

6. Jain K. K. Regenerative Therapy for Central Nervous System Trauma / In: Steinhoff G. (eds) Regenerative Medicine – from Protocol to Patient. Springer, Cham, 2016.
7. Rizyanov A. A., Guseva D. S., Salafutdinov I. I., Kudryashova N. V., Bashirov F. V., Kiyasov A. P., Yalvaç M. E., Gazizov I. M., Kaligin M. S., Sahin F., Mukhamedyarov M. A., Palotás A., Islamov R. R. Genetically modified human umbilical cord blood cells expressing vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor 2 differentiate into glial cells after transplantation into amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice // Exp. Biol. Med. 2011. Vol. 236. P. 91–98.
8. Wagih A., Elhawary S., Ellessy R. M., Esam B., Tarek I., Aamer M. Stem Cells for Neuro-regeneration: State of the Art // Am. J. of Bioscience and Bioengineering. 2015. Vol. 3(4–1). P. 56–70.

*Шаповалова Е. Ю., Бойко Т. А.,  
Барановский Ю. Г., Харченко С. В., Юнси Г. А.*

## **ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОЙ КООПЕРАЦИИ И КОЛЛАГЕНООБРАЗОВАНИЯ В РЕГЕНЕРАЦИОННОМ ГИСТИОНЕ ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ РАНЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ АУТО- И ГЕТЕРОФИБРОБЛАСТОВ И ДЕРМАЛЬНОГО ЭКВИВАЛЕНТА**

*Кафедра гистологии и эмбриологии (заведующая – проф. Е. Ю. Шаповалова)  
Медицинской академии имени С. И. Георгиевского  
ФГАОУ ВО «КФУ имени В.И. Вернадского», Симферополь,  
e-mail: Shapovalova\_L@mail.ru*

---

Работами современных исследователей показано, что раневой процесс в тканях кожи включает в себя сменяющие друг друга по времени фазы, однако межклеточные и межтканевые корреляции в каждой фазе, в зависимости от повреждающего агента, изучены недостаточно [4]. Гистионы представляют собой динамические клеточные кооперации, состав которых закономерно изменяется в зависимости от фазы раневого процесса [5]. В период фазы регенерации клеточный состав регенерационного гистиона тоже меняется во времени, но сведения о его клеточном составе после дополнительного введения ключевых клеток данного гистиона – фибробластов – малочисленны и отрывочны [3, 6].

**Цель исследования** – проанализировать клеточную кооперацию регенерационного гистиона и коллагенообразования в биоптатах грануляционной ткани в модельной ишемизированной ране на 12-е сутки после введения ауто- и гетерофибробластов, а также после трансплантации дермального эквивалента с гетерофибробластами.

**Материалы и методы.** Исследование выполнено на 28 белых половозрелых мышах линии С57/В1 в возрасте до 1 года. Животные были разделены на контрольную группу (7 особей) и три экспериментальные группы (по 7 особей в каждой). Эксперименты проводили со следованием всем принципам гуманности,

содержащимся в директиве Европейского Сообщества (86/609/ЕС) и в соответствии с «Правилами выполнения работ с привлечением экспериментальных животных».

Во всех группах операцию по моделированию кожной раны в лопаточной области производили после внутрибрюшинного введения 2,5 %-ного раствора авертина (0,3–0,4 мл). Кожу однотипно иссекали в виде круга диаметром 12 мм, к краям раны кожно-фасциальными узловыми швами фиксировалось силиконовое кольцо с наружным диаметром 12 мм атравматичным шовным материалом «Полипропилен» 5-0. Ишемизацию раны проводили путем наложения кисетного шва нитью «Полипропилен» 5-0 на расстоянии 1,0 см латеральнее наружного диаметра раны, что нарушает циркуляцию крови в системе окологлопаточных артерий мышцы.

Из иссеченной кожи мышей выделяли фибробласты в условиях стерильного бокса с ламинарным потоком воздуха. Кусочки кожи после ферментативного удаления эпидермиса помещали в среду DMEM F12 (Lonza) и измельчали сосудистыми ножницами до размера 1–2 мм. Затем к кусочкам ткани добавляли равные объемы растворов коллагеназы I типа (200 ед/мл, Sigma) и диспазы (30 ед/мл) (Gibco). Полученную смесь инкубировали в течение 1 часа при 370 °С и постоянном перемешивании. После фильтрации суспензии через фильтр диаметром 0,40 мкм и центрифугирования в течение 7 минут при 1000 об/мин, фибробласты ресуспендировали и культивировали в среде DMEM F12 (Lonza) с добавлением 10 %-ной телячьей сыворотки (HyClone) и 50 ед/мл пенициллина – стрептомицина (ПанЭко) в чашках Петри в инкубаторе при 370 °С и концентрации CO<sub>2</sub> 5 % до достижения 100 %-ного конфлюента. Для пересева клеток использовали 0,25 %-ный трипсин-0,02 % ЭДТА.

В первой и второй экспериментальных группах интраоперационно в дно раны и вокруг нее вводили 0,4 мл взвеси фибробластов 1-го или 2-го пассажа в ростовой среде DMEM F12 (Lonza) в количестве 1,33 млн клеток. В первой экспериментальной группе вводили гетерофибробласты, во второй – аутофибробласты. В третьей экспериментальной группе в рану трансплантировали дермальный эквивалент с гетерофибробластами, приготовленный на основе коллагена первого типа [2].

На 12-е сутки после операции у мышей всех групп интраоперационно иссекали образовавшийся рубец и фиксировали 10 %-ным забуференным формалином, заливали в парафин, окрашивали гематоксилином и эозином, а также по Вейгерту-Ван-Гизону для визуализации эластических и коллагеновых волокон. Морфологическое исследование гистологических препаратов проводили с помощью светооптического микроскопа OLIMPUS CX-31 с цифровой камерой OLIMPUS 35050Z. Присутствие макрофагов определяли иммуногистохимическим методом, где первичными антителами были CD68 Gene Tex Inc (США) в разведении 1:100. Визуализацию связывания антител с макрофагами проводили с помощью вторичных антител, которые содержали большое количество молекул пероксидазы хрена, и 3,3-диаминобензидина (Novolink, Leica Biosystem, Великобритания). Для адекватного представления структуры ткани и ядер клеток срезы дополнительно окрашивались гематоксилином Майера в течение 3 минут.

Выполнялось контрольное исследование с целью исключения псевдоположительных и псевдонегативных результатов. Присутствие тучных клеток определяли стандартным набором для выявления тучных клеток фирмы «Биовитрум», основанном на использовании толуидинового синего при pH 5,6. Индекс макрофагов и тучных клеток определяли путем подсчета количества CD68-положительных клеток и клеток, окрашенных толуидиновым синим (на 100 клеток грануляционной ткани) с последующим вычислением показателя в процентах в среднем по результатам изученных каждых 14 срезов биоптатов в контрольной и трех экспериментальных группах. Функциональную активность оценивали по индексу дегрануляции (отношение количества дегранулировавшихся клеток к общему их числу в процентах). Сравнения средней величины индексов макрофагов и тучных клеток и индекса их функциональной активности проводили в процентах по отношению к контрольной группе.

Морфометрические измерения проводили с помощью программы ImageJ при увеличении объектива 40 и окуляра 10 по 50 замеров в каждой группе. Статистическую обработку цифровых данных проводили с использованием лицензионного программного обеспечения MS Office Excel 2007, аналитического пакета приложения STATISTICA Enterprise (StatSoft Inc., США). Сравнения средней толщины эпидермиса, площади, занимаемой коллагеновыми волокнами и сосудами грануляционной ткани, проводили в процентах по отношению к контрольной группе.

**Результаты исследования и их обсуждение.** У мышей контрольной группы самопроизвольное отпадение силиконового кольца было зафиксировано в среднем на  $12,4 \pm 0,10$  суток после операции по созданию модельной раны. Под толстыми остатками струпа обнаруживалась полная эпителизация раны. На срезах рубца эпидермис представлен не полностью сформированным многослойным эпителием толщиной  $51,73 \pm 0,12$  мкм (табл. 1).

Таблица 1

#### КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БИОПТАТОВ КОЖИ МЫШЕЙ КОНТРОЛЬНОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ГРУПП

Биоптаты кожи	Толщина эпидермиса, мкм	Площадь дермы на срезах, мкм	Площадь сосудов в дерме, %	Площадь коллагеновых волокон в дерме, %
Биоптаты в контрольной группе	$51,73 \pm 0,12$	$46259,83 \pm 1,20$	$0,69 \pm 0,02$	$29,70 \pm 0,16$
Биоптаты в первой экспериментальной группе	$61,48 \pm 0,14$	$44692,70 \pm 1,05$	$0,82 \pm 0,02$	$33,43 \pm 0,15$
Биоптаты во второй экспериментальной группе	$106,49 \pm 0,17$	$34128,13 \pm 1,13$	$1,73 \pm 0,01$	$40,76 \pm 0,24$
Биоптаты в третьей экспериментальной группе	$91,67 \pm 0,14$	$47439,58 \pm 1,17$	$1,03 \pm 0,01$	$38,81 \pm 0,12$

Дерма рубца не образует сосочков, вдающихся в эпидермис, и граница между эпидермисом и дермой рыхлая и ровная. Под базальной мембраной заметен тонкий вал лейкоцитарной инфильтрации в составе грануляционной ткани, в которой встречаются клетки тканевого и гематогенного происхождения. Сосочковый и сетчатый слои дермы не разграничиваются и образованы равномерно локализованными коллагеновыми волокнами, между которыми присутствуют клетки, преимущественно — функционально активные фибробласты. Индексы макрофагов и тучных клеток составляют соответственно  $17,21 \pm 0,02$  и  $26,15 \pm 0,10$  при индексе дегрануляции тучных клеток  $27,18 \pm 0,12$  (табл. 2). Индекс дегрануляции свидетельствует о стимулирующем влиянии на фибробласты и усилении ими коллагенообразования, а также о модулирующем воздействии на клетки воспалительного ряда [1, 7]. Коллагеновые волокна занимают в среднем  $29,70 \pm 0,16$  от площади дермы. Эластические волокна отсутствуют. Немногочисленные кровеносные капилляры и вены расширены, и их площадь составляет в среднем  $0,69 \pm 0,02$ . Вокруг них выявляется слабая лейкоцитарная инфильтрация, в составе которой есть макрофаги и тучные клетки.

Таблица 2

**КОЛИЧЕСТВО МАКРОФАГОВ И ТУЧНЫХ КЛЕТОК  
В ГРАНУЛЯЦИОННОЙ ТКАНИ БИОПРЕПАРАТОВ КОЖИ  
МЫШЕЙ КОНТРОЛЬНОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ГРУПП**

Грануляционная ткань дермы	Индекс макрофагов	Изменение индекса макрофагов по отношению к контролю, %*	Индекс тучных клеток	Изменение индекса тучных клеток по отношению к контролю, %*	Индекс дегрануляции	Изменение индекса дегрануляции по отношению к контролю, %*
Грануляционная ткань в контрольной группе	$17,21 \pm 0,02$	—	$26,15 \pm 0,10$	—	$27,18 \pm 0,12$	—
Грануляционная ткань в первой экспериментальной группе	$15,14 \pm 0,02$	-10,03	$22,43 \pm 0,11$	-14,23	$29,24 \pm 0,11$	+7,05
Грануляционная ткань во второй экспериментальной группе	$9,75 \pm 0,03$	-43,35	$19,66 \pm 0,10$	-24,82	$35,08 \pm 0,10$	+22,52
Грануляционная ткань в третьей экспериментальной группе	$10,66 \pm 0,02$	-38,06	$20,27 \pm 0,12$	-22,49	$33,41 \pm 0,11$	+18,56

\* Знак «—» означает снижение показателя по отношению к контролю, знак «+» означает повышение показателя по отношению к контролю.

У мышей первой экспериментальной группы эпителизация раны и отпадение силиконового кольца зафиксировано на один день раньше, чем в контроле, на  $11,4 + 0,06$  суток после операции и введения взвеси гетерофибробластов на ростовой среде ДМЕМ F12. Струп полностью отделился. Толщина эпидермиса на  $15,86\%$  больше, чем в контроле, и составляет  $61,48 + 0,14$  мкм. Эпидермис не полностью сформирован и включает три мало дифференцированных слоя. Базальная мембрана ровная, лейкоцитарная инфильтрация отсутствует. Грануляционная ткань под эпидермисом представлена тонкими пучками коллагеновых волокон, кровеносными сосудами и клеточными элементами. Индекс макрофагов уменьшился на  $10,03\%$ , а индекс тучных клеток – на  $14,23\%$ . Функциональная активность последних увеличилась на  $7,05\%$  (см. табл. 2). Коллагеновые волокна занимают в среднем  $33,43 + 0,15\%$  от площади дермы, что на  $11,16\%$  больше, чем в контрольной группе. Эластические волокна отсутствуют во всех участках дермы. Площадь кровеносных капилляров увеличилась на  $15,86\%$  по сравнению с контролем.

У мышей второй экспериментальной группы на фоне введения взвеси аутофибробластов в ростовой среде ДМЕМ F12 эпителизация раны и отпадение силиконового кольца зафиксировано еще раньше, чем в контроле и первой экспериментальной группе, на  $11,00 + 0,01$  суток после операции. Течение регенераторного гистогенеза произошло более благоприятно. С поверхности эпидермиса струп полностью отделился. Толщина эпидермиса на  $51,42\%$  больше, чем в контрольной группе. Значительно «продвинулась» дифференцировка слоев эпидермиса. Наметилось появление сосочкового слоя дермы в виде волнистой границы между базальной мембраной эпидермиса и подлежащей грануляционной тканью. Грануляционная ткань характеризуется усилением процессов ангиогенеза и коллагенообразования. Площадь, занятая коллагеновыми волокнами, увеличилась на  $27,13\%$  и составила  $40,76 + 0,24$  мкм, а площадь сосудов – на  $39,88\%$  и составила  $1,73 + 0,01$  мкм (см. табл. 1). Лейкоцитарная инфильтрация отсутствует. Индекс макрофагов снизился почти наполовину по сравнению с контролем ( $43,35\%$ ). Тучные клетки резко повысили выделение гранул ( $22,52\%$ ), но уменьшились количественно ( $24,82\%$ ), что является ярким подтверждением уменьшения процесса воспаления, завершения воспалительной фазы раневого процесса и усиления коллагенообразования. Клеточные элементы фибробластического ряда представлены крупными вытянутыми, слегка отростчатыми функционально активными клетками. Эластические волокна отсутствуют во всех участках дермы.

У мышей третьей экспериментальной группы на 12-е сутки после трансплантации дермального эквивалента с гетерофибробластами рана покрыта тонким слоем струпа. Отпадение силиконового кольца фиксировалось на  $12,20 + 0,11$  сутки после операции. Однако эпидермис выглядит значительно более дифференцированным, чем в предыдущих группах. Присутствуют и развиты все его слои, кроме блестящего и зернистого. Толщина эпидермиса составляет  $91,67 + 0,14$  мкм, что на  $43,57\%$  больше контроля. Эпидермис образует выросты в подлежащую грануляционную ткань, являющиеся закладкой волос. Ангиогенез и коллагенообразование активны. Площадь, занятая коллагеновыми волокнами, увеличилась на  $23,47\%$  и составила  $38,81 + 0,12$  мкм по сравнению с контролем, а сосудов – на  $33,00\%$  и составила  $1,03 + 0,01$  мкм (см. табл. 1). Тонкие пучки коллагеновых волокон за-

полняют всю дерму рубца. Вместе с тем, индекс макрофагов и тучных клеток, как и индекс дегрануляции тучных клеток, не самые низкие из всех контрольных групп.

Таким образом, на 12-е сутки регенерационного гистогенеза эпидермис достигает наибольшей толщины после введения аутофибробластов, а наибольшей выраженности дифференцировки – после трансплантации в рану дермального эквивалента с гетерофибробластами. Ангиогенез также наиболее активен после введения аутофибробластов. Продукция коллагеновых волокон клетками фибробластического ряда грануляционной ткани, а также присутствие клеток воспаления (макрофагов и тучных клеток) свидетельствует о наиболее благоприятном воздействии на регенерационный гистион трансплантации в рану аутофибробластов. Вместе с тем, воздействие дермального эквивалента с гетерофибробластами также весьма значительное и отличается от воздействия аутофибробластов всего на несколько процентов: площадь коллагеновых волокон – на 2 %, индекс макрофагов – на 5 %, индекс тучных клеток – на 5 %, индекс дегрануляции тучных клеток – на 4 %, что делает такие различия недостоверными.

Работа поддержана проектом «Сеть академической мобильности «РНИЭМ» ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского» и выполнена с использованием инфраструктуры ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И. П. Павлова» и ФГБУН «Институт цитологии РАН».

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Алексеева Н. Т., Ключкова С. В., Никитюк Д. Б.* Морфологическая характеристика тучных клеток при регенерации кожи // Оренбургский медицинский вестник. 2016. Т. 4, № 3(15). С. 13–16.
2. *Андреев Д. Ю., Абрамова Н. В., Блинова М. И., Пинаев Г. П.* Эффективность кожной пластики и дермального эквивалента в лечении обширных язв голени смешанного генеза // Вестник хирургии им. И. И. Грекова. 2013. Т. 172, № 1. С. 104–107.
3. *Винник Ю. С., Салмина А. Б., Дробушевская А. И.* Клеточные технологии и тканевая инженерия в лечении длительно не заживающих ран // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2011. Т. 4, № 2. С. 392–397.
4. *Данилов Р. К.* Раневой процесс: гистогенетические основы. СПб.: ВМедА, 2008.
5. *Одинцова И. А.* Современные аспекты гистологического анализа раневого процесса // Вопросы морфологии XXI века. Вып. 4. Сб. научных трудов «Учение о тканях. Гистогенез и регенерация» / Под ред. И. А. Одинцовой, С. В. Костюкевича. СПб.: Издательство ДЕАН, 2015. С. 51–53.
6. *Шаповалова Е. Ю., Морозова М. Н., Барановский Ю. Г. и др.* Сравнительная характеристика волокнистого состава рубца после введения ауто- и гетерофибробластов в рану у мышей // Здоровье и образование в XXI веке. 2017. Т. 19, № 3. С. 100–104.
7. *Speirman K.* Endogenous suppression of mast cell development and survival by IL-4 and IL-10 // J. Leukos. Biol. 2009. Vol. 85(5). P. 826–836.