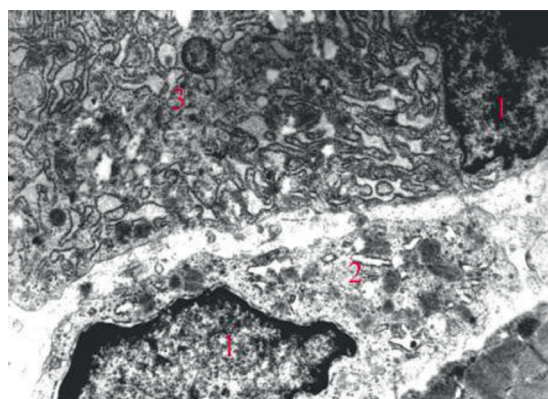


Рис. 2. Фибробласт регенерата. 15-е сутки. Ув. 8300. Обозначения: 1 – ядро, 2 – цитоплазма, 3 – гранулярная эндоплазматическая сеть

Содержание клеток в зоне регенерации (X + Sx, %)

Клетки / Срок опыта	Нейтрофильные лейкоциты	Лаброциты	Клетки макрофагического дифферона	Клетки фибробластического дифферона
6 ч	49,8 ± 5,4	1,27 ± 0,19	0,09 ± 0,04	48,84 ± 3,1
24 ч	62,4 ± 7,8*	3,97 ± 0,04*	5,9 ± 0,36*	27,73 ± 1,4*
3 сут	19,2 ± 4,1*	2,9 ± 0,07*	59,3 ± 4,6*	18,6 ± 2,9*
6 сут	1,8 ± 0,5*	3,9 ± 0,16*	31,4 ± 6,6*	62,9 ± 9,3*
15 сут	0,09 ± 0,07	0,5 ± 0,02*	19,6 ± 5,9*	79,81 ± 8,5*
25 сут	0,1 ± 0,006*	0,4 ± 0,04	8,1 ± 0,6*	91,4 ± 10,6*

Условные обозначения: \* p ≤ 0,05.

Среди ведущих клеточных типов в регенерате выделяют клетки системы крови (нейтрофильные лейкоциты, лаброциты) клетки макрофагического и фибробластического дифферонов, а также эндотелиоциты.

Количественные характеристики выше-названных клеток закономерно изменяются во времени и могут служить надежными критериями для диагностики течения раневого процесса (таблица).

На следующем этапе моделирования рассчитывались коэффициенты линейных функций для количественной модели (ЛКФ<sub>1-6</sub>) в модуле «Discriminant Analysis»

программы Statistica 6,0. Полученные коэффициенты являются информационными признаками тканевых элементов регенерата.

После обработки введенных данных создавали количественную модель клеточного состава соединительнотканного регенерата, в которой были представлены данные для построения шести формул – соответствующие коэффициенты и константы. Исползованные для вычисления значения линейно-классификационных функций и константы для каждого клеточного типа, вошедшего в модель.

В общепринятом виде модель имеет следующий вид:

$$ЛКФ1 = -40815,3 + 815,8 * X1 + 474,8X2 + 794,9 * X3 + 813,6 * X4 + 849,2 * X5$$

$$ЛКФ2 = -40612,4 + 815,6 * X1 + 753,6 * X2 + 793 * X3 + 809,3 * X4 + 840,1 * X5$$

$$ЛКФ3 = -40124,3 + 800,6 * X1 + 737,6 * X2 + 803,1 * X3 + 803,1 * X4 + 846,3 * X5$$

$$ЛКФ4 = -40380,9 + 802,5 * X1 + 739,7 * X2 + 800,9 * X3 + 810,1 * X4 + 846,3 * X5$$

$$ЛКФ5 = -40777,2 + 806,8 * X1 + 737,3 * X2 + 801,3 * X3 + 815,6 * X4 + 849,6 * X5$$

$$ЛКФ6 = -40832,2 + 807,6 * X1 + 739,4 * X2 + 796,6 * X3 + 816,8 * X4 + 847,2 * X5$$

На третьем этапе построения количественной модели клеточного состава соединительнотканного регенерата непосредственно решалась сама задача классификации по количественным показателям тканевых элементов раны. При сравнении динамики морфологических проявлений течения раневого процесса определялась фаза регенерационного гистогенеза по наибольшему значению ЛКФ.

Статистическая достоверность количественной модели определяли по точности классификации исходной статистической выборки с помощью полученных классификационных коэффициентов. Точность моделирования клеточного состава в зоне регенерации по указанным классификационным признакам достаточно велика (более 90 %).

### Заключение

На разных этапах посттравматической регенерации тканей кожи имеется закономерное соотношение различных клеточных элементов, участвующих в воспалительной и регенерационной фазе раневого процесса [1, 9]. Математическое моделирование позволяет проводить количественный и качественный анализ динамики раневого процесса на всех этапах заживления экспериментальной раны [5]. Полученная количественная модель соотношения клеточных элементов в зоне регенерации представляет собой группу формул. Данная модель описывает возникновение, развитие и перестройку клеточного состава регенерата соединительных тканей, характеризуя временные особенности изменения

их клеточного состава. При подстановке в формулы количественных показателей соединительнотканного регенерата полученные результаты позволяют персонализировать заживление раны при механическом повреждении кожи.

#### Список литературы

1. Данилов Р.К. Раневой процесс: гистогенетические основы. СПб.: ВМедА, 2008. 379 с.
2. Графова Г.Я., Одинцова И.А., Чепурненко М.Н. Регенерация кожи. Руководство по гистологии / Под ред. Р.К. Данилова. 2-е изд., испр. и доп. СПб.: СпецЛит, 2011. Т. 2. С. 52–60.
3. Чепурненко М.Н., Чепурненко Д.А. Морфофункциональные свойства клеток и тканей в зоне «молекулярного сотрясения» кожной раны // Современные проблемы морфологии: материалы научной конференции, посвященной памяти академика РАН, профессора Льва Львовича Колесникова. 2020. С. 249–251.
4. Guerra A., Belinha J., Jorge R.N. Modelling skin wound healing angiogenesis: A review. *J Theor Biol.* 2018 Dec 14; 459:1-17. DOI: 10.1016/j.jtbi.2018.09.020. Epub 2018 Sep 19. PMID: 30240579.
5. Чепурненко М.Н. Морфо-математическая модель гистионов регенерационного гистогенеза // Вопросы морфологии XXI века. Выпуск 4. Сборник научных трудов: «Учение о тканях. Гистогенез и регенерация» / Под ред. И.А. Одинцовой, С.В. Костюкевича. СПб.: Издательство ДЕАН, 2015. С. 204–208.
6. Клочков Н.Д. Гистион как элементарная морфофункциональная единица // Морфология. 1997. Вып. 5. С. 87–88.
7. Иващенко М.И., Брук Г.М. Применение математико-статистического моделирования в экспериментальных гистологических исследованиях // Мечниковские чтения-2021: материалы 94-й Всероссийской научно-практической студенческой конференции с международным участием. Министерство здравоохранения Российской Федерации, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 2021. С. 235.
8. Юнкеров В.И., Григорьев С.Г., Резванцев М.В. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований; 3-е изд., доп. СПб.: ВМедА, 2011. 318 с.
9. Ripa A.L., Kalabusheva E.P., Vorotelyak E.A. Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. *Cells.* 2019 Jun 18;8 (6): 607. DOI: 10.3390/cells8060607. PMID: 31216669; PMCID: PMC6627856.