

- ции больных с неинфекционными заболеваниями и травмами: материалы V Межрегиональной научно-практической конференции врачей ЦФО, Иваново, 27–28.11.2017. — Иваново, 2017. — С. 77–79.
9. Martins E. Jr., Ferreira A. C., Skorupa A. L., et al. Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 75(6):1116–1121.
 10. Swindle E. J., Hunt J. A., Coleman J. W. A comparison of reactive oxygen species generation by rat peritoneal macrophages and mast cells using the highly sensitive real-time chemiluminescent probe prolasin: inhibition of antigen-induced mast cell degranulation by macrophage-derived hydrogen peroxide. *J. Immunol.* 2002; 169(10):5866–5873.
 11. Kondomerkos D. J., Kalamidas S. A., Kotoulas O. B. In vitro effects of hormones and autacoids on the activity of acid phosphatase in the lysates of endotoxin-activated rat peritoneal and bronchoalveolar macrophages. *Histol. Histopathol.* 2003; 18(4):1103–1113.
 12. Woidacki K., Jensen F., Zenclussen A. C. Mast cells as novel mediators of reproductive processes. *Front. Immunol.* 2013; 4:29–36.
 13. Jensen F., Woudwy M., Teles A., et al. Estradiol and Progesterone Regulate the Migration of Mast Cells from the Periphery to the Uterus and Induce Their Maturation and Degranulation. *PLOS ONE.* 2010; 5(12):e14409. DOI: 10.1371/journal.pone.0014409
 14. Dindyaev S. V., Beeraka N. M., Kasatkin D. V., et al. The Role of Neurogenic Bioamines in Nerve Fibers of Uterus during the Postpartum Involution in Experimental Animal Models. *Current Pharmaceutical Design.* 2021; 27(27):3061–3073. DOI: 10.2174/1381612827666210322141205

УДК 611-018:611.778:611.91+611.9

*Дышлевая Л. М., Барановский Ю. Г., Шаповалова Е. Ю.,
Харченко С. В., Лугин И. А.*

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ПРИ ПОДДЕРЖКЕ ЛЕГОЧНЫМ СУРФАКТАНТОМ МЕНЯЕТ СПЕКТР КОЛЛАГЕНОВЫХ ВОЛОКОН В ЗАЖИВШЕМ ИШЕМИЗИРОВАННОМ ДЕФЕКТЕ КОЖИ У МЫШЕЙ

*Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского,
Симферополь, Российская Федерация*

Аннотация. Целью работы является оценка волокнистого каркаса рубцов после трансплантации в экспериментальную рану дермальных гетерофибробластов при поддержке полинуклеотидов.

Методика работы заключается в иммуногистохимическом анализе типов коллагеновых волокон в дерме рубцов на 23-и сутки заживления раны. Исследование выполнено на 18 половозрелых мышах линии C57/B1. Животные были разделены поровну на контрольную и экспериментальную (ЭГ) группы.

Основные результаты работы показали, что в биоптатах раны в обеих группах присутствует рубец, грануляционная ткань которого находится на третьей (фиброзной) стадии раневого процесса и в которой количественный и качественный состав коллагеновых волокон отличается. В ЭГ в составе рубца преобладают коллагеновые волокна из коллагена I типа, проявляются морфологические признаки формирования сосочкового и сетчатого слоев, что делает его похожим на неповрежденную кожу. Базальная мембрана эпидермиса более зрелая за счет присутствия коллагена IV типа.

Ключевые слова: ишемизированная рана кожи, гетерофибробласты, полинуклеотиды, коллагеновые волокна.

*Dyishlevaya L. M., Baranovskiy Yu. G., Shapovalova E. Yu.,
Harchenko S. V., Lugin I. A.*

TRANSPLANTATION OF CULTURED DERMAL FIBROBLASTS SUPPORTED BY PULMONARY SURFACTANT CHANGES THE SPECTRUM OF COLLAGEN FIBERS IN HEALED ISCHEMIC SKIN DEFECTS IN MICE

V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russian Federation

Abstract. The purpose of the work is to evaluate the fibrous framework of scars after transplantation of dermal heterofibroblasts with the support of polynucleotides into an experimental wound.

The method of work consists of immunohistochemical analysis of the types of collagen fibers in the dermis of scars on the 23rd day of wound healing. The study was carried out on 18 mature mice of the C57/B1 line. The animals were divided equally into control and experimental (EG) groups.

The main results of the work showed that in wound biopsies in both groups there is a scar, the granulation tissue of which is at the third fibrous stage of the wound process and in which the quantitative and qualitative composition of collagen fibers differs. In the EG, the composition of the scar is dominated by collagen fibers from type I collagen; morphological signs of the formation of the papillary and reticular layers appear, which makes it look like intact skin. The basement membrane of the epidermis is more mature due to the presence of type IV collagen.

Keywords: ischemic skin wound, heterofibroblasts, polynucleotides, collagen fibers.

ВВЕДЕНИЕ

Эффективное лечение больных с трофическими язвами нижних конечностей по-прежнему остается актуальной проблемой ангиологии, дерматологии и хирургии, прежде всего в связи с большой распространенностью данного заболевания, трудностями и длительностью лечения, высокой степенью инвалидизации этой категории пациентов, а, следовательно, в связи с важной медицинской, социальной и экономической значимостью [1]. Согласно статистике, в мире от этой патологии страдает до 2 миллионов человек. Около 70% случаев возникно-

вения язв связано с теми или иными нарушениями в функционировании венозно-сосудистого русла, чаще всего с хронической венозной недостаточностью [2]. Заживление раны представляет собой единый активный динамический процесс, который начинается с момента повреждения и заканчивается восстановлением целостности ткани [3]. При этом восстановительные процессы, хотя и имеют строгую последовательность, могут протекать одновременно и обычно накладываются по времени один на другой [4]. Особенно это выражено при хронических ранах.

Новым этапом биоинженерных технологий является поиск способов поддержки трансплантированных культивированных дермальных фибробластов в лечении длительно не заживающих ишемизированных кожных дефектов [5]. Mirastschijski U. с соавт. (2020) продемонстрировали эффективность легочного сурфактанта, обладающего противовоспалительным и антифибротическим действием и выделяемого альвеолоцитами II типа, при заживлении кожных ран [6, 7]. Влияние совместного применения культивированных дермальных фибробластов на формирование волокнистого компонента регенерата ишемизированных дефектов кожи остается мало изученным, что и определило цель данной работы: оценить морфологическое строение, качественный и количественный состав волокнистого каркаса новообразованных рубцов после трансплантации в экспериментальную первичную ишемизированную хирургическую рану культивированных дермальных фибробластов и легочного сурфактанта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 18 белых половозрелых мышах линии C57/Bl в возрасте до 6–7 месяцев, которые содержались в виварии Медицинской академии имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского». Животные были разделены поровну на контрольную и экспериментальную группы. 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 0,3–0,4 мл 2,5%-ного раствора авертина. Кожу 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 для исключения возможности эпителизации раны и закрытия ее кожей области спины [8].

Коммерчески доступные препараты легочных сурфактантов содержат липофильную фракцию после лаважа или экстракции из легких животных. Среди поверхностных эмульгирующих свойств фосфолипидов и гидрофобных белков сурфактанта SP-B и SP-C, которые облегчают абсорбцию и распространение пленки сурфактанта, присутствующие фосфатидилглицерин [9], DPPC18, SP-B31 и SP-C32 обладают противовоспалительными и антибактериальными свойствами [10, 11]. У мышей ЭГ использовали раствор препарата природного сурфактанта — порактант альфа (коммерческое название Куросульф (Curosulf) фирмы Chiesi Farmaceutici (Италия), представляющего собой сложный комплекс, включающий гидрофобные низкомолекулярные протеины, полярные фосфолипиды

и полисахариды, полученные из измельченных легких телят и поросят. Сверху рану закрывали асептической повязкой «Воскопран» с левомеколем, концы которой пришивали к силиконовому кольцу.

Из иссеченной кожи мышей контрольной группы выделяли фибробласты в условиях стерильного бокса с ламинарным потоком воздуха. Кусочки кожи после ферментативного удаления эпидермиса помещали в среду DMEM F12 (ПанЭко) 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 37 °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 (Lonsa) с добавлением 10%-ной телячьей сыворотки и 50 ед/мл пенициллина — стрептомицина (ПанЭко) в чашках Петри в инкубаторе при 37 °С и концентрации CO₂ 5% до достижения 100%-ного конфлюэнта (рис. 1). Для пересева клеток использовали 0,25%-ный трипсин-0,02% ЭДТА. Клетки третьего пассажа с фенотипом CD44+CD90+CD105+CD73+CD 45+CD31-CD34-CD45- использовали для трансплантации в ишемизированную модельную рану кожи мышей экспериментальной группы.

На 23-и сутки после операции у мышей всех групп интраоперационно иссекали образовавшийся рубец и фиксировали 10%-ным забуференным формалином для морфологического исследования. Материал заливали в парафин и окрашивали гематоксилином и эозином. Присутствие коллагеновых волокон, состоящих из коллагена I, II, III и IV типов, определяли непрямым иммуногистохимическим методом.

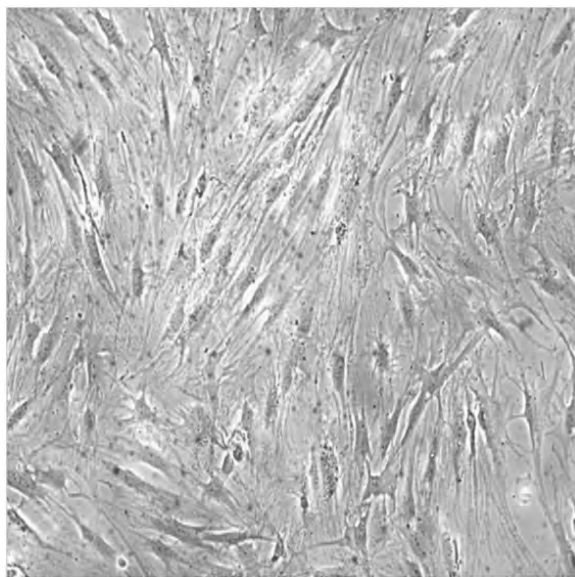


Рис 1. Дермальные фибробласты на стадии конфлюэнта. Третий пассаж. Инвертированный микроскоп. Увеличение: ок. 10, об. 20

Первичными антителами были поликлональные антитела к коллагену I (ab 34710), II (ab 34712), III (ab 7778) и IV (ab 135802) типов фирмы Abcam (США) в разведении 1:100. Вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, наносили на срезы и инкубировали во влажной камере на протяжении 30 минут. Для визуализации клеток, в которых произошло связывание антител с антигенами, на каждый срез наносили 1–3 капли 3,3-диаминобензидина (DAB Substrate Chromogen) Gene Tex Inc (США). Для адекватного представления структуры ткани и ядер клеток срезы докрашивались гематоксилином Майера в течение 3 минут. Было проведено контрольное исследование с целью исключения псевдоположительных и псевдонегативных результатов.

Морфологическое исследование гистологических препаратов проводили с помощью светооптического микроскопа OLIMPUS CX-31 с цифровой камерой OLIMPUS 35050Z. Статистическую обработку цифровых данных проводили с использованием лицензионного программного обеспечения Microsoft Office Excell и Statistica 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У мышей контрольной группы на 23-и сутки после операции по созданию модельной раны образовался белый нормотрофический плотный рубец с четкими границами. Силиконовое кольцо отпало на $12,04 \pm 0,01$ день после операции одновременно с полной эпителизацией раны. На срезах рубца эпидермис представлен не полностью сформированным многослойным плоским частично ороговевающим эпителием, состоящим из 4 слабо развитых слоев, характерных для тонкой кожи. Зернистый слой имеется только на некоторых участках, роговой слой очень тонкий. Базальная мембрана эпидермиса нечетко визуализируется и не содержит коллагеновые волокна, состоящие из коллагена IV типа. Дерма рубца является грануляционной тканью, не образует сосочков, вдающихся в эпидермис, и граница между эпидермисом и дермой ровная. Грануляционная ткань на этом сроке начинает процесс фиброизирования, свойственный третьей стадии раневого процесса, не разделяется на сосочковый и сетчатый слои и состоит в основном из толстых пучков коллагеновых волокон без четкой ориентации по отношению к базальной мембране. Грануляционная ткань образована в основном коллагеновыми волокнами из коллагена I типа. Такие волокна собраны в объемные спиралевидные пучки. В составе этих пучков присутствуют и волокна из коллагена II типа. Волокна из коллагена III типа, образующие тонкий ретикулум, малочисленны. Соотношение коллагеновых волокон из коллагена I, II и III типов составляет 16:14:2. Закладки дериватов кожи (железы и шерстинки) отсутствуют.

У мышей экспериментальной группы после трансплантации в рану дермальных гетерофибробластов и легочного сурфактанта фиксируется тонкий нежный нормотрофический рубец. Его граница с неповрежденной кожей размыта за счет шерстяного покрова. Силиконовое кольцо, удерживающее края раны, отпало на $8,11 \pm 0,01$ день после операции в результате полной эпителизации раны. Рубец ясно просматривается только в центре модельной раны. На срезах в эпидермисе эпителиоциты образуют четыре слоя, характерные для тонкой кожи: базальный, шиповатый, зернистый и роговой. Все слои полноценно развиты, за исключением рогового слоя, который состоит из 1–2 рядов уплощенных кератиноцитов.

Полоса ороговения на поверхности эпидермиса тонкая. В базальной мембране эпидермиса присутствуют коллагеновые волокна из коллагена IV типа, что свидетельствует о функциональной зрелости эпидермиса. По периферии раны имеются закладки дериватов кожи — шерстинки. Под эпидермисом в биоптатах залегает зрелая фибрированная грануляционная ткань третьей стадии раневого процесса. Между шерстинками по периферии биоптатов коллагеновые волокна относительно тонкие, лежат параллельно друг другу и базальной мембране. В глубоких отделах биоптатов и по всей глубине дермы центральных участков биоптатов коллагеновые волокна более объемные, плотно прилегают друг к другу. При иммуногистохимическом окрашивании обнаружено, что соотношение коллагеновых волокон из коллагена I, II и III типов на единице площади среза статистически достоверно больше и составляет 24:11:1. При этом количество грубых коллагеновых волокон из коллагена II типа достоверно снижено по сравнению с контрольной группой. Преобладающим типом коллагеновых волокон в плотной волокнистой неоформленной ткани рубца являются коллагеновые волокна из коллагена I типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, легочный сурфактант оказался безопасным и переносимым [6] и к 23-м суткам трансплантация в модельную ишемизированную рану у мышей дермальных гетерофибробластов и легочного сурфактанта ускоряет заживление раны на $32,64 \pm 0,01\%$, изменяет количественный и качественный состав коллагеновых волокон волокнистого компонента дермы сформированного рубца по сравнению с контрольной группой. На этом этапе заживления раны в экспериментальной группе биоптаты покрыты многослойным плоским частично ороговевающим эпителием, характерным для тонкой кожи спины мышей, в базальной мембране которого присутствуют коллагеновые волокна из коллагена IV типа, что не наблюдается в контроле. Рубец в этой группе нормотрофический и мягкий за счет преобладания коллагеновых волокон из коллагена I типа по сравнению с более грубым рубцом в контроле, где коллагеновых волокон из коллагена II типа статистически достоверно значительно больше. В рубцах экспериментальной группы по периферии биоптатов присутствуют закладки шерстинок, прослеживаются признаки формирования сосочкового и сетчатого слоев, что делает его похожим на неповрежденную кожу.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гавриленко А. В., Воронов Д. А., Бочков Н. П.* Комплексное хирургическое лечение пациентов с хронической ишемией нижних конечностей с использованием генных индукторов ангиогенеза // Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова. — 2013. — № 2. — С. 25–29.
2. *Волков А. М., Чуприна С. В., Петрушина М. Б., Волкова Т. Э.* Комплексное лечение трофических язв нижних конечностей у пациентов с сахарным диабетом и вторичной лимфедемой // Альманах Института хирургии им. А. В. Вишневского. — 2018. — № 1. — С. 188.
3. *Оболенский В. Н.* Хроническая рана: обзор современных методов лечения // РМЖ. — 2013. — № 5. — С. 282–289.

4. *Оболенский В. Н., Родоман Г. В., Никитин В. Г., Карев М. А.* Трофические язвы нижних конечностей — обзор проблемы // РМЖ. — 2009. — № 25. — С. 1647–1662.
5. *Vig K., Chaudhari A., Tripathi S., Dixit S., et al.* Advances in skin regeneration using tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18:789.
6. *Mirastschijski U., Schwab I., Coger V., et al.* Lung surfactant accelerates skin wound healing: a translational study with a randomized clinical phase I study. *Sci Rep.* 2020; 2:2581.
7. *Ruaro B., Salton F., Braga L., Wade B.* The history and mystery of alveolar epithelial type II cells: focus on their physiologic and pathologic role in lung. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 5:2566.
8. *Барановский Ю. Г., Ильченко Ф. Н., Шаповалова Е. Ю.* Способ моделирования трофической язвы у лабораторных мышей в опытной модели // Вестник неотложной и восстановительной хирургии. — 2016. — № 1. — С. 259–261.
9. *Numata M., Kandasamy P., Voelker D. R.* Anionic pulmonary surfactant lipid regulation of innate immunity. *Expert. Rev. Respir. Med.* 2012; 6:243–246.
10. *Kolomaznik M., Nova Z., Calkovska A.* Pulmonary surfactant and bacterial lipopolysaccharide: the interaction and its functional consequences. *Physiol. Res.* 2017; 66:S147–S157.
11. *Olmeda B., Martinez-Calle M., Perez-Gil J.* Pulmonary surfactant metabolism in the alveolar airspace: Biogenesis, extracellular conversions, recycling. *Ann. Anat.* 2017; 209:78–92.

УДК 611.018

Ерофеева Л. М., Дорохович Г. П.

СТРУКТУРА И КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ ТИМУСА ЧЕЛОВЕКА ДЕТСКИХ ВОЗРАСТНЫХ ПЕРИОДОВ

*Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика
А. П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ имени академика Б.В. Петровского»,
Москва, Российская Федерация*

Аннотация. Целью работы является изучение микроанатомии и клеточного состава функциональных зон тимуса у практически здоровых детей от момента рождения до второго детства.

Методика работы заключается в сравнительном изучении гистологической структуры тимуса и в анализе цитогрaмм его структурно-функциональных компонентов у практически здорового человека в различные возрастные периоды от момента новорожденности до второго детства.

Основные результаты работы показали, что в корковом веществе на протяжении всего периода наблюдения происходит нарастание пролиферативной активности лимфоидных клеток и снижение уровня деструктивных процессов, что ведет к накоплению содержания малых лимфоцитов в органе. Первые признаки возрастной инволюции тимуса отмечены во II детском возрасте.

Ключевые слова: гистологическая структура тимуса детей, клеточный состав структурных зон тимуса, тимус человека.