

Экспериментальная оценка применения аллогенного биоматериала после холодовой травмы кожи у крыс

© Л.А. МУСИНА, А.И. ЛЕБЕДЕВА, О.Р. ШАНГИНА, Е.М. ГАРЕЕВ

ВЦГПХ ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа, Россия

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Положительное действие диспергированного биоматериала на репаративные процессы кожи после термических и химических ожогов установлено в опытах на экспериментальных животных. Влияние аллогенного биоматериала (АБ) на заживление кожи после холодовой травмы пока не исследовано.

Цель исследования. Выявить влияние АБ на процессы восстановления кожи экспериментальных крыс после моделирования холодовой травмы.

Материал и методы. В эксперименте использовано 36 нелинейных белых крыс-самцов (масса тела 200–250 г). Криодеструкцию кожи спины крыс моделировали жидким азотом (–195,75 °C) в течение 1 мин. В контрольной группе исследовали спонтанное заживление раны; в 1-й опытной группе на 3-и сутки, а во 2-й опытной группе через 14 сут после холодового воздействия в зоне поражения подкожно вводили диспергированный АБ в физиологическом растворе (по 1 мл). Фрагменты кожи в области травмы забирали на исследование на 7, 14, 21, 30-е сутки после введения биоматериала, в контрольной группе — в те же сроки после криодеструкции. Гистологические исследования проводили по общепринятым стандартным методикам. Иммуногистохимически определяли в тканях экспрессию цитокина трансформирующий фактор роста TGF- β 1.

Результаты. Подкожное введение АБ крысам через 3 сут в зоне холодовой травмы способствует ускорению эпителизации и препятствует рубцеванию тканей. После применения АБ через 14 сут после криодеструкции в зоне формирующегося рубца происходит заметная трансформация его в плотную волокнистую соединительную ткань с содержанием более однонаправленных пучков коллагеновых волокон, нежели в норме, но признаков воспалительных реакций или грубого рубцевания тканей не отмечается.

Заключение. После подкожного введения АБ у крыс с моделированной холодовой травмой на коже отмечена ранняя эпителизация раны. АБ препятствует процессам грубого рубцевания тканей и способствует образованию под хорошо регенерирующим эпителием соединительнотканного регенерата, очень схожего по строению с дермой кожи.

Ключевые слова: аллогенный биоматериал, криодеструкция, кожа, рубцевание, репаративная регенерация.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Мусина Л.А. — <https://orcid.org/0000-0003-1237-9284>

Лебедева А.И. — <https://orcid.org/0000-0002-9170-2600>

Шангина О.Р. — <https://orcid.org/0000-0003-1686-1254>

Гареев Е.М. — <https://orcid.org/0000-0002-6561-0892>

Автор, ответственный за переписку: Мусина Л.А. — e-mail: morphoplant@mail.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Мусина Л.А., Лебедева А.И., Шангина О.Р., Гареев Е.М. Экспериментальная оценка применения аллогенного биоматериала после холодовой травмы кожи у крыс. *Клиническая дерматология и венерология*. 2024;23(3):275–282.

<https://doi.org/10.17116/klinderma202423031275>

Experimental evaluation of allogeneic biomaterial application after cold skin injury in rats

© L.A. MUSINA, A.I. LEBEDEVA, O.R. SHANGINA, E.M. GAREEV

Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

ABSTRACT

Background. The positive effect of dispersed biomaterial on skin reparative processes after thermal and chemical burns has been established in test on experimental animals. The influence of allogeneic biomaterial (AB) on skin healing after cold skin injury has not been investigated yet.

Objective. To identify the influence of AB on skin healing processes in experimental rats after cold injury simulation.

Material and methods. The experiment included 36 non-linear male white rats (body weight 200–250 gr). Cryolysis of rats' back skin was simulated by liquid ozone (–195,75 °C) for 1 min. Spontaneous injury healing was investigated in control group; dispersed AB in normal saline solution (by 1 ml) was injected subcutaneously into damaged area in the 1st experimental group on 3rd day, and in the 2nd experimental group in 14 days after cold exposure. Skin fragments from damaged area were taken for examination on 7th, 14th, 21st, 30th days after biomaterial injection, in the control group in the same time after cryolysis. Histological examinations were conducted according to the generally accepted standard methods. The expression of transforming growth factor (TGF- β 1) cytokine was determined immunohistochemically in tissues.

Results. The subcutaneous AB injection to rats after 3 days into area of cold injury accelerates epithelization and prevents tissues' scarring. There are marked transformation of formed scar in its area into a dense fibrous connective tissue with increased number of unidirectional fascicles of collagen fibers compared to normal, but there are no signs of inflammatory reactions or gross tissues' scarring.

Conclusion. Early injury epithelization was noted on rats' skin with simulated cold injury after subcutaneous AB injection. AB prevents gross tissues' scarring and contributes the formation of connective tissue regeneratus under well regenerating epithelium, that is very similar by structure with dermis.

Keywords: allogeneic biomaterial, cryolysis, skin, scarring, reparative regeneration.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Musina L.A. — <https://orcid.org/0000-0003-1237-9284>

Lebedeva A.I. — <https://orcid.org/0000-0002-9170-2600>

Shangina O.R. — <https://orcid.org/0000-0003-1686-1254>

Gareev E.M. — <https://orcid.org/0000-0002-6561-0892>

Corresponding author: Musina L.A. — e-mail: morphoplant@mail.ru

TO CITE THIS ARTICLE:

Musina LA, Lebedeva AI, Shangina OR, Gareev EM. Experimental evaluation of allogeneic biomaterial application after cold skin injury in rats. *Russian Journal of Clinical Dermatology and Venereology*. 2024;23(3):275–282. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/klinderma202423031275>

Введение

Биологические материалы для регенеративной хирургии — это донорские, в основном соединительные ткани, которые подвергнуты специальной физико-химической обработке с элиминацией из них клеточных элементов. Это делается с целью снижения антигенных свойств тканей и сохранения отдельных биопластических и физико-механических свойств [1]. Имплантация таких биоматериалов обеспечивает селективный рост тканей в такой зоне без рубцевания или их инкапсуляции, а также способствует обратному развитию некоторых дегенеративно-дистрофических и поствоспалительных фиброзных изменений в тканях [2–5]. В опытах на животных уже установлено положительное действие таких аллогенных биоматериалов (АБ) на репаративные процессы в коже после моделирования термических и химических ожогов [6, 7]. При этом АБ препятствовал процессам грубого рубцевания кожи и способствовал образованию под хорошо регенерирующим эпителием регенерата, очень схожего по строению с дермой кожи. Известно, что холодовая травма кожи приводит к тяжелым повреждениям всех ее слоев, что проявляется некротическими изменениями эпидермиса, дермы и даже гиподермы [8–10]. Влияние же АБ после холодовой травмы кожи пока не исследовано.

Цель исследования — выявить влияние АБ на процессы восстановления кожи экспериментальных крыс после моделирования холодовой травмы.

Материал и методы

В эксперименте использовано 36 нелинейных белых крыс-самцов 6-месячного возраста (масса тела 200–250 г). Мы соблюдали основные требования, изложенные в Правилах лабораторной практики (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23.08.10 №708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»). Этические принципы обращения с лабораторными животными соблюдали в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Криодеструкцию кожи

спины крыс, лишенной волосяного покрова, моделировали при помощи плоскогубцев с гладкой поверхностью в течение 1 мин, используя эфирный наркоз. Инструмент предварительно помещали в жидкий азот (–195,75 °С). «Губками» инструмента захватывали у крысы участок кожи площадью 0,5 см². После моделирования холодовой травмы крыс разделили на 3 группы. В контрольной группе наблюдали за процессом спонтанного заживления раны. Крысам 1-й опытной группы (на 3-и сутки после воздействия холодом) в зоне травмы подкожно ввели диспергированный АБ, изготовленный из сухожилий крыс по технологии аллоплант (регистр. удост. №ФСР2011/12012 от 03.02.15). Предварительно АБ в количестве 5 мг разводили в 2 мл физиологического раствора и вводили животным по 1 мл. Во 2-й опытной группе введение АБ произвели аналогичным способом и в той же дозировке через 14 дней после криодеструкции кожи. Фрагменты кожи в зоне криодеструкции забирали на 7, 14, 21, 30-е сутки после введения АБ, в контрольной группе — в те же сроки после криодеструкции. Ткани были зафиксированы в 10% забуференном формалине по Лилли и залиты в парафин. Гистологические срезы были изготовлены на микротоме Leica (Германия). Окрашивание срезов проводили гематоксилином и эозином, а также пикрофуксином по методу Ван-Гизона и методу Маллори. Выполнены иммуногистохимические исследования. Согласно протоколу производителя, определяли экспрессию цитокина трансформирующий фактор роста TGF-β1. Использовали мышинные моноклональные антитела (Santa Cruz Biotechnology) и универсальную систему вторичной детекции для визуализации выявленного комплекса. Реакцию проводили в гистостейнере Leica BOND MAX (Leica, Германия). Дальнейшее окрашивание срезов проводили раствором гематоксилина, затем заключали в балзам. С помощью микроскопа Leica DMD-108 (Германия) при увеличении в 400 раз считали клетки, экспрессирующие цитокин (всего по 20 полей зрения в каждой группе). Общую оценку зависимости численности клеток (экспрессирующих исследуемый цитокин) от времени, прошедшего после моделирования холодовой травмы, проводили при помощи рангового дисперсионного ана-

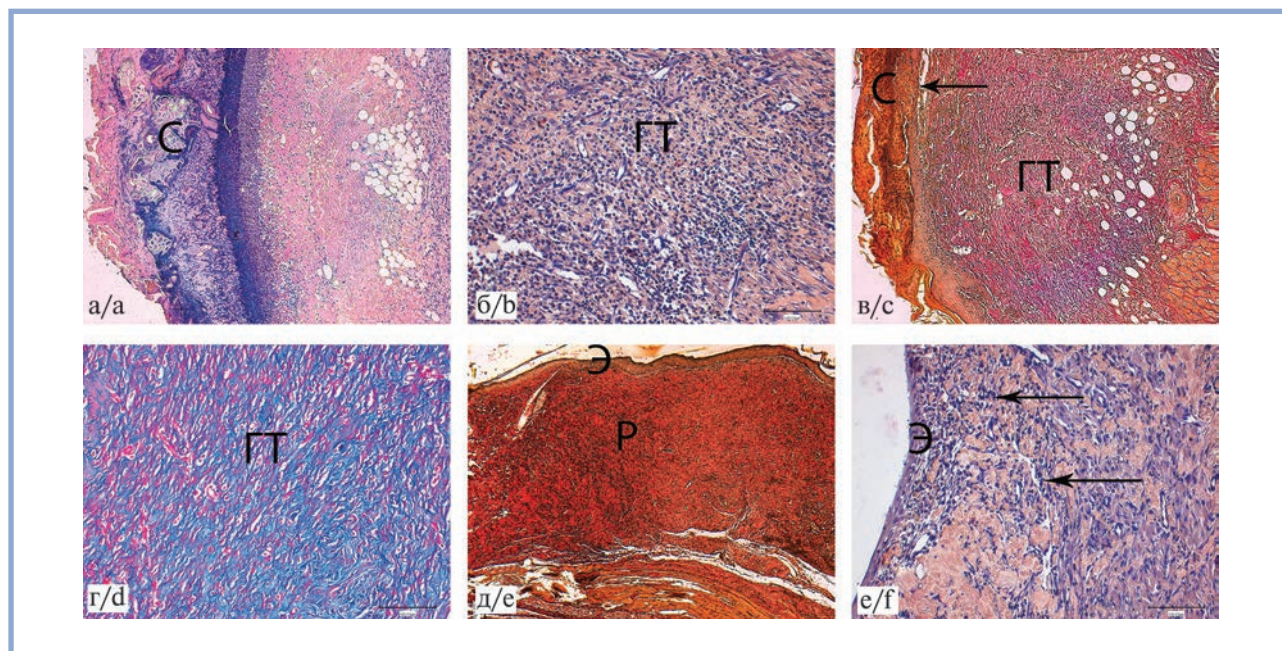


Рис. 1. Морфологические изменения кожи крыс контрольной группы после криодеструкции.

а — 7-е сутки. Некроз всех слоев кожи с вовлечением подкожной клетчатки и подлежащей мышечной ткани, диффузно-очаговая лейкоцитарная инфильтрация (окраска гематоксилином и эозином, ув. 100); б — 7-е сутки. Грануляционная ткань с круглоклеточной инфильтрацией (окраска гематоксилином и эозином, ув. 200); в — 14-е сутки. Отсутствие эпителиального слоя (стрелка) под струпом (С) (окраска по Ван-Гизону, ув. 100); г — 21-е сутки. Грануляционная ткань (окраска по Маллори. Ув. 200); д — 30-е сутки. Бессосудистая плотная рубцовая ткань в зоне криодеструкции (окраска по Ван-Гизону. Ув. 40); е — 30-е сутки. Клеточные инфильтраты (стрелка) в соединительнотканном регенерате (окраска гематоксилином и эозином, ув. 200); С — струпа на ране; Э — эпителиальный слой; ГТ — грануляционная ткань; Р — рубцовая ткань.

Fig. 1. Morphological skin alterations in rats of control group after cryolysis.

a — 7th day. Necrosis of all skin layers involving subcutaneous tissue and underlying muscle tissue, diffuse-focal leukocytes infiltration (hematoxylin and eosin staining, zoom $\times 100$); b — 7th day. Granulation tissue with round-cell infiltration (hematoxylin and eosin staining, zoom $\times 200$); c — 14th day. Absence of epithelial layer (arrow) under crust (C) (Van Gieson staining, zoom $\times 100$); d — 21st day. Granulation tissue (Mallory staining. Zoom $\times 200$); e — 30th day. Avascular dense scar tissue in cryolysis area (Van Gieson staining. Zoom $\times 40$); f — 30th day. Cellular infiltrates (arrow) in the connective tissue regeneratus (hematoxylin and eosin staining, zoom $\times 200$); C — crust on the injury; Э — epithelial layer; ГТ — granulation tissue; Р — scar tissue.

лиза по Краскелу—Уоллесу, а сравнение отдельных выборок — с применением критерия Манна—Уитни [11, 12]. Соответственно, для описания результатов использовали медианы (Me), квартили (Q_1 и Q_3), а при необходимости — границы вариации (min—max). Формирование базы данных и все расчеты осуществляли с применением программного пакета Statistica 10 [13].

Результаты и обсуждение

У крыс контрольной группы на 7-е сутки после криовоздействия в зоне поражения определялся обширный очаг некроза всех слоев кожи, подкожной клетчатки, вплоть до подлежащей мышечной ткани с диффузно-очаговой лейкоцитарной инфильтрацией (рис. 1, а). Просветы кровеносных сосудов в глубоких слоях кожи были расширены и заполнены форменными элементами крови. В прилежащих к очагам некроза участках встречались небольшие зоны формирования рыхлой васкуляризированной грануляционной ткани с круглоклеточной инфильтрацией, преимущественно лимфоцитами, что является свидетельством выраженной воспалительной реак-

ции (см. рис. 1, б). Через 14 сут эпителий не восстанавливался, а на месте дермы определялась грануляционная ткань из рыхлой васкуляризированной ткани, инфильтрированной воспалительными клетками (см. рис. 1, в).

На 21-е сутки струпа с раны отпадал, но новый эпителиальный слой был тонким и неровным по толщине с дистрофическими изменениями клеток. Под ним продолжала формироваться грануляционная ткань из тонких коллагеновых волокон, фибробластов, лимфоцитов, макрофагов и новообразованных сосудов с тонкими стенками (см. рис. 1, г). Обращала на себя внимание выраженная пролиферация фибробластических клеток, являющихся, как известно, источником синтеза коллагена. На 30-е сутки на ране определялся неравномерный по толщине эпителиальный слой, местами утолщенный, а местами, наоборот, очень тонкий. Дерму без дифференцировки на сосочковый и сетчатый слои представляла бессосудистая плотная ткань по типу фиброзного рубца с беспорядочно упакованными грубыми пучками коллагеновых волокон (см. рис. 1, д). В норме дермальный слой кожи выглядит как переплетающиеся между собой оформленные пучки четко очерчен-

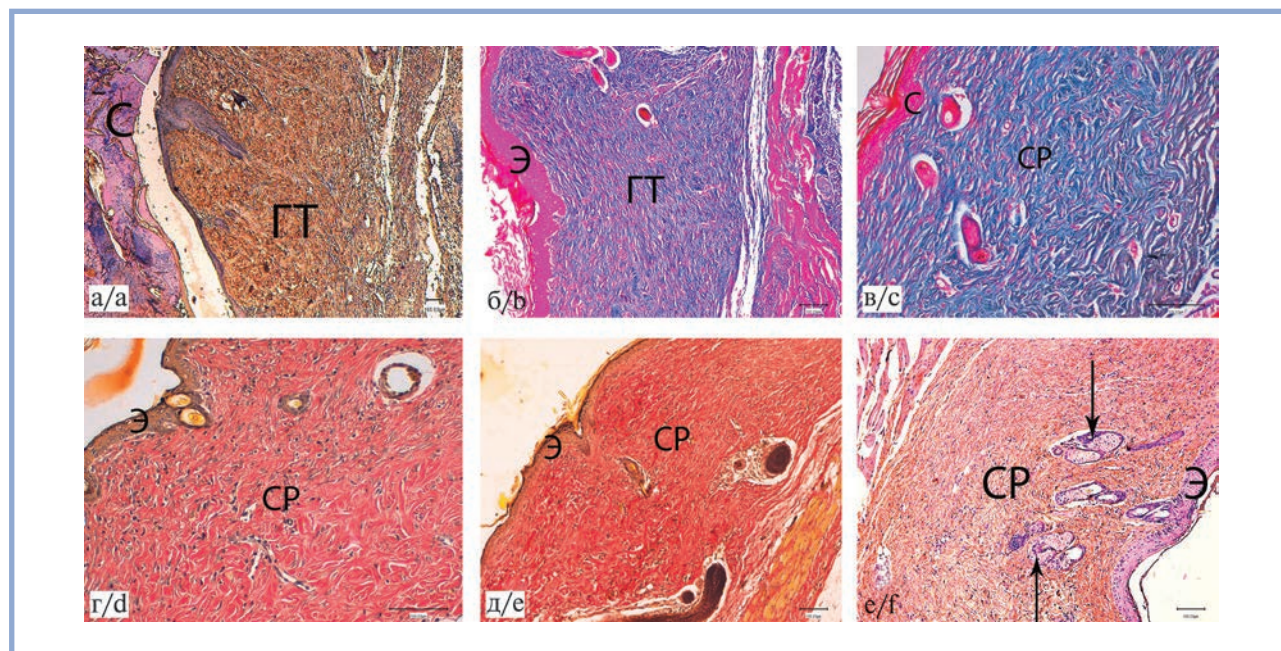


Рис. 2. Морфологические изменения кожи крыс 1-й опытной группы (применение АБ через 3 суток после криодеструкции).

а — 7-е сутки после введения АБ. Десквамация струпа и формирование тонкого эпителиального слоя (стрелка) на грануляционной ткани (окраска гематоксилином и эозином, ув. 40); б — 7-е сутки после введения АБ. Формирование грануляционной ткани (окраска по Маллори, ув. 100); в — 14-е сутки. Формирующийся соединительнотканый регенерат под эпителием (окраска по Маллори, ув. 200); г — 21-е сутки (окраска по Ван-Гизону, ув. 200); д — 30-е сутки. Соединительнотканый регенерат на месте криодеструкции (окраска по Ван-Гизону, ув. 40); е — 30-е сутки. Отсутствие воспалительных инфильтратов, регенерация волосяных фолликулов и сальных желез (стрелка) в регенерате (окраска гематоксилином и эозином, ув. 100); С — струп на ране; Э — эпителиальный слой; ГТ — грануляционная ткань; СР — соединительнотканый регенерат.

Fig. 2. Morphological skin alterations of rats of the 1st experimental group (AB application in 3 days after cryolysis).

a — 7th day after AB injection. Crust desquamation and formation of thin epithelial layer (arrow) on granulation tissue (hematoxylin and eosin staining, zoom $\times 40$); b — 7th day after AB injection. Granulation tissue formation (Mallory staining, zoom $\times 100$); c — 14th day. Forming connective tissue regeneratus under epithelium (Mallory staining, zoom $\times 200$); d — 21st day. (Van Gieson staining, zoom $\times 200$); e — 30th day. Connective tissue regenerates on the cryolysis area (Van Gieson staining, zoom $\times 40$); f — 30th day. Absence of inflammatory infiltrates, regeneration of hair follicles and sebaceous glands (arrow) in regeneratus (hematoxylin and eosin staining, zoom $\times 100$); C — crust on the injury; Э — epithelial layer; ГТ — granulation tissue; СР — connective tissue regeneratus.

ных коллагеновых волокон, ориентированных в трех проекциях и содержащих между собой кровеносные сосуды. В соединительнотканном регенерате придатки кожи в виде сальных и потовых желез, а также волосяные фолликулы не обнаруживали. Среди грубых толстых коллагеновых волокон местами продолжали выявляться участки незрелой грануляционной ткани с выраженной воспалительной инфильтрацией, свидетельствующей о хронизации процесса (см. рис. 1, е).

У крыс 1-й опытной группы (введение АБ на 3-й день после криодеструкции) на 7-е сутки под отпадающим струпом на всей поверхности раны уже выявлялась хотя и неширокая, но относительно ровная полоса нового эпителиального слоя (рис. 2, а). Под ним определялась зона грануляционной ткани. Она состояла из новообразованных очень тонких коллагеновых волокон, между которых определялись тонкостенные сосуды капиллярного типа и фибробласты (см. рис. 2, б). Фибробластическая реакция в формирующейся ткани была умеренно выраженной. В более глубоких слоях дермальной пластинки отечность пропадала, а кровеносные сосуды немного сужались. На 14-е сутки по-

сле введения АБ соединительнотканый регенерат становился более плотным, наблюдались признаки начала его ремоделирования или «созревания» ткани с формированием более толстых оформленных волокнистых элементов (см. рис. 2, в). Многие сосуды грануляционной ткани подвергались редукции. На 21-е сутки после введения АБ зона повреждения была покрыта ровным эпителиальным слоем. Под ним определялся соединительнотканый регенерат, состоящий из плотных пучков тонких коллагеновых волокон, среди которых выявлялось небольшое количество мелких капилляров (см. рис. 2, г). Через 30 сут после введения АБ дерма кожи в большей своей части была представлена волокнистой соединительной тканью. Между фуксинофильных пучков коллагеновых волокон определялись веретенообразные фибробласты (см. рис. 2, д). Строение в пучках коллагеновых волокон регенерата во многих участках было схоже с таковой дермы в здоровых участках кожи. Признаков воспалительных реакций в месте моделирования холодовой травмы и грубого рубцевания тканей не выявлено (см. рис. 2, е). Наряду с этим отмечены отдельные признаки регенерации дериватов кожи в виде пролиферации

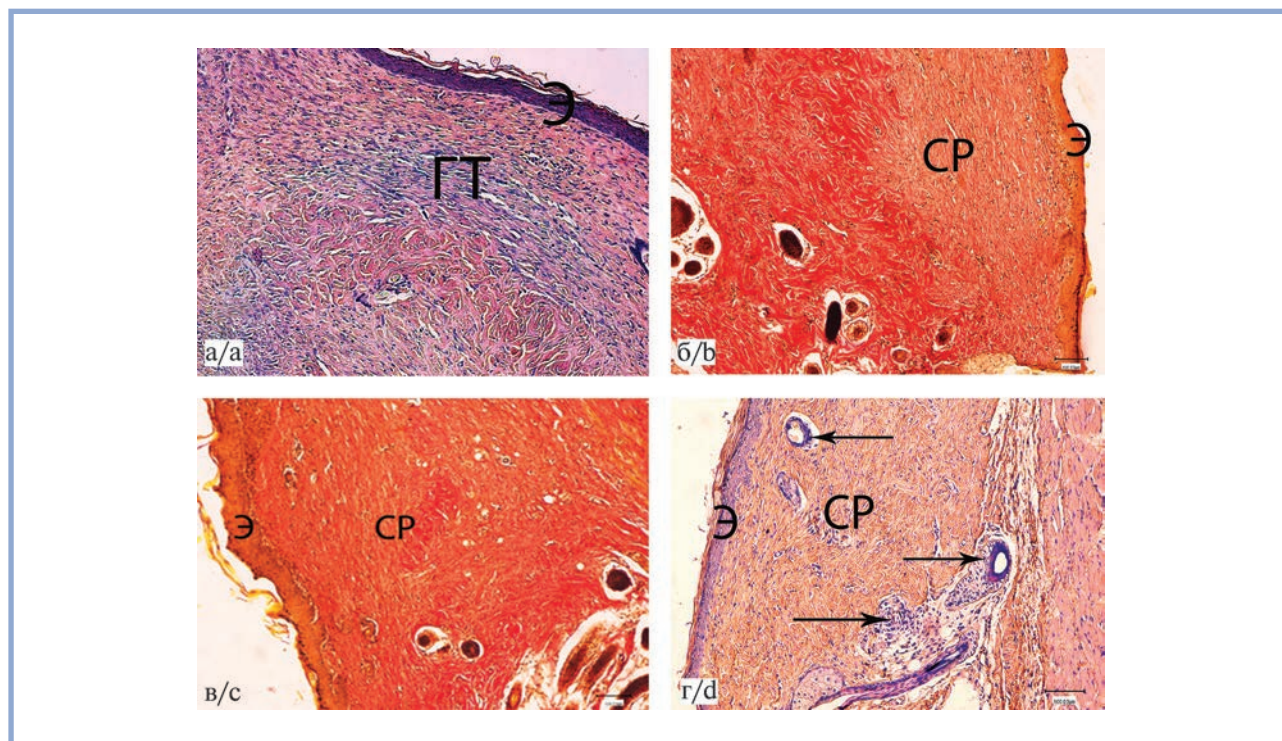


Рис. 3. Морфологические изменения кожи крыс 2-й опытной группы (применение АБ через 14 суток после холодовой травмы).

а — 7-е сутки после введения АБ. Отсутствие струпа и формирование тонкого эпителиального слоя на грануляционной ткани (окраска гематоксилином и эозином, ув. 100); б — 14-е сутки после введения АБ. Неоднородная структура соединительнотканного регенерата (окраска по Ван-Гизону, ув. 100); в — 21-е сутки. Формирующийся плотный соединительнотканый регенерат под восстановившимся эпителием (окраска по Ван-Гизону, ув. 100); г — 30-е сутки. Сформировавшийся соединительнотканый регенерат, покрытый эпителием. Регенерация волосяных фолликулов (стрелка) и сальных желез кожи (окраска гематоксилином и эозином, ув. 100). Э — эпителиальный слой; ГТ — грануляционная ткань; СР — соединительнотканый регенерат.

Fig. 3. Morphological skin alterations in rats of the 2nd experimental group (AB application in 14 days after cold injury).

a — 7th day after AB injection. Absence of crust and formation of thin epithelial layer on the granulation tissue (hematoxylin and eosin staining, zoom $\times 100$); b — 14th day after AB injection. Nonhomogeneous structure of connective tissue regeneratus (Van Gieson staining, zoom $\times 100$); c — 21st day. Forming dense connective tissue regeneratus under restored epithelium (Van Gieson staining, zoom $\times 100$); d — 30th day. Formed connective tissue regeneratus covered by epithelium. Regeneration of hair follicles (arrow) and sebaceous glands, skin (hematoxylin and eosin staining, zoom $\times 100$). Э — epithelial layer; ГТ — granulation tissue; СР — connective tissue regeneratus.

с периферии в соединительнотканый регенерат сальных желез и волосяных фолликулов.

Во 2-й опытной группе АБ применяли через 14 дней после криодеструкции кожи, при этом струп еще не подвергался десквамации и покрывал рану. Но через 7 последующих дней после введения АБ он отпадал, эпителиальный слой на ране присутствовал, но был тонким и неровным по толщине (рис. 3, а). Под ним определялись участки грануляционной ткани с тонкими коллагеновыми волокнами и небольшим количеством сосудов, а также уже сформировавшиеся похожие по структуре на рубцовую ткань более плотные участки. Сплетения пучков коллагеновых волокон в соединительнотканном регенерате несколько различались от таковых дермы в непораженных участках кожи, они были более однонаправленными, но признаков воспалительных реакций в тканях или грубого рубцевания не было. По краям регенерата местами определялись признаки регенерации отдельных волосяных фолликулов. Через 14 сут после введения АБ новообразованная соединительная ткань под эпителием также имела неоднородное строение

(см. рис. 3, б). Участки с тонковолокнистой структурой чередовались с небольшими по площади очагами ткани, которые состояли из относительно толстых оформленных пучков коллагеновых волокон. К 21-м суткам ткань под эпителием становилась более «зрелой» и однородной по структуре (см. рис. 3, в). Через 30 сут после введения АБ сформировавшийся соединительнотканый регенерат под ровным слоем эпителия был представлен оформленной волокнистой соединительной тканью и состоял из плотно сложенных пучков извитых коллагеновых волокон и многочисленных фибробластов между ними (см. рис. 3, г).

Полученные результаты гистологических исследований согласуются с данными иммуногистохимических исследований по выявлению в тканях противовоспалительного цитокина TGF- β . По современным представлениям TGF- β — это профибротический цитокин, играющий ведущую роль в патогенезе рубцовых преобразований в тканях [5, 6, 14, 15]. Считается, что этот ростовой фактор, обладающий рядом неоднозначных репаративных и иммуносупрессивных эффектов, прямо коррелирует

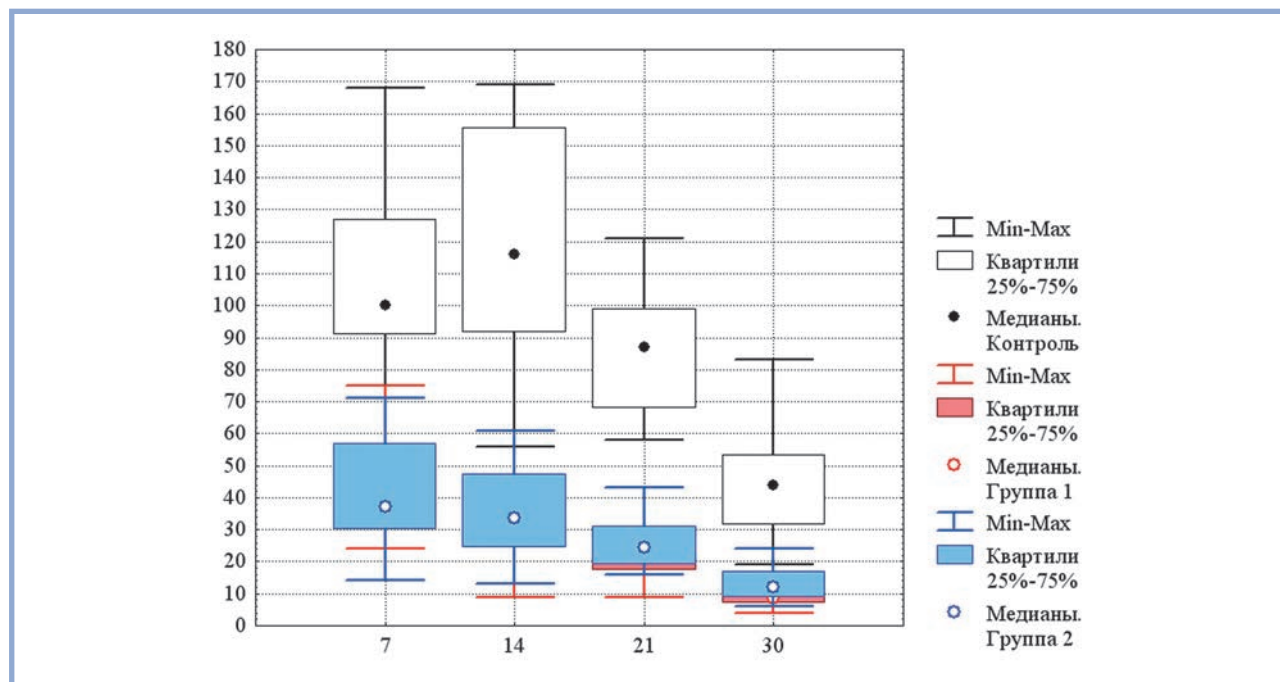


Рис. 4. Количество клеток, экспрессирующих цитокин TGF-β, в контрольной и двух опытных группах (1-я и 2-я группы) в разные сроки после моделирования холодовой травмы и применения АБ.

По оси абсцисс сроки наблюдения — дни после холодовой травмы кожи (в контрольной группе) и дни после травмы и введения АБ в опытных группах (в 1-й группе — через 3 дня после травмы; во 2-й группе — через 14 дней после травмы). По оси ординат указано среднее количество на одно поле зрения микроскопа клеток, экспрессирующих цитокин TGF-β.

Fig. 4. Number of cells expressing TGF-β cytokine in control and two experimental groups (the 1st group and the 2nd group) at different times after cold injury stimulation and AB application.

The observation period on the absciss axis — days after cold skin injury (in control group) and days after injury and AB injection in experimental groups (in the 1st group — in 3 days after injury; in the 2nd — in 14 days after injury). The ordinate axis indicates the average number of cells expressing TGF-β cytokine in microscope field.

с экспрессией фактора роста фибробластов FGF-1, способствующим усиленной пролиферации фибробластических клеток — главных источников синтеза коллагена при формировании коллагеновых волокон. В нашем опыте количество клеток, экспрессирующих цитокин TGF-β, довольно сильно зависело от времени, прошедшего после моделирования холодовой травмы. Эта зависимость проявляется в последовательном снижении численности таких клеток, которое гораздо отчетливее выражено в обеих опытных группах по сравнению с контрольной группой (рис. 4). В 1-й и 2-й опытных группах на всех этапах наблюдения значения достаточно близки и до срока 1 мес статистически значимо не различаются: на 7-й день Ме составляет 41 (32,5, 3 57) клетку в 1-й группе и соответственно 37 (30, 57) клеток во 2-й группе ($p>0,67$), на 14-й день — 29 (24,5, 38) клеток в 1-й группе и 33,5 (24,5, 47,5) клетки во 2-й группе ($p>0,30$), на 21-й день — 22 (17, 26) клетки в 1-й группе и 24,5 (19, 31) клетки во 2-й группе ($p>0,07$). Но на 30-й день медианное значение числа TGF-β, экспрессирующих белок клеток в 1-й группе становится уже статистически значимо ($p<0,002$) ниже, чем во 2-й группе — 8,5 (7, 11) клетки против 12 (9, 17) клеток. В этот же срок число клеток этого типа в контрольной

группе остается кратно выше — 44 (31,5, 57,5) клетки, так же как и в начале наблюдений на 7-й день — 100 (81, 127) клеток. Следовательно, на всем протяжении наблюдений количество экспрессирующих цитокин TGF-β клеток в контрольной группе остается существенно выше, чем в экспериментальных группах после введения АБ, где их количество снижается довольно радикально, причем в 1-й опытной группе с заметно большей интенсивностью. Отметим также, что в обеих опытных группах по мере удаления от момента нанесения холодовой травмы кожи кратно снижается внутригрупповая вариабельность количества таких клеток. Если на 7-й день границы вариации данного параметра в 1-й и 2-й группах составляли соответственно $24\div75$ клетки и $14\div71$ клетки, то через 1 мес — $4\div13$ клеток и $6\div24$ клетки.

Установлено, что обычно уровень экспрессированного белка TGF-β прямо пропорционально коррелирует с выраженностью воспалительного процесса [16]. У контрольных животных мы выявили высокий количественный уровень данного цитокина, что также является одной из основных причин интенсивной пролиферации фибробластических клеток при формировании грануляционной ткани, которая приводит к фиброзу соединительнотканного регенерата в стадии ремоделиации. В данном случае

мы наблюдали довольно длительную сохранность струпа и позднюю эпителизацию травмированной зоны кожи, что также не благоприятствует полноценному восстановлению стромы кожи. Можно полагать, что одним из решающих факторов благоприятного воздействия АБ на заживление раны кожи после холодовой травмы и ингибирование процессов грубого рубцевания тканей является более низкий уровень экспрессии клетками противовоспалительного цитокина TGF- β 1.

У животных опытных групп при использовании АБ в отличие от животных контрольной группы во все сроки опыта на фоне относительно малой экспрессии противовоспалительного белка степень проявления воспалительных процессов была слабее. Уровень экспрессии TGF- β 1 в 1-й опытной группе на 7-е сутки составил 41 (32,5; 57) клетку и во 2-й опытной группе — 37 (30; 57) клеток. Показатели были в 2,5—3 раза ниже, чем у животных контрольной группы в этот срок ($p < 0,001$). У животных 1-й опытной группы десквамация струпа на созданной ране выявлялась уже на 7-е сутки после введения АБ, это происходило из-за ускоренной эпителизации раны. Так же, как в случае применения АБ при ожогах кожи, подкожное его введение животным в зоне холодовой травмы нивелирует интенсивность проявления признаков воспалительных процессов, что проявляется и умеренно выраженной фибробластической реакцией [6, 7]. Вследствие этого в отличие от контрольной группы, где происходит ускоренное грубое рубцевание грануляционной ткани, у животных опытной группы наблюдается образование более адекватного по строению соединительнотканного регенерата дермальной пластинки дермы кожи под восстановленным эпителиальным слоем [16].

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания №056-00124-21-00, утвержденного 23.12.2020.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования: Мусина Л.А., Лебедева А.И., Шангина О.Р.

Сбор и обработка материала: Мусина Л.А., Лебедева А.И., Шангина О.Р., Гареев Е.М.

Статистическая обработка: Гареев Е.М.

Написание текста: Мусина Л.А.

Редактирование: Лебедева А.И., Шангина О.Р.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Заключение

Восстановление эпителия и дермы кожи крыс в контрольной группе после холодовой травмы при высокой экспрессии фактора фиброза цитокина TGF- β сопровождается выраженной воспалительной реакцией с интенсивной пролиферацией фибробластов, приводящей к формированию несовершенного по своей структуре фиброзного рубца, покрытого неровным эпителиальным слоем. Использование диспергированного АБ через 3 сут в зоне холодовой травмы нивелирует проявление выраженных воспалительных процессов, способствует ускорению процессов эпителизации и раннему формированию грануляционной ткани, за счет экспрессии клетками более низкого уровня TGF- β 1 вызывает умеренную фибробластическую реакцию, которая способствует образованию правильно упорядоченных коллагеновых волокон в дерме. Заживление пораженного участка кожи заканчивается формированием адекватного по структуре соединительнотканного регенерата под полностью восстановленным эпителием и с признаками регенерации дериватов кожи. После применения АБ через 14 сут в зоне уже формирующегося криогенного рубца в большей его части происходит заметная трансформация его в плотную волокнистую соединительную ткань с содержанием более однопучковых коллагеновых волокон нежели в дерме кожи, но признаков воспалительных реакций в тканях или грубого рубцевания не отмечается. Результаты, полученные в эксперименте над животными, вероятно, с известной долей условности можно экстраполировать на процессы при криовоздействии на организм человека.

Financing. The work was performed within the framework of State Task No. 056-00124-21-00, approved on 12/23/2020.

Authors' contributions:

The concept and design of the study: Musina L.A., Lebedeva A.I., Shangina O.R.

Collecting and interpreting the data: Musina L.A., Lebedeva A.I., Shangina O.R., Gareev E.M.

Statistical analysis: Gareev E.M.

Drafting the manuscript: Musina L.A.

Revising the manuscript: Lebedeva A.I., Shangina O.R.

The authors declare no conflict of interest.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. *Alloplant Регенеративная медицина*. Под ред. Мулдашева Э.Р. Уфа. 2014. *Alloplant Regenerative medicine*. Pod red. Muldasheva E.R. Ufa. 2014. (In Russ.).
2. Нураева А.Б. Применение технологий «Аллоплант» в случаях одностороннего послеожогового рубцового выворота верхнего и нижнего века. *Практическая медицина*. 2016;6: 22-125.

- Nuraeva AB. The use of «Alloplant» technologies in cases of unilateral post-burn cicatricial inversion of the upper and lower eyelids. *Prakticheskaja medicina*. 2016;6:122-125. (In Russ.).
3. Нураева А.Б., Мусина Л.А. Структурные изменения биоматериалов Аллоплант при пластике послеожоговых дефектов век. *Практическая медицина*. 2016;6:126-129.
Nuraeva AB, Musina LA. Structural changes of Alloplant biomaterials in the plastic of post-burn defects of the eyelids *Prakticheskaja medicina*. 2016; 6:126-129. (In Russ.).
 4. Мусина Л.А., Нураева А.Б. Морфологический анализ биоптатов пациентов после пластики посттравматических дефектов век с применением биоматериала Аллоплант. *Практическая медицина*. 2017;9(2): 142-145.
Nuraeva AB, Musina LA. Morphological analysis of biopsies of patients after plastic surgery of post-traumatic eyelid defects using Alloplant biomaterial. *Prakticheskaja medicina*. 2017;9(2):142-145. (In Russ.).
 5. Мусина Л.А., Шакиров Р.Ф., Галимова В.У., Шангина О.Р., Лебедева А.И., Кадыров Р.З. Биоматериал Аллоплант как ингибитор рубцевания поврежденной роговицы (Иммуногистохимическое исследование). *Практическая медицина*. 2019;17(1):112-116.
Musina LA, Shakirov RF, Galimova VU, Shangina OR, Lebedeva AI, Kadirov RZ. Biomaterial Alloplant as an inhibitor of scarring of the damaged cornea (Immunohistochemical examination) *Prakticheskaja medicina*. 2017; 17(1):112-116. (In Russ.).
 6. Нураева А.Б., Мусина Л.А., Гареев Е.М. Биоматериалы Аллоплант — ингибиторы рубцевания кожи после ожогов (Экспериментально-морфологическое исследование). *Офтальмологические ведомости*. 2017; 10(2):22-28.
Nuraeva AB, Musina LA, Gareev E.M. Biomaterials Alloplant — inhibitors of skin scarring after burns (Experimental morphological study). *Oftalmologicheskiye vedomosti*. 2017;10(2):22-28. (In Russ.).
 7. Нураева А.Б., Мусина Л.А., Лебедева А.И., Вафиев А.С. Применение биоматериала «Аллоплант» для восстановления кожи после химического ожога (Экспериментально-морфологическое исследование). В кн.: Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии. Сборник тезисов VII Всероссийского симпозиума с международным участием. 2017:151-154.
Nuraeva AB, Musina LA, Lebedeva AI, Vafiev AC. *The use of biomaterial «Alloplant» to restore the skin after a chemical burn (Experimental morphological study)*. V kn.: Aktualnye voprosi tkanevoy i kletочноy transplantologii. Sbornik tezisev VII Vserossiyskogo simpoziuma s megdunarodnim uchastyem. 2017:151-154. (In Russ.).
 8. Шаповалов К.Г. Сизоненко В.А. Холодовая травма как причина стойкого изменения состояния микроциркуляторного русла. *Хирургия*. 2009;2:28-32.
 9. Михайличенко М.И. Шаповалов К.Г. Микроциркуляторные нарушения в патогенезе местной холодовой травмы. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2019;2:4-11.
Mikhaylichenko MI Shapovalov KG. Microcirculatory disorders in the pathogenesis of local cold injury. *Regionarnoe krovoobracgenie i mikrocirkulaciya*. 2019;2:4-11. (In Russ.).
<https://doi.org/10.24884/1682-6655-2019-18-2-4-11>
 10. Лебедева А.И. Аллогенный губчатый биоматериал — ингибитор фиброза поврежденной скелетной мышечной ткани. *Российский биотерапевтический журнал*. 2014;13(4):37-44.
Lebedeva AI. Allogeneic spongy biomaterial is an inhibitor of fibrosis of damaged skeletal muscle tissue. *Rossiyskij bioterapevicheskij zhurnal*. 2014; 13(4):37-44. (In Russ.).
 11. Холлендер М., Вульф Д. *Непараметрические методы статистики*. М.: Финансы и статистика; 1983.
Kholender M, Vulf D. *Nonparametric methods of statistics*. M.: Finansi i statistica; 1983. (In Russ.).
 12. Банержи А. *Медицинская статистика понятным языком: вводный курс*. М.: Практическая медицина; 2007.
Banergi A. *Medical statistics in plain language: introductory course*. M.: Prakticheskaja medicina; 2007. (In Russ.).
 13. Боев В.М., Борщук Е.Л., Екимов А.К., Бегун Д.Н. *Руководство по обеспечению решения медико-биологических задач с применением программы Statistica 10*. Оренбург: ОАО «ИПК «Южный Урал»; 2014.
Boev VM, Borshuk EL, Ekimov AK, Begun DN. *Guidelines for ensuring the solution of biomedical problems using the Statistica 10 program*. Orenburg: JSC «IPK «Uyjniy Ural»; 2014. (In Russ.).
 14. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF-β: the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(6):325-338.
<https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.48>
 15. Hu HH, Chen DQ, Wang YN, Feng YL, Cao G, Vaziri ND, Zhao YY. New insights into TGF-β/Smad signaling in tissue fibrosis. *Chem Biol Interact*. 2018;292:76-83.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.07.008>
 16. Муслимов С.А., Мусина Л.А., Лебедева А.И., Шангина О.Р. Морфологические основы применения биоматериалов Аллоплант для регенерации тканей. *Морфология*. 2008;2:92-93.
Muslimov SA, Musina LA, Lebedeva AI, Shanina OR. Morphological bases of Alloplant biomaterials application for tissue regeneration. *Morphologia*. 2008;2:92-93. (In Russ.).

Поступила в редакцию 11.08.2023

Received 11.08.2023

Отправлена на доработку 18.10.2023

Revision received 18.10.2023

Принята к печати 13.03.2024

Accepted 13.03.2024