На правах рукописи

**КАНАНЫХИНА**
**Евгения Юрьевна**

# Клеточные и молекулярные механизмы репаративной регенерации кожи живота и спины на модели полнослойной эксцизионной раны

1.5.22 – Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2025

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского"

**Научный руководитель**:
**Ельчанинов Андрей Владимирович,** доктор медицинских наук, доцент

**Официальные оппоненты:**
**Борхунова Елена Николаевна,** доктор биологических наук, доцент, заведующая кафедрой анатомии и гистологии животных имени профессора А.Ф. Климова ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»
**Макаров Максим Сергеевич,** доктор биологических наук, старший научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «НИИ Скорой Помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»

**Ведущая организация:**
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Курский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России), 305041, Российская Федерация, г. Курск, ул. К. Маркса, д.3.

Защита состоится **29 мая 2025 года в 12.00 часов** на заседании диссертационного совета 24.1.204.02 на базе ФГБНУ "РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского" по адресу: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П.Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» по адресу: 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3 и на сайте http://www.med.ru

Автореферат разослан «___» _____ 202 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.1.204.02,
кандидат биологических наук **Тихонова Наталия Борисовна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования**

Репаративная регенерация кожи является важнейшей медицинской проблемой, что связано с широкой распространенностью повреждения кожных покровов при различных заболеваниях и травмах (Jeschke et al., 2020; Vâță et al., 2023). Особенностью течения репаративных процессов у млекопитающих является выраженный воспалительный процесс в месте повреждения, а также образование рубца, который по своим свойствам отличается от исходных тканей. Формирование рубца часто приводит не только к снижению функциональных способностей органа (сократительной функции, лабильности суставов, прочности связок и т.д.), но и к возникновению эстетических дефектов, особенно при рубцовых изменениях кожи (Marshall et al., 2018).

Образование рубца не является непреодолимой закономерностью. Обнаружено, что кожа плодов млекопитающих до определенного этапа пренатального развития способна к регенерации без образования рубца (Rodrigues et al., 2019). Некоторые взрослые млекопитающие также способны к безрубцовому заживлению кожных ран. Характерным примером является регенерация кожи у иглистых мышей (Acomys kempi и Acomys percivali) (Seifert et al., 2012). Однако даже у таких экспериментальных модельных животных как мыши, крысы и кролики обнаружено безрубцовое заживление при сквозной ране ушной раковины (Gawriluk et al., 2016; Маркелова И.В., 1960), а также раны кожи живота (Ефимов Е.А. & Букина Т.В., 1987).

Исходя из приведенных данных, у всех млекопитающих не только в пренатальном, но и постнатальном периоде есть скрытые потенциально активируемые механизмы органотипической репаративной регенерации кожи без образования рубца. Регенерация кожи млекопитающих в пренатальном периоде достаточно хорошо изучена (Rippa et al., 2019). У половозрелых млекопитающих клеточные и молекулярные механизмы репаративной регенерации кожи без образования рубца изучены недостаточно. Понимание данных механизмов позволит приблизиться к разработке способов стимуляции органотипической регенерации кожи.

**Степень разработанности темы исследования**

Заживление полнослойных ран у половозрелых млекопитающих – сложный многоступенчатый процесс, в результате которого, как правило, образуется рубец, лишенный волос, сальных и потовых желез (Walmsley et al., 2015). Однако в ряде случаев восстановление кожи сопровождается лишь незначительным фиброзированием или даже полным отсутствием рубца, например у плодов в I и II триместрах беременности (Rodrigues et al., 2019).

Органотипическая регенерация кожи после нанесения полнослойных ран наблюдается у двух видов африканских иглистых мышей (Acomys kempi и Acomys percivali) (Seifert et al., 2012), у которых восстанавливаются также сальные железы и волосяные фолликулы (Gawriluk et al., 2016).

Рассматривают несколько причин безрубцового заживления: ключевая роль в репарации кожи млекопитающих отводится фазе воспаления (Takeo et al., 2015). В рубцовой и грануляционной ткани длительно незаживающих ран наблюдали большое количество нейтрофилов, что подчеркивает их роль в стимуляции фиброзирования (Qian et al., 2016). Пониженное содержание нейтрофилов у взрослых мышей сопровождается более быстрым закрытием раневой поверхности (Wier et al., 2021), а слабая выраженность или полное отсутствие лейкоцитарной инфильтрации приводит к заживлению кожной раны без рубцов у плода (Larson et al., 2010). Для крови иглистых мышей Acomys также характерна нейтропения (Brant et al., 2016). Другим важным участником раневого процесса являются макрофаги, продуцирующие широкий спектр цитокинов, в том числе TGF-β, стимулирующего синтез компонентов межклеточного вещества (Marshall et al., 2018). Мыши, лишенные транскрипционного фактора PU.1 (отсутствуют в гемопоэзе лейкоцитарные диффероны, в том числе моноцитарная клеточная линия), способны к эффективному заживлению ран по типу новорожденных животных и без последующего рубцевания (Martin et al., 2003). У иглистых мышей в кожной ране уровни F4/80-макрофагов и провоспалительных цитокинов низкие, что препятствует чрезмерному синтезу коллагена и приводит к органотипической регенерации кожи у мышей Acomys (Gurtner et al., 2008; Mascharak et al., 2022). Что касается тучных клеток, то полученные данные противоречивы. В ранах плода тучных клеток меньше, и они менее зрелые по сравнению с половозрелыми особями (Larson et al., 2010). Напротив, в кожной ране мышей Acomys было больше тучных клеток, чем у мышей Mus musculus (Brant et al., 2016).

Ключевое событие образования рубца – синтез коллагена. Помимо компонентов межклеточного вещества, фибробласты синтезируют матриксные металлопротеиназы (ММП). Во время безрубцового заживления повышается доля ММР относительно активности их ингибиторов, в частности тканевых ингибиторов металлопротеиназ (ТИМП). Это соотношение фермент-ингибитор способствует ремоделированию межклеточного вещества в направлении меньшего содержания коллагена (Dang et al., 2003; Chen et al, 2007). В ранах слизистой оболочки полости рта отношение ММП к ТИМП также повышено и

сопоставимо с таковым в ранах кожи млекопитающих в пренатальном периоде (Dang et al., 2003).

Органотипической безрубцовой регенерации кожи взрослых млекопитающих удается добиться с помощью различных методов стимуляции репарации: методами СВЧ-криодеструкции (Борхунова и др., 2008), введением в рану суспензии аутологичных мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (Борхунова, Надеждин, 2021), аппликацией микроигольчатых пластырей (Hu и др. 2023), и другими методами (Cao и др., 2024), число которых увеличивается пропорционально открытию новых механизмов безрубцового заживления.

Особый интерес представляет органотипическая регенерация кожи живота у крыс (Ефимов Е.А., Букина Т.В., 1987). Кожа живота крысы внешне не отличается от кожи спины. Однако полнослойная рана кожи живота заживает без образования рубца, а в области раны кожи спины неизменно формируется рубец. Морфологические и молекулярные механизмы, лежащие в основе этого феномена, недостаточно изучены, а подавляющее большинство работ по регенерации кожи у лабораторных животных выполнено на коже спины. Такой односторонний подход обедняет понимание закономерностей регенерации кожи у млекопитающих. На основе изложенного сформулирована цель работы.

**Цель работы** – установить особенности реализации клеточных и молекулярных механизмов репаративной регенерации кожи живота и спины на модели полнослойной раны у крыс.

**Задачи исследования**

1. Сравнить толщину эпидермиса, дермы и гиподермы интактной кожи в области спины и живота у половозрелых самцов. Выявить морфологические отличия интактной кожи спины и живота у половозрелых самцов крысы линии Вистар.
2. Провести сравнительную оценку скорости заживления эксцизионной полнослойной раны кожи живота и спины.
3. Определить активность клеточной пролиферации, экспрессию генов-маркеров прогениторных клеток при заживлении полнослойной эксцизионной раны кожи живота и спины
4. Охарактеризовать динамику числа макрофагов и фибробластов, участвующих в раневом процессе при репаративной регенерации кожи живота по сравнению с кожей спины.

5. Выявить особенности динамики формирования коллагеновых и эластических волокон, а также молекулярные механизмы, регулирующие эти процессы, при заживлении полнослойной раны живота и спины

6. Провести биомеханические испытания для сравнительной оценки регенератов кожи спины и живота по прочностным характеристикам.

**Объект и предмет исследования –** модели репаративной регенерации кожи живота и спины после нанесении полнослойной эксцизионной раны у половозрелых самцов крыс.

**Диссертация соответствует паспорту научной специальности** 1.5.22 – клеточная биология согласно пункту 10.

**Научная новизна**

Показано, что у крыс интактная кожа спины и живота наряду с общими закономерностями имеет регионарные особенности структурной организации. Кожа живота тоньше по сравнению с кожей спины за счет более тонкой дермы и гиподермы. При этом для кожи живота характерна более высокая плотность расположения волосяных фолликулов, что соотносится с более высокой экспрессией генов-маркеров прогениторных клеток - *Sox9, Lgr6, Gli1, Lrig1*.

Впервые на основании анализа комплекса количественных и качественных показателей доказано, что скорость заживления стандартной полнослойной раны кожи на животе у половозрелых крыс превышает скорость заживления такой же раны кожи спины. На животе рана закрывается через 14 суток после операции, на спине – через 30 суток, при этом прочность тканей в области раны кожи живота восстанавливается на 58%, а на спине только на 17,5%.

Установлено, что в процессе заживления раны на коже в области живота, по сравнению с кожей спины, регенерат характеризуется меньшим числом макрофагов, большим количеством активированных фибробластов и преобладанием коллагена III типа на ранних стадиях заживления. В основе лучшего восстановления волокнистого компонента регенерата кожи на животе лежит более высокое соотношение экспрессии генов *Mmp9/Timp1* в данной области.

На основании проведенных исследований разработана методология оценки процесса репаративной регенерации кожи, включающая методику моделирования стандартной раны и комплексную оценку по морфологическим, планиметрическим, микроморфометрическим и иммуногистохимическим критериям.

**Теоретическая и практическая значимость**

Методика моделирования стандартной раны кожи и комплексной оценки интактной кожи и регенерата на разных стадиях формирования по морфологическим, планиметрическим, микроморфометрическим и иммуногистохимическим критериям позволила выявить динамику структурных и молекулярных механизмов, включающихся при репарации кожи, а также их топические отличия, влияющие, в конечном итоге, на структурно-функциональные характеристики регенерата. Данная методика, а также комплекс данных о количественных и качественных характеристиках регенерата могут быть использованы при проведении аналогичных исследований, а также при тестировании лекарственных препаратов.

Полученные в исследовании данные расширяют представления о клеточных механизмах регенерации кожи млекопитающих. Установлены выраженные различия в течении репаративной регенерации кожи живота по сравнению с кожей спины. Рана кожи живота закрывается за более короткий промежуток времени, к 14 суткам, на спине – к 30 суткам. В основе такой динамики лежит то, что в области раны кожи живота в ходе репаративного процесса отмечается большее число FAPα + активированных фибробластов и меньшее число CD68+ макрофагов. Кроме того, в коже живота отмечается большее число прогениторных эпителиальных клеток, ассоциированных с волосяным фолликулом, что подтверждается экспрессией соответствующих маркерных генов - *Sox9, Lgr6, Gli1, Lrig1,* и большим числом волос в коже живота. Помимо большей скорости заживления, в области раны кожи формируется более прочная ткань, что говорит о репаративной регенерации максимально приближенной к тканеспецифичному течению.

Данные о динамике репаративного процесса в коже живота, а также о клеточных и молекулярных особенностях его течения могут быть использованы для разработки методов стимуляции органотипической регенерации. В основе таких подходов может служить стимуляция синтеза матриксных металлопротеиназ, подавление чрезмерного воспаления, а также использование эпителиальных прогениторных клеток.

**Методология и методы исследования** заключаются в системном и комплексном анализе полученных данных, а также результатов исследования отечественных и зарубежных ученых в области молекулярных, клеточных механизмов регенерации кожи млекопитающих в пре- и постнатальном периоде, роли воспаления в данном процессе, участии прогениторных клеток. В работе использованы следующие методы: модель репаративной регенерации кожи после полнослойной раны в области живота и спины,

иммуногистохимическое окрашивание, морфометрические методы, световая и флуоресцентная микроскопия, ПЦР в реальном времени, статистический анализ.

**Положения, выносимые на защиту**

1. Установлено, что кожа живота и спины различаются особенностями строения: кожа живота тоньше и в ней отмечается более высокая плотность расположения волосяных фолликулов, а также более высокая экспрессия ассоциированных с ними генов-маркеров стволовых клеток (*Sox9, Lgr6, Gli1, Lrig1*) по сравнению с кожей спины.

2. Закрытие раны кожи живота происходит вдвое быстрее, чем на спине: за 14 и 30 суток соответственно. В основе более быстрого течения репаративного процесса в области живота лежит большее число активированных фибробластов, а также более высокая пролиферативная активность клеток в интерфолликулярном эпидермисе и волосяном влагалище.

3. Регенерат кожи живота отличается большей прочностью по сравнению с регенератом кожи спины. Более эффективное восстановление кожи живота связано со сниженным числом CD68+макрофагов, а также более высоким соотношением экспрессирующихся генов Mmp9/Timp1, что приводит к преобладанию на промежуточных этапах раневого процесса коллагена III типа и появлению эластических волокон.

**Степень достоверности результатов**

Достоверность результатов обеспечивается достаточным объемом данных для каждой экспериментальной группы, достаточным количеством групп сравнения в экспериментах, комплексным методическим подходом, адекватным применением методов статистического анализа, критической оценкой полученных результатов при сравнении с данными современной научной литературы.

**Апробация результатов исследования**

Материалы диссертации доложены на Всероссийской научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2014), II Национальном Конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2015), XVIII Ежегодном научном форуме «Стоматология 2016» (Москва, 2016), Научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2016) и VIII Съезде Научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов России (Воронеж, 2019), Всероссийской научной конференции с международным участием «Регенеративная биология и медицина» (Москва, 2021), Международной научной конференции «Университетская наука: взгляд в

будущее» (Курск, КГМУ, 8-9 февраля, 2024), межлабораторной конференции Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского (Москва, 28 октября 2024 г.).

**Личное участие автора** заключалось в планировании и проведении исследования, статистической обработке, обобщении и анализе полученных результатов, подготовке публикаций.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 13 работ, из них 4 статьи в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук.

**Внедрение результатов исследования.**

Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России.

**Структура и объем диссертации.**

Диссертационная работа изложена на 141 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Работа иллюстрирована 54 рисунками и 15 таблицами. Список литературы включает 149 источников из них 15 отечественных и 134 зарубежных.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

***Методика операций***

Все манипуляции с животными осуществляли в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977) и с разрешения Локального этического комитета ФГБНУ «РНЦХ им. Акад. Б.В. Петровского» (Протокол заседания ЛЭК №3 от 22.03.24 г.). Эксперимент выполнен на 150 самцах крыс Вистар массой тела 250–300 граммов. Животные были разделены на две группы: нанесение раны на спине и на животе; а также подгруппы по сроку выведения: 3, 7, 14, 20, 30 и 60 суток после операции, животных выводили из эксперимента с помощью $CO_2$-камеры.

*Нанесение раны*

Животных наркотизировали внутрибрюшинным введением смеси препаратов Золетила (Золетил ® 100, Virbac, Франция) и Ксилазина, в дозировке 3мг/100 гр и 2 мг/100гр, соответственно, предварительно шерсть в зоне нанесения раны выстригали. На спине крыс с помощью металлической трубки (диаметр 16 мм), края которой были смочены в черной туши, намечали края раны на расстоянии 15 мм от пересечения линии, соединяющей нижние края лопаток с продольной осью туловища. Затем иглу от инсулинового шприца обмакивали в тушь и по трафарету наносили метки (татуировку) в виде точек, обозначающих две окружности, отстоящих на 5 мм и 10 мм от краев раны. Далее хирургическими ножницами иссекали круглый полнослойный кожный лоскут. На животе крыс аналогичным образом намечали края раны на расстоянии 5–10 мм от линии, соединяющей основания бедренных костей. Затем так же, как на спине, наносили проникающие метки (татуировку) кольцеобразно на расстоянии 5 мм и 10 мм от краев раны и иссекали полнослойный кожный лоскут.

***Оценка площади раневой поверхности и околораневой зоны***

Для наблюдения за контракцией раны и изменением расположения меток тушью место повреждения фотографировали на разных сроках: до операции, сразу после иссечения кожного лоскута, через 3, 7, 14, 20 и 30 суток после операции. Фотографии раневой поверхности, полученные на различных сроках после операции, обрабатывали в программе Adobe Photoshop CC: обводили раневую поверхность по краю, измеряли ее площадь в квадратных миллиметрах; площадь околораневой зоны определяли, соединяя плавной линией тушевые метки внутренней окружности, отстоящей на 5 мм от краев раны.

***Оценка толщины зоны повреждения и околораневой области***

Из цифровых изображений срезов (общее увеличение х50), окрашенных по Маллори, получали панорамы с помощью программы Microsoft Ice, которые затем обрабатывали в Adobe Photoshop CC, измеряя толщину (в мкм) зоны повреждения и околораневой области.

***Тест на прочность при растяжении (разрыве)***

Было сформировано 2 экспериментальные группы: контрольная – интактные крысы, и опытная. С целью определения степени функционального восстановления ткани кожи живота и спины был проведен тест на прочность при растяжении (разрыве) на образцах кожи размером 0,5х3 см. На испытательной системе Zwick/Roell Z010 (лаборатория материаловедения, ФГБУ НМИЦ «ЦНИИСиЧЛХ» Минздрава России) определяли усиление при

разрыве кожных рубцов (в Ньютонах, при скорости движения траверсы 20 мм/мин), образованных спустя 20, 30 и 60 суток после нанесения полнослойной раны, и контрольной интактной кожи.

***Гистологическое исследование***

Материал для гистологического исследования брали на 3-и, 7-е, 14-е, 20-е и 30-е сутки после операции. Контролем служил кожный лоскут, иссеченный во время операции. Кожу фиксировали в жидкости Карнуа, затем обезвоживали в трех сменах 100% изопропанола и заключали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм депарафинировали и окрашивали пикросириусом красным, азур-эозином, по Маллори и гематоксилином-эозином.

***Подсчет густоты волосяного покрова***

Тангенциальные криосрезы интактной кожи спины и живота, окрашенные гематоксилином-эозином, фотографировали на микроскопе Leica DFC 295 (Германия), при общем увеличении х100. В программе Adobe Photoshop CC на снимках определяли площадь кадра и количество волосяных луковиц на нем и, тем самым, вычисляя плотность волосяного покрова на 1 $мм^2$.

***Иммуногистохимическое исследование***

Кожные лоскуты сразу после взятия замораживали в жидком азоте и хранили при температуре –80°С. Далее делали криосрезы толщиной 5–7 мкм и окрашивали первыми антителами к эластину (ab21610, Abcam, США), CD68 (ab125212, Abcam, США), FAPα (ab28244 Abcam, США), Ki-67 (ab16667, Abcam, США), к коллагену I (RAQ C11, ИМТЕК, Россия), Cytokeratin15 (sc-47697, Santa Cruz Biotechnology, США), Lrig1(sc-514577, Santa Cruz Biotechnology, США), Gli1 (sc-515751, Santa Cruz Biotechnology, США), Sox9 (ab3697, Abcam, США) и вторыми козьими анти-кроличьими антителами (ab97050, Abcam, США) и анти-мышиными (ab6785, Abcam, США) следуя рекомендациям производителя. В качестве контроля неспецифического связывания использовали срезы, окрашенные только вторыми антителами. Исследование проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000 B (Leica Microsystems, Германия).

***Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени***

Фрагменты ткани из области повреждения помещали в буфер РНК-лейтер (QIAGEN, Нидерланды), инкубировали в течение 1 сут. При +4°С, хранили при -80°С. В качестве индивидуального контроля использовали ткань удаленных лоскутов кожи. Из полученных образцов выделяли тотальную РНК с помощью набора Rneasy Fibrous tissue Mini Kit (QIAGEN, Нидерланды). Синтез кДНК с матрицы полученной тотальной РНК осуществляли с использованием готового

набора реактивов MMLV RT kit (Евроген, Россия). С полученными кДНК ставили ПЦР, используя готовые наборы реактивов qPCRmix-HS SYBR, содержащие флуоресцентный интеркалирующий краситель Sybr Green I (Евроген, Россия). Праймеры для ПЦР подбирали с помощью on-line программы Primer-BLAST в соответствии с общепринятыми требованиями. Выбранные праймеры (Табл.1) синтезированы фирмой Евроген (Россия). Для анализа экспрессии генов использовали специализированную программу REST 2009 (разработана M. Pfaffl и QIAGEN). В качестве эндогенного контроля использовали ген домашнего хозяйства *Gapdh*.

Таблица 1. Последовательность праймеров

| Ген | Последовательность праймера 5'-3' | |
|---|---|---|
| | прямой праймер | обратный праймер |
| *Gapdh* | gcgagatcccgctaacatca | cccttccacgatgccaaagt |
| *Timp1* | cagacagctttctgcaactc | cacagcgtcgaatcctttga |
| *Timp2* | atgcagacgtagtgatcagg | agtcacagagggtaatgtgc |
| *Mmp2* | cagacaaagagttggcagtg | tcaggtgtgtaaccaatgatc |
| *Mmp9* | atggtttctgccccagtgag | caccagcgataaccatccga |
| *Sox9* | agaggccaccgaacagac | tgctcagctcaccgatgtc |
| *Lgr6* | aggatggcatcatgctgtca | ccgtgaggttgttcatactg |
| *Gli1* | caaggcccagtacatgctg | tcctattctggtgcttggca |
| *Lrig1* | gaggacctggggtagtaggc | aaccatattgcaggcgctca |

***Статистический анализ***

Статистический анализ полученных данных проводили при помощи программного пакета SigmaStat 3.5 (Systat Software, Inc.). В случае нормального распределения внутри выборки определяли показатели среднего значения и среднеквадратичного отклонения. Данные сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа и теста Холма–Сидака. Если распределение отличалось от нормального, данные представляли в виде медианы и 25% и 75% квартилей (Me (Q25÷Q75)), сравнения проводили с помощью рангового дисперсионного анализа Краскала–Уоллеса и теста Данна при уровне значимости $p$ <0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

***Сравнение строения интактной кожи спины и живота.***

Кожа спины и живота отличается рядом показателей, прежде всего толщиной дермы и гиподермы, которые значительно меньше в области живота ($p$ <0,05) (Табл.2). Толщина эпидермиса не различались достоверно ($p$ >0,05). В итоге толщина кожи живота была значительно тоньше кожи спины ($p$ <0,05). Помимо толщины обнаружены различия в плотности распределения волосяных

фолликулов - их количество было достоверно больше в коже живота ($p$ <0,05) (Рис.1).

Таблица 2. Толщина слоев интактной кожи спины и животы

| | Эпидермис, мм | Дерма, мм | Жировая клетчатка, мм | Общая толщина, мм |
|---|---|---|---|---|
| Спина | 0,02±0,007 | 0,86±0,22* | 0,27±0,06* | 1,09±0,27* |
| Живот | 0,02±0,007 | 0,44±0,12* | 0,20±0,03* | 0,74±0,14* |

* - статистически значимые отличия параметра между спиной и животом.

Рисунок 1. Продольные срезы кожи, окрашенные гематоксилином-эозином, масштабный отрезок 100 мкм (А). Количество волосяных фолликулов на коже спины и живота на мм$^2$, * обозначены статистически значимые различия между группами, $p$ <0,001 (Б).

***Изменения площади и толщины раны и околораневых зон после иссечения полнослойного лоскута кожи***

Процесс заживления раны на спине происходил с образованием струпа и соединительнотканного рубца к 30-м суткам (Рис. 2а). Сразу после создания дефекта площадь раны на спине (красная зона на Рис. 2б) статистически значимо увеличивалась на 15,4% по сравнению с намеченной областью (Рис. 3 а). На 7-е сутки после операции площадь раны составила 76,8% от начальной. К 14-м суткам поверхность раны была полностью эпителизирована, ее площадь составила 17,2% от изначально намеченной площади контура дефекта. К 20-м суткам сохранялся плотный струп, площадь раны уменьшилась до 4,3% от намеченной. К 30-м суткам струп практически отсутствовал, рубец был хорошо заметен.

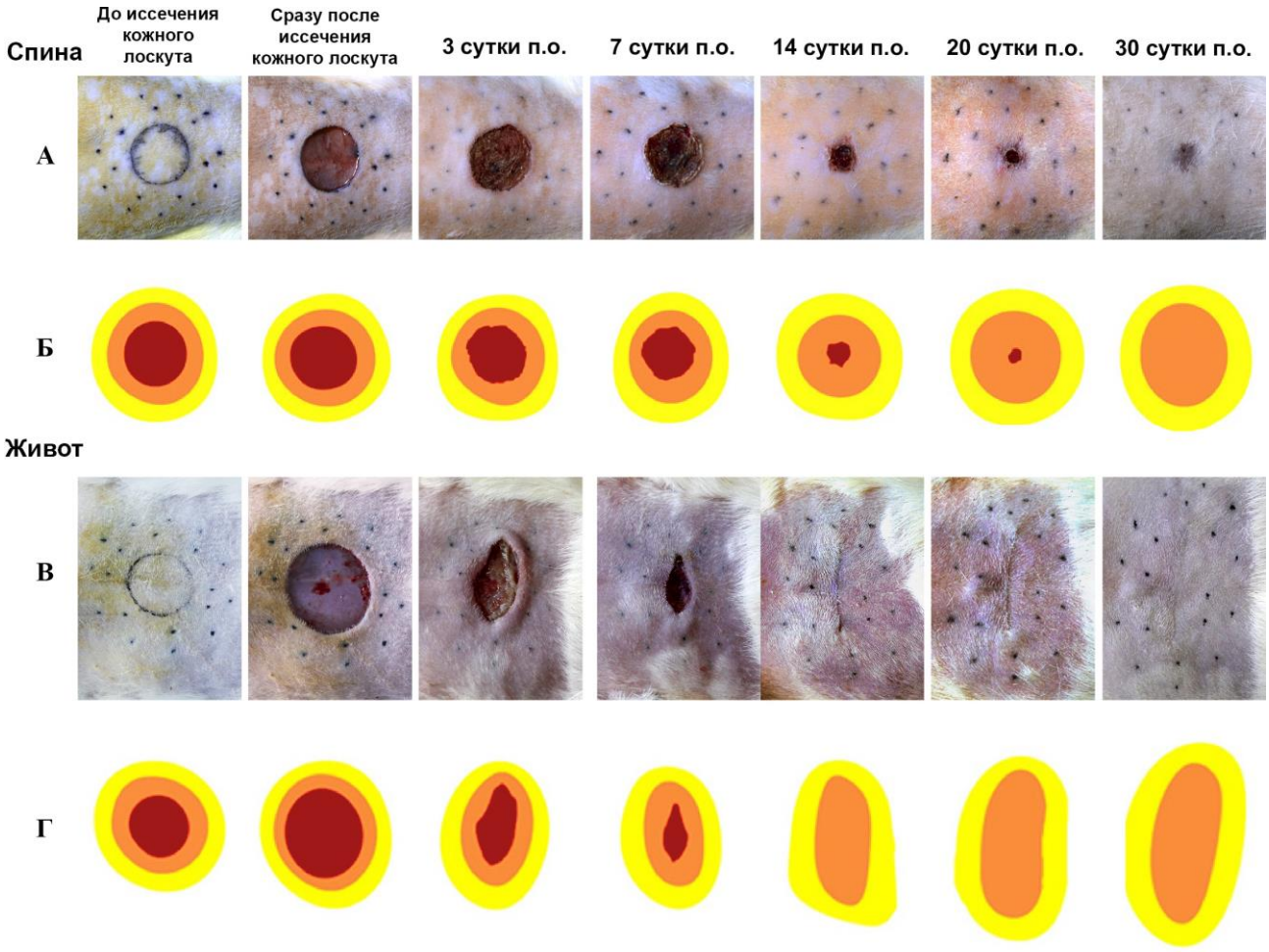


Рисунок 2. Динамика заживления кожной раны. А – фотографии полнослойной раны на спине на разных сроках после операции, Б – площадь раневой (красная), околораневой (оранжевая) и отдаленной (желтая) областей кожи спины, В – фотографии полнослойной раны на животе на разных сроках после операции, Г – площадь раневой (красная), околораневой (оранжевая) и отдаленной (желтая) областей кожи живота.

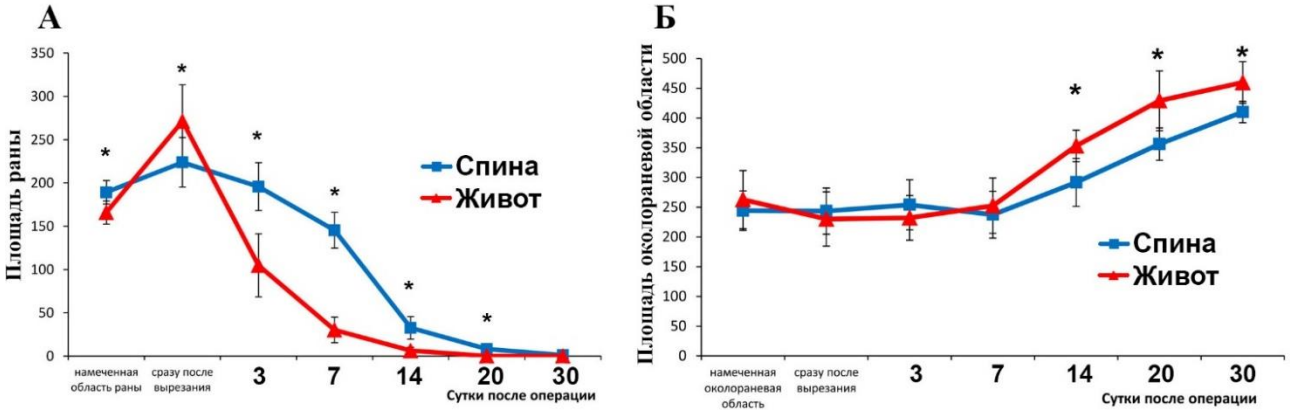


Рисунок 3. Изменения площади раны (А) и околораневой области (Б) спины и живота в ходе заживления. Синие линии – спина, красные линии – живот. По оси абсцисс – сутки после операции, по оси ординат – площадь раны в квадратных миллиметрах (средние значения± стандартное отклонение).

Сразу после иссечения кожного лоскута и на протяжении последующих 7 суток площадь околораневой зоны достоверно не изменялась (оранжевая зона на Рис. 2 Б). К 14-м суткам околораневая область статистически значимо увеличивалась на 13,2% от начального значения. Эта же тенденция сохранялась на 20-е и 30-е сутки (соответственно, 135,6% и 154,6% от изначально намеченной площади).

До иссечения лоскута кожи на спине площадь, ограниченная околораневой зоной (площадь намеченной области раны и зона на расстоянии 5 мм от нее), составляла 423,5±28,7 мм$^2$ (среднее±стандартное отклонение) (Рис.3Б). К 7-м суткам околораневая зона за счет наличия раны и контракции уменьшилась до 365,4±29,5 мм$^2$. К 30-м суткам она достигла 411,2±17,8 мм$^2$, статистически значимо не отличаясь от площади, ограниченной околораневой областью, до операции.

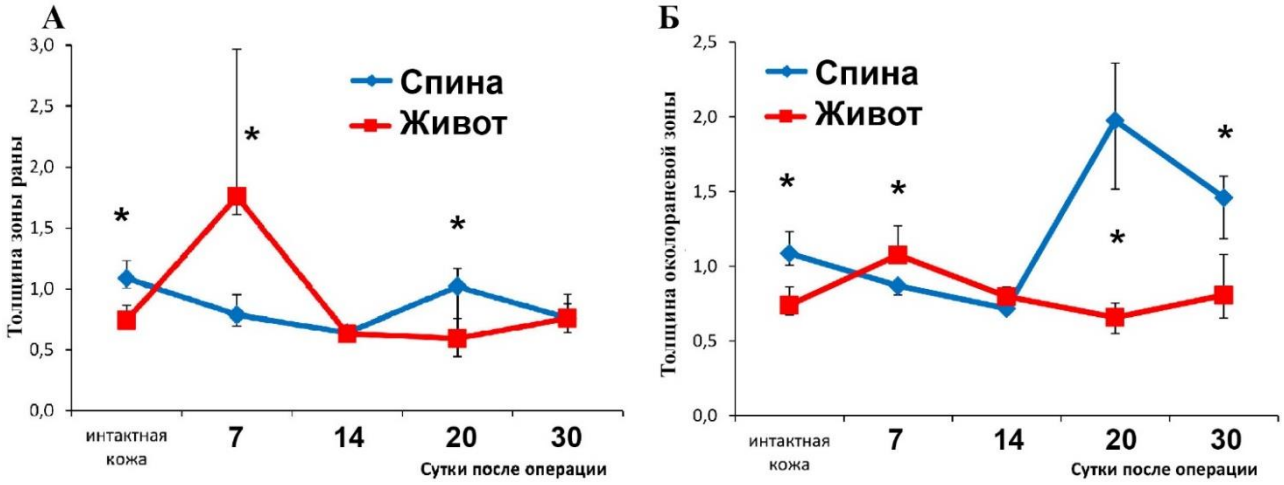


Рисунок 4. Динамика изменения толщины раневой зоны (А) и околораневой области (Б) спины (синяя линия) и живота (красная линия) в ходе заживления. По оси абсцисс – сутки после операции, по оси ординат – толщина кожи, мм (Me (Q25÷Q75)).

На 7-е сутки после операции область повреждения была статистически значимо тоньше интактной кожи спины (Рис. 4 А). К 14-м суткам толщина зоны раны на спине продолжала статистически значимо уменьшаться. К 20-м суткам после операции толщина раневой области на спине увеличилась, сравнявшись с толщиной интактной кожи спины, однако на 30-е сутки после операции толщина зоны раны стала меньше интактной. Через 7 и 14 суток после операции толщина околораневой зоны достоверно уменьшилась по сравнению с толщиной кожи до операции (Рис. 4 Б). К 20-м же суткам толщина околораневой зоны на спине увеличилась по сравнению с толщиной кожи до операции. К 30-м суткам после операции толщина околораневой зоны кожи

спины достоверно уменьшилась по сравнению с 20-ми сутками после операции, но оставалась больше, чем у интактной кожи.

Репарация раны на животе происходила иначе. В ходе заживления струп не образовывался, была лишь тонкая корка из засохшего экссудата. К 20–30-м суткам место раны визуально почти не отличалось от окружающей кожи (Рис. 2 В). Сразу после иссечения кожного лоскута площадь раны на животе достоверно увеличилась на 61,1% по сравнению с изначально намеченной тушью областью (Рис. 3А). Затем последовало стремительное уменьшение площади раны, и на 7-е сутки после операции площадь раны составила всего 18,2% от начальной величины. К 14-м суткам рана полностью закрылась, площадь визуализированного рубца составила 3,8% от намеченной. Околораневая область достоверно увеличилась лишь к 14-м суткам, достигая 134,4% от намеченной (Рис. 3 Б). Затем, к 20-м суткам, было увеличение еще на 28,9%, и без изменений на 30-е сутки.

В ходе заживления раны на животе уже к 20-м суткам площадь околораневой зоны увеличилась до 429±50 мм$^2$ и достигла суммы площадей иссеченного лоскута и зоны на расстоянии 5 мм от него – 428,7±47 мм$^2$. Это отличалось от заживления раны на спине, где подобное увеличение площади было достигнуто лишь к 30-м суткам.

На 7-е сутки после операции на животе толщина ткани в зоне раны значительно увеличилась по сравнению с интактной кожей (Рис. 4 А). К 14-м суткам после операции толщина зоны повреждения на животе уменьшилась и стала меньше толщины интактной кожи. На 20-е сутки после операции толщина зоны раны живота продолжала уменьшаться по сравнению с 14-ми сутками и толщиной интактной кожи, но к 30-м суткам после операции толщина зона раны достигла интактной кожи. Динамика изменения толщины околораневой зоны в области живота в ходе заживления в целом оказалась такой же, как в области повреждения (Рис. 4 Б). К 7-м суткам после операции на животе околораневая область значимо увеличилась по сравнению с толщиной до операции. На 14-е сутки после операции на животе толщина околораневой области достигла толщины кожи до операции. К 20-м суткам после иссечения лоскута кожи на животе толщина околораневой области значимо уменьшилась по сравнению с 14-ми сутками и интактной кожей. На 30-е сутки после операции на животе толщина околораневой зоны не отличалась от толщины интактной кожи.

***Характеристика воспалительного инфильтрата***

Для выяснения морфологических особенностей формирования рубца на животе был изучен состав воспалительного инфильтрата, в частности его

важнейших клеточных компонентов – макрофагов и фибробластов, а также соединительнотканных волокон в составе рубцовой ткани.

На 3-и сутки гистологическая картина области повреждения на спине и животе практически не различалась. Раневой дефект был заполнен массами фибрина и типичным воспалительным инфильтратом, представленным мононуклеарными клетками и полиморфноядерными лейкоцитами. Доли CD68-положительных клеток (макрофагов) в инфильтрате на спине (28,6±0,92%) и животе (27,9±1,17%) на 3-и сутки после операции статистически значимо не различались ($p$=0,665), на 7-е сутки процент CD68-положительных клеток в ране на животе (23,3±0,82%) значимо уменьшался по сравнению со спиной (30,5±0,85%, $p$<0,001, Рис. 5). Сниженная макрофагальная инфильтрация также наблюдается у плодов при безрубцовом заживлении (Cowin et al, 1998).

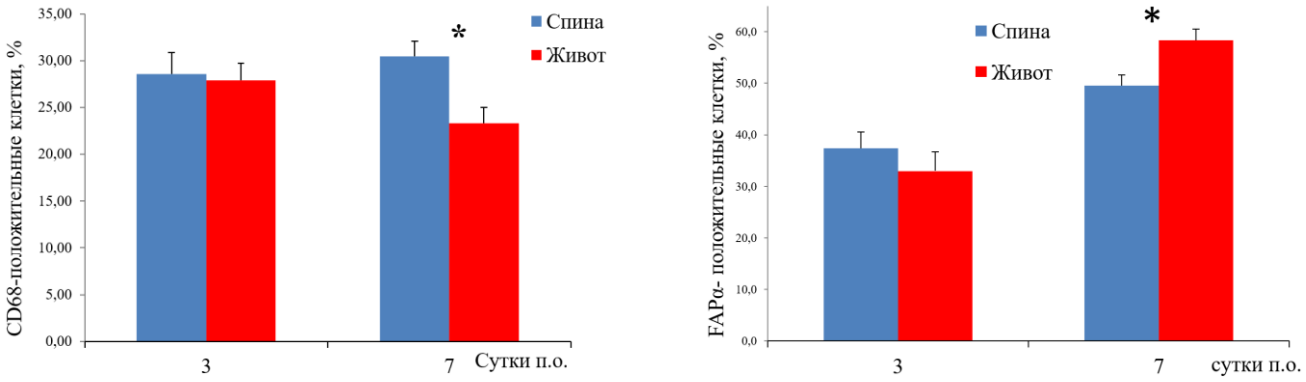


Рисунок 5. Доля CD-68+ макрофагов и активированных FAPα+ фибробластов в области раны на 3 и 7 сутки после операции.

Активированные фибробласты в раневой области были идентифицированы с помощью антигена к белку FAP-α, который в норме не экспрессируется и в большинстве случаев выявляется в фибробластах при различных патологических состояниях – канцерогенезе, фиброзе, артрите, ранениях или воспалении. Доли FAPα-положительных клеток на спине и животе на 3-и сутки после вырезания кожного лоскута статистически значимо не различались, составляя, соответственно, 37,4±0,38% и 33,0±0,44% ($p$=0,088). Как на спине, так и на животе доля FAPα-положительных клеток значимо возрастала от 3-х к 7-м суткам (z-тест, $p$<0,001), однако в ране на животе активированных фибробластов было достоверно больше (58,3±0,20%) по сравнению со спиной (49,5±0,16%, $p$=0,006, Рис. 5). Обращают на себя внимание резкие различия в расположении активированных фибробластов в области раны: если на спине они выстраиваются параллельно, то на животе образуют сеть, создавая тем самым условия для различной ориентации

коллагеновых волокон в рубцах, локализованных на спине и животе, что мы отмечали ранее.

***Характеристика волокнистого компонента регенерата***

Интересно проследить, отражаются ли региональные различия в составе воспалительного инфильтрата на количестве и соотношении коллагена разных типов в формирующейся рубцовой ткани.

В интактной коже и живота, и спины преобладает коллаген типа I, объемная доля которого составляет 50–60%, коллагена типа III – менее 1% (Рис.6). Через 7 суток после эксцизионной травмы объемные доли коллагена как типа I, так и типа III составляют в среднем около 10%. В течение первого месяца после операции эти параметры значимо увеличиваются: объемная доля коллагена типа I возрастает до 11% на спине и 27% на животе, в то время как доля коллагена типа III довольно высока: 5% на спине и 1,2% на животе, что свидетельствует о незрелости рубцовой ткани (Рис.6).

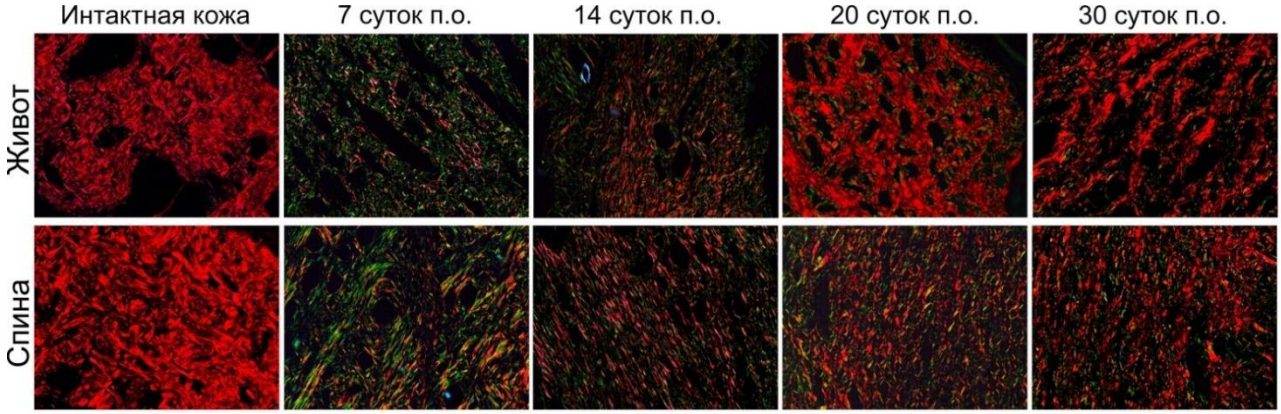


Рисунок 6. Коллаген I (красный) и III (зеленый) типа в рубце на различных сроках после операции. Окраска пикросириусом красным, поляризационная микроскопия.

Так как индивидуальные значения объемной плотности сильно варьируют, анализ соотношения коллагена типа I/III позволяет лучше проследить топографические различия в динамике коллагеногенеза при репарации кожной раны. В интактной коже живота крыс доля тонкого (незрелого) коллагена III типа больше (в 2,6 раза) по сравнению со спиной. Большая доля коллагена III типа характерна и для кожи грызунов, раны которых заживают без образования рубцов (Merkel et al., 1988; Seifert et al., 2012). В 30-суточном регенерате на коже живота наблюдали расположение волокон коллагена, близкое к таковому в интактной коже, и сеть эластических волокон, что совершенно не характерно для рубцовой ткани. К 60-м суткам

после травмы соотношение коллагена I/коллагена III в регенерате на коже живота уже не отличалось от интактной кожи, по размерам рубец значительно меньше такового на спине. На этом сроке прочность кожи живота на разрыв достигает 58% прочности от контроля, а на спине 17,4% от контроля (Табл.3), что свидетельствует о более быстром и полном функциональном восстановлении кожи живота

Как известно, в состав межклеточного вещества соединительной ткани входят также эластические волокна, обусловливающие ее устойчивость к деформациям и дополнительную прочность. Объемная доля эластина в интактной коже живота и спины, определенная с помощью морфометрии иммуногистохимически окрашенных срезов кожи, статистически значимо не различалась, составляя, соответственно, 9,1% и 10,0%. Через 30 суток после нанесения раны на спине образовался классический рубец, не содержащий эластина, а на животе его объемная доля эластина статистически значимо возросла в 3,4 раза до 31,0% ($p$ <0,001).

***Прочностная характеристика рубцов- восстановление функциональности кожи***

Пространственное расположение коллагеновых волокон и их соотношение имеют решающее значение для поддержания необходимой плотности и механической прочности рубцовой ткани (Rajan V & Rz, 2008). Интактная кожа спины и живота имеют разную прочность на разрыв, что согласуется с литературными данными (Karimi & Navidbakhsh, 2015). В нашем эксперименте интактная кожа спины более чем в 2 раза прочнее кожи живота (Табл.4). К 30-м суткам заживления мы наблюдали значимо большую прочность на разрыв регенерата на животе: 7,1±1,6 Н/м2 по сравнению с 4,7±1,2 Н/м2- на спине, что означает восстановление прочности до 41.2% и 11.7% от исходной соответственно. К 60 суткам прочность рубцов увеличилась, достигая 58,1% и 17,4% от исходной на животе и спине соответственно. Полученные данные коррелируют с соотношениями коллагенов I/III в соответствующие сутки в регенерате на месте повреждения.

Таблица 3. Напряжение разрыва кожи спины и живота крыс в различные сроки после операции, напряжение разрыва в Н/м2.

| | Спина | Живот | $p$ |
|---|---|---|---|
| Прочность | Среднее± ст.откл | Среднее± ст.откл | |
| Интактная кожа | 40,2± 7,8 | 17,2± 2,8 | **<0,001** |
| 20 сут п.о. | 3,6± 0,8 | 2,4± 0,7 | **0,008** |
| 30 сут п.о. | 4,7± 1,2 | 7,1± 1,6 | **0,004** |
| 60 сут п.о. | 7,0± 1,6 | 10,0± 2,4 | 0,031 |

***Соотношение матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в процессе заживления***

По данным литературы, соотношение матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов определяет исход репарации и состав рубца (Dang et al., 2003). Установлено, что отношение уровней экспрессии *Mmp9/Timp1* при заживлении раны на коже живота начиная с 3 суток после операции вплоть до 20 дня в 2-12 раз превышало это отношение при заживлении раны на спине (Рис.7). Экспрессия гена *Col1* достоверно не менялась на протяжении всего периода наблюдения, в то время как экспрессия гена *Col3* была повышена на 3 и 5 сутки заживления. Вероятно, более быстрый метаболизм каркасных белков в ране живота (за счет повышенной экспрессии *Mmp9*) и отсутствие усиленной экспрессии *Col1* предотвращает образование плотного фиброзного матрикса и обусловливает минимальное рубцевание дефекта. При заживлении раны на спине во время фазы воспаления экспрессия ингибитора преобладала над протеиназой 9, затем на 14 сутки и после экспрессия *Timp1* не отличалась от контроля, но уровень *Mmp9* остался повышенным, что соответствует данным литературы (Dang et al., 2003). Экспрессия гена *Col1* имела два пика усиления: на 7 и 20 сутки примерно в 10 раз; а экспрессия *Col3* увеличивалась только на 7 сутки примерно в 20 раз  Таким образом, образование плотного рубца на спине, в котором затруднены процессы ангиогенеза, миграция и пролиферации клеток дермы, волосяных луковиц, скорее всего, обусловлено активным синтезом *Col1* и *Timp1*.

Уровни экспрессии генов *Mmp2* и *Timp2* при заживлении раны на коже живота имели схожую динамику и единый пик активности: на 5 и 7 сутки, затем с 14 суток экспрессия уже не отличалась от интактной кожи (Рис.7), в то время как в коже спины пики активности этих генов приходятся на  7 и 20 сутки, и на 30-е сутки уровень экспрессии остается повышенным.

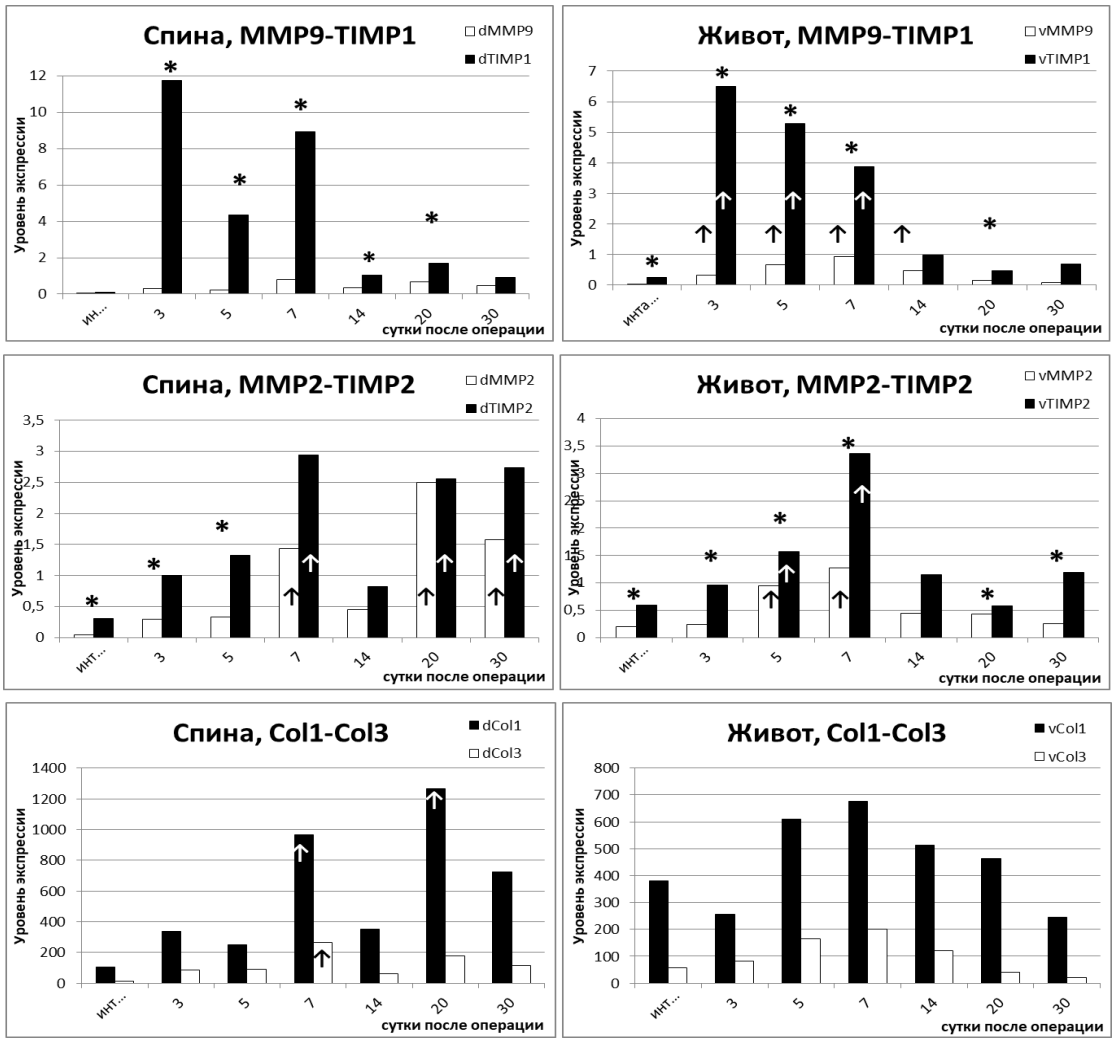


Рисунок 7. Относительная экспрессия генов при заживлении кожной раны на спине и животе. а) экспрессия *Mmp9* и *Timp1* в коже спины, б) экспрессия *Mmp9* и *Timp1* в коже живота, в) экспрессия *Mmp2* и *Timp2* в коже спины, г) экспрессия *Mmp2* и *Timp2* в коже живота, д) экспрессия *Col1* и *Col3* в коже спины, е) экспрессия *Col1* и *Col3* в коже живота. Me (Q25÷Q75). *- статистически значимые ($p$<0,05) различия между генами на одном сроке, ↑- статистически значимое ($p$<0,05) повышение экспрессии относительно интактного контроля.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлены ключевые различия в ходе репаративного процесса полнослойной кожной раны живота и спины. Рана на животе у крыс закрывается быстрее (за 14 суток), чем рана кожи спины (за 30 суток), при этом формирующиеся ткани в области живота более прочные. Более полноценную регенерацию кожи живота обеспечивает ряд особенностей процесса заживления: на ранних этапах низкое соотношение коллагенов I/III типа, а затем более активное накопление коллагена I типа; более низкое число CD68+макрофагов, и высокое содержание активированных FAPα

+фибробластов, а также высокое отношение экспрессируемых генов матриксных металлопротеиназ к их ингибиторам *Mmp9/Timp1*, наличие в регенерате эластических волокон, выраженный уровень экспрессии генов-маркеров прогениторных клеток *Sox9, Lgr6, Gli1, Lrig1*, ассоциированных с волосяным фолликулом.

Полученные в работе данные о молекулярных механизмах и разработанная методология комплексной оценки репаративного процесса в кожных ранах разной локализации будет способствовать развитию новых терапевтических подходов для достижения безрубцового заживления.

## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что у крыс интактная кожа живота отличается от кожи спины меньшей толщиной за счет более тонких дермы и гиподермы, а также большим количеством волосяных фолликулов, что согласуется с более высоким уровнем экспрессии генов-маркеров малодифференцированных клеток, ассоциированных с волосяным фолликулом, - *Sox9, Lgr6, Gli1, Lrig1*.
2. Показано, что темпы заживления раны кожи спины и кожи живота у крыс различаются: рана на животе закрывается за 14 суток, рана на спине – за 30, что обусловлено большим числом активированных фибробластов и более высокой пролиферативной активностью (доля Ki67+ клеток) клеток эпидермиса (на 3 сутки) и волосяных фолликулов (3,7 и 14 сутки).
3. Репаративный процесс в области раны кожи живота на ранних сроках послеоперационного периода характеризуется менее выраженной макрофагальной инфильтрацией и высокой долей активированных FAPα+фибробластов.
4. Восстановление кожного покрова у крысы более эффективно происходит в области раны живота: толщина кожи в области живота достигает исходного уровня к 30 суткам, к этому сроку рубец в области спины резко истончается, при этом прочность кожи на животе восстанавливается на 41,2%, а на спине только на 11,7% от исходного значения.
5. Динамика формирования волокнистой основы регенерата кожи в области раны на животе и на спине у крысы имеет качественные отличия. В регенерате на коже живота восстанавливается соотношение коллагенов I/III до исходного уровня, и обнаруживается эластин, что указывает на его большую, по сравнению с регенератом кожи спины, морфологическую зрелость .
6. Выявлено, что в основе качественных различий, наблюдаемых при формировании соединительнотканного компонента регенерата кожи, лежат различия в динамике экспрессии генов матриксных металлопротеиназ и их

ингибиторов: соотношение *Mmp9/Timp1* в 2-12 раз выше в коже живота по сравнению со спиной с 3 по 20 постоперационные сутки.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Статьи в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук**

1. **Кананыхина Е.Ю.** Количественная характеристика полноты регенерации кожи при заживлении раны на спине и животе крыс / Кананыхина Е.Ю., Большакова Г.Б. // Клиническая и экспериментальная морфология. 2016. № 1 (17). С. 27-36.
2. **Кананыхина Е.Ю.** Морфофункциональные особенности формирования рубцовой ткани при заживлении ран различной локализации у крыс / Кананыхина Е.Ю., Русанов Ф.С., Большакова Г.Б. // Клиническая и экспериментальная морфология. 2017. № 4 (24). С. 44-51.
3. **Кананыхина Е.Ю.** Экспрессия металлопротеиназ и коллагенов I и III типов при заживлении кожной раны на животе и спине крыс / Кананыхина Е.Ю., Шмакова Т.В., Большакова Г.Б., Русанов Ф.С., Ельчанинов А.В., Никитина М.П., Лохонина А.В., Макаров А.В., Фатхудинов Т.Х.// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019. Т.168, №12, С.778-782.
4. **Kananykhina E.** Impact of Stem Cells on Reparative Regeneration in Abdominal and Dorsal Skin in the Rat / Kananykhina E, Elchaninov A, Bolshakova G. // Journal of Developmental Biology. 2024; 12(1):6. https://doi.org/10.3390/jdb12010006.

**Другие публикации**

5. Шмакова Т.В. Клеточные механизмы безрубцового заживления кожи млекопитающих / Шмакова Т.В., **Кананыхина Е.Ю.**, Большакова Г.Б. // Клиническая и экспериментальная морфология. 2019. Т. 8. № 2. С. 5-11.
6. **Кананыхина Е.Ю**., Суязова П.А., Большакова Г.Б. Экспериментальные модели репаративной регенерации кожи крыс. // Научная конференция с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Сборник научных трудов. Москва, 16-17 апреля 2014 г. - С. 119-120.
7. **Кананыхина Е.Ю.,** Большакова Г. Б., Арутюнян И. В., Фатхудинов Т. Х., Васильев А. В., Ельчанинов А. В., Макаров А. В., Усман Н.Ю., Кириенко Е. Е. Количественная характеристика полноты регенерации кожи при заживлении раны на спине и животе крыс. // II Национальный конгресс по регенеративной медицине 3–5 декабря 2015 г. Тезисы. Москва, 2015.

8. **Кананыхина Е.Ю.,** Русанов Ф.С., Большакова Г.Б. Структурные особенности рубцовой ткани, определяющие ее прочностные характеристики. //Stomatology. 2016. Т. 95. № 6-2. С. 106.

9. **Кананыхина Е.Ю.,** Русанов Ф.С. Морфологические особенности заживления кожных ран разной локализации // Научная конференция с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». 6-7 апреля 2016. Сборник научных трудов. С.71-72. Москва, 2016.

10. **Кананыхина Е.Ю.,** Большакова Г.Б. Полнота регенерации кожи при заживлении раны на спине и животе крыс. Морфология. 2019. Т. 155. № 2. С. 141-142

11. **Кананыхина Е.Ю.,** Большакова Г.Б., Шмакова Т.В. Экспрессия металлопротеиназ и коллагенов I и III типа при заживлении кожной раны на животе и спине крыс. Материалы IV Национального конгресса по регенеративной медицине. Гены и Клетки. 2019. Т. 14. № S. С. 105-106.

12. **Кананыхина Е.Ю.,** Большакова Г.Б. Экспрессия цитокинов при заживлении кожной раны на животе и спине крыс// Всероссийская научная конференция с международным участием «Регенеративная биология и медицина» 15-16 апреля 2021 г. Сборник научных трудов. Москва, 2021. С. 108-110.

13. **Кананыхина Е.Ю.,** Ельчанинов А.В., Большакова Г.Б. Динамика экспрессии генов стволовых клеток кожи в ходе заживления ран на спине и животе крысы. Международная научная конференция «Университетская наука: взгляд в будущее», Курск, КГМУ, 8-9 февраля 2024 года, сборник трудов 361-363 с.