



АКТИВАЦИЯ СИНТЕЗА ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ДЕРМЫ ПОСЛЕ ТЕРМИЧЕСКОГО ОЖОГА

Могильная Г.М., Фомичева Е.В., Евглевский А.А.

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия, e-mail: fomevg@mail.ru

Для цитирования:

Могильная Г.М., Фомичева Е.В., Евглевский А.А. Активация синтеза внеклеточного матрикса дермы после термического ожога. Морфологические ведомости. 2023;31(1):691. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2023.31\(1\).691](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2023.31(1).691)

Резюме. Известно, что заживление кожных ран различной этиологии — это многоступенчатый процесс, характеризующийся определенными межклеточными взаимодействиями, влияющими на адгезию клеток дермы, их миграцию и дифференцировку. Современная стратегия тканевой инженерии выступает за использование собственных клеток пациента для создания *in vitro* васкуляризованного внеклеточного матрикса, отличающегося отсутствием экзогенного материала, что приближает процесс регенерации к физиологическому. Целью настоящего исследования явилось изучение морфологических преобразований дермы в зоне ожога с использованием биodeградируемого кальцийсодержащего филлера, выступающего в роли динамичного и мультифункционального регулятора клеточной активности дермы. Исследование выполнено на 30 лабораторных аутбредных крысах. Всем животным был нанесен ожог третьей степени, затем животных разделили на две группы: контрольную и опытную. На 14-й день после нанесения ожога крысам опытной группы вводили инъекционный препарат имплантата на основе гидроксиапатита кальция «Radiesse». В группе контрольных животных использовали стерильный физиологический раствор. Биологический материал забирали в сроки, соответствующие 2 и 4 месяцам. Для оценки морфологического состояния зоны ожога гистологические срезы препаратов кожи окрашивали гематоксилином и эозином, по Маллори, Массону и Ван-Гизону. Иммуногистохимически определяли также коллаген I и III типов. Полученные данные позволяют считать, что использование кальцийсодержащего филлера представляется перспективным для регенерации кожи после ожога и может обеспечить получение экстрацеллюлярного матрикса дермы, имеющего состав и архитектуру коллагеновой сети, приближенной к естественной. Дифференцированное выявление коллагенов I и III типов подтвердило активацию темпа неоколлагеногенеза фибробластами как дермы зоны ожога, так и зоны имплантата к концу второго месяца. Оценка показателя тканевой энтропии подтверждает общность структурной организации естественной и восстановленной после ожога и применения препарата дермы. Предлагаемая в эксперименте стратегия с использованием собственных клеток организма для синтеза внеклеточного матрикса, аналогичного естественному, может явиться альтернативой существующим методам лечения ожогов.

Ключевые слова: кожа, ожог кожи, дерма, синтез коллагена, филлеры

Статья поступила в редакцию 30 марта 2022

Статья принята к публикации 15 января 2023

THE ACTIVATION OF THE DERMIS EXTRACELLULAR MATRIX SYNTHESIS AFTER THE THERMAL BURN

Mogilnaya GM, Fomicheva EV, Evglevskiy AA

Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia, e-mail: fomevg@mail.ru

For the citation:

Mogilnaya GM, Fomicheva EV, Evglevskiy AA. The activation of the dermis extracellular matrix synthesis after the thermal burn. *Morfologicheskie Vedomosti – Morphological newsletter*. 2023;31(1):691. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2023.31\(1\).691](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2023.31(1).691)

Summary. It is known that the healing of skin wounds of various etiologies is a multistage process characterized by certain intercellular interactions that affect the adhesion of dermal cells, their migration and differentiation. The modern strategy of tissue engineering mostly attracted for the use of the patient's own cells to create *in vitro* a vascularized extracellular matrix, which is characterized by the absence of exogenous material, which brings the regeneration process identity to the physiological one. The aim of this study was the morphological transformations of the dermis in the burn area using a biodegradable calcium-containing filler, which acts as a dynamic and multifunctional regulator of the cellular activity of the dermis. The study was performed on 30 laboratory outbred rats. All animals were given a third-degree burn, then the animals were divided into two groups: control and experimental. On the 14th day after the application of the burn, the rats of the experimental group were injected with an injectable implant preparation based on calcium hydroxyapatite «Radiesse». In the group of control animals, sterile saline was used. Biological material was taken at the time corresponding to 2 and 4 months. To assess the morphological state of the burn zone, histological sections of skin preparations were stained with hematoxylin and eosin, according to Mallory, Masson and Van Gieson. Collagen types I and III were also determined by immunohistochemistry. The data obtained suggest that the use of a calcium-containing filler is promising for skin regeneration after a burn and can provide an extracellular matrix of the dermis with a composition and architecture of a collagen network close to natural. Differentiated detection of type I and III collagens confirmed the activation of the rate of collagen synthesis by fibroblasts in both the dermis of the burn zone and in the implant zone by the end of the second month. The assessment of the tissue entropy index confirms the similarity of the structural organization as dermis of the natural as restored after the burn and the use of the preparation. The strategy proposed in the experiment, using the body's own cells to synthesize an extracellular matrix similar to the natural one, can be an alternative to existing methods of burn treatment.

Key words: skin, skin burn, dermis, collagen synthesis, fillers

Article received 31 March 2022

Article accepted 15 January 2022

Введение. Стадийность репарации кожи после ожоговой травмы описана в литературе достаточно подробно и постулируется как многоступенчатый процесс, включающий в себя такие фазы, как воспаление, пролиферация и ремоделирование [1–3]. Каждая из названных фаз протекает с участием различных клеток дермы, что приводит к формированию определенного морфологического градиента [4–8]. При этом началом процесса регенерации считается эффект «закрытия» фибробластами раневого повреждения путем синтеза ими экстрацеллюлярного матрикса дермы (далее - ЭЦМ). Введение в медицинскую практику современных методов лечения ожоговых травм с использованием биоинженерных заменителей кожной и клеточной терапии оставляют за собой проблему, связанную с восстановленными участками кожи, которые отличаются от здоровой степенью организации коллагеновой сети, не соответствующей здоровой дерме, а также отсутствием эластина, придатков кожи и полноценного эффекта дифференцировки фибробластов в миофибробласты и изменением характера ремоделирования дермы с формированием грубого рубца [9–15]. Для решения этой проблемы могут быть использованы препараты, способные восстанавливать естественную архитектуру дермы. Такой подход представляется перспективным, ибо соответствует современной концепции регенеративной медицины, предлагающей использовать для реконструкции органов и тканей собственные ресурсы организма [16–18].

Целью исследования является изучение морфологических преобразований дермы в зоне ожога с использованием биодеградируемого инъекционного препарата-имплантата на основе гидроксиапатита кальция «Radiesse», выступающего в роли динамичного и мультифункционального регулятора клеточной активности дермы.

Материалы и методы исследования. Экспериментальное исследование выполнено на 30 самцах беспородных крыс массой 200–250 грамм. Животных содержали в виварии с регулируемым световым режимом и свободным доступом к пище и

воде, что соответствует ГОСТу РФ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Содержание и дизайн исследований согласованы с локальным этическим комитетом Кубанского госмедуниверситета (протокол № 54 от 11.10.2017). Исследование проводилось в течение 4 месяцев. Для моделирования ожоговой раны использовали латунный цилиндр с площадью рабочей поверхности 706 мм² и массой 300 грамм, нагретый до 100 градусов в кипящей воде. Цилиндр прикладывался рабочей поверхностью к депилированной коже животного в области холки на 15 секунд, что обеспечивало формирование ожога III-й степени. Для анестезии использовали ингаляционный наркоз. Всех животных после ожога разделили на две группы: контрольную (10 животных) и опытную (20 животных). В рамках протокола эксперимента на 14 день после нанесения ожога крысам опытной группы вводили препарат «Radiesse». Введение филлера проводили субдермально в объеме 0,05 мл на границе визуально определяемой интактной кожи. Этот день считали точкой отсчета эксперимента. В группе контрольных животных использовали стерильный физиологический раствор.

Объектом морфологического и иммуногистохимического анализа явились фрагменты кожных покровов в центре раневого дефекта и в участках неповрежденной кожи по краям ожоговой раны. Биологический материал забирали в сроки, соответствующие 2 и 4 месяцам. Из парафиновых блоков препаратов кожи изготавливали серийные срезы толщиной 4–5 микрон с использованием ротационного микротомы. Для оценки морфологического состояния зоны ожога срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Маллори, Массону и Ван-Гизон. Для избирательного выявления коллагенов использованы иммуногистохимические тесты с антителами к коллагену I и III типов. Общее содержание коллагена определяли путем компьютерной морфометрии срезов, окрашенных по Маллори. Полученные изображения подвергали морфометрии с использованием программы ImageJ, при этом измеряли площадь, занятую цветным продуктом химической реакции, соответствующую сум-

марному содержанию коллагена. Результаты измерений выражали в квадратных мегапикселях. Величину структурной тканевой энтропии определялся по масштабированным до формата 640×480 мегапикселей микрофотографиям с использованием 16-цветной палитры [19]. Все данные подвергались статистической обработке. Проверку характера распределения вариационных рядов производили с помощью параметрического критерия Пирсона. Во всех исследованных вариационных рядах значения асимметрии и эксцессов немного отличались от нуля, поэтому можно было считать, что распределения показателей являются нормальными. Учитывая близость распределений значений к нормальному, дополнительно проводили сравнение средних величин по критерию Стьюдента на уровне различий $p < 0,05$. Влияние фактора ожога на различие значений показателей по времени проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа по критерию Фишера на уровне различий $p < 0,001$.

Результаты исследования и обсуждение. Проведенная нами сравнительная морфологическая характеристика изменений, наблюдаемых в дерме в ответ на введение препарата и после его двухмесячного пребывания в дерме показало наличие имплантата, окруженного соединительнотканной капсулой. Имплантат выглядит в виде совокупности микросфер округлой или овальной формы, ограниченных тонкими фибриллами и одним слоем плоских оксифильно окрашенных клеток. Содержимое микросфер отсутствует, лишь изредка в них определяется мелкодисперсная масса. Между микросферами визуализируется небольшое число клеток, окрашивающихся базофильно и оксифильно. Окраска по Маллори позволяет увидеть коллагеновые волокна, последних в зоне ожога достаточно много, они формируют пучки, местами разделенные миофибробластами и гладкомышечными клетками. Зона имплантата сохранена и содержит много микросфер, вокруг каждой из них определяется интенсивно окрашенная капсула и содержащее микросфер (рис. 1). Клетки между микросферами округлой формы, некото-

рые из них имеют пенистую цитоплазму (рис. 2). Эпидермис через 2 месяца после нанесения ожога восстанавливает свою целостность и насчитывает от 5 до 6 четко дифференцированных слоев (рис. 3).

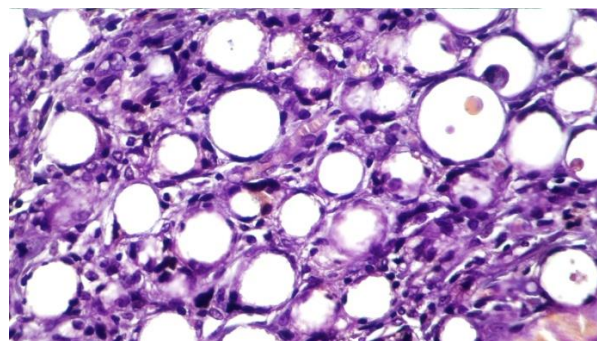


Рис. 1. Микрофото препарата кожи зоны имплантата через 2 месяца после введения филлера. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.: ×400

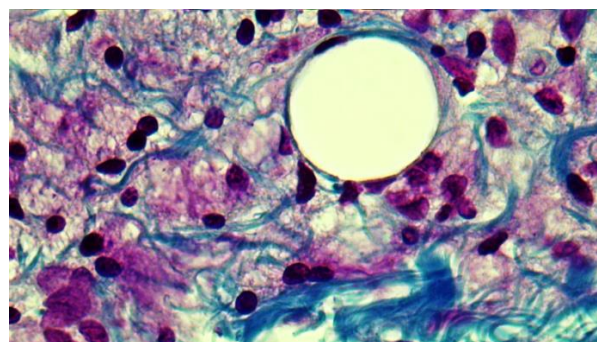


Рис. 2. Микрофото препарата кожи зоны имплантата через 2 месяца после введения филлера. Окр. по Маллори. Ув.: ×400

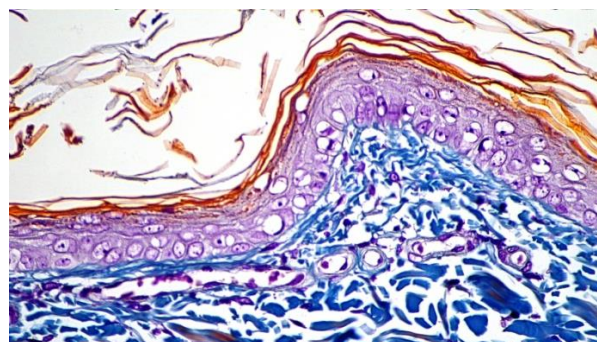


Рис. 3. Микрофото препарата кожи зоны введения имплантата через 2 месяца. Окр. по Маллори. Ув.: ×400

При сравнении микропрепаратов кожи животных экспериментальной группы с пролонгированным до 4-х месяцев

сроком пребывания в зоне дермы филлера, окрашенных по Маллори также сохраняется высокий уровень содержания коллагена, формирующего уже параллельно ориентированные фибриллярные пучки (рис. 4). Между коллагеновыми фибриллами можно видеть значительное число миофибробластов. Поверхностный компартмент дермы содержит сместившиеся в эту зону концевые отделы сальных желез. Эпидермис на участке ожога гипертрофирован и насчитывает до 6–7 клеточных рядов, которые покрывают высокие сосочки), меняющие рельеф поверхности кожи (рис. 4).

Дерма в зоне сосочкового слоя характеризуется наличием большого числа фибробластов, располагающихся между плотно упакованными пучками коллагена (рис. 5). Участок импланта локально не выявлялся из-за его биодеградации. Использование окраски по Ван-Гизон и Мас-сону подтверждает выявленный эффект активации неоколлагеногенеза к сроку пребывания филлера в дерме до 2-х месяцев и сохранение его объема с последующим увеличением в условиях пролонгирования воздействия филлера до 4-х месяцев.

Проведенная морфометрия объема фибриллярного компонента экстрацеллюлярного матрикса показала, что в срок, соответствующий двум месяцам после введения импланта происходит увеличение содержания коллагена в среднем на 61%. К 4-му месяцу эксперимента уровень содержания коллагена становился выше исходного на 87%.

Для оценки характера структурной организации вновь синтезированного фибриллярного компонента ЭЦМ нами был использован показатель энтропии, который является мерой функциональной целостности ткани и неупорядоченности морфологических систем в условиях нормы и патологии, что позволяет проводить сравнения и судить о динамике процесса. Оказалось, что участок дермы, регенерированный без импланта имеет показатель энтропии $3,78 \pm 0,13$, что указывает на его дезорганизацию. Введение импланта заканчивается синтезом участка ЭЦМ с коэффициентом энтропии $2,98 \pm 0,06$, что можно интерпрети-

ровать как эффект установления в этой зоне дермы морфофункциональной стабильности (рис. 6).

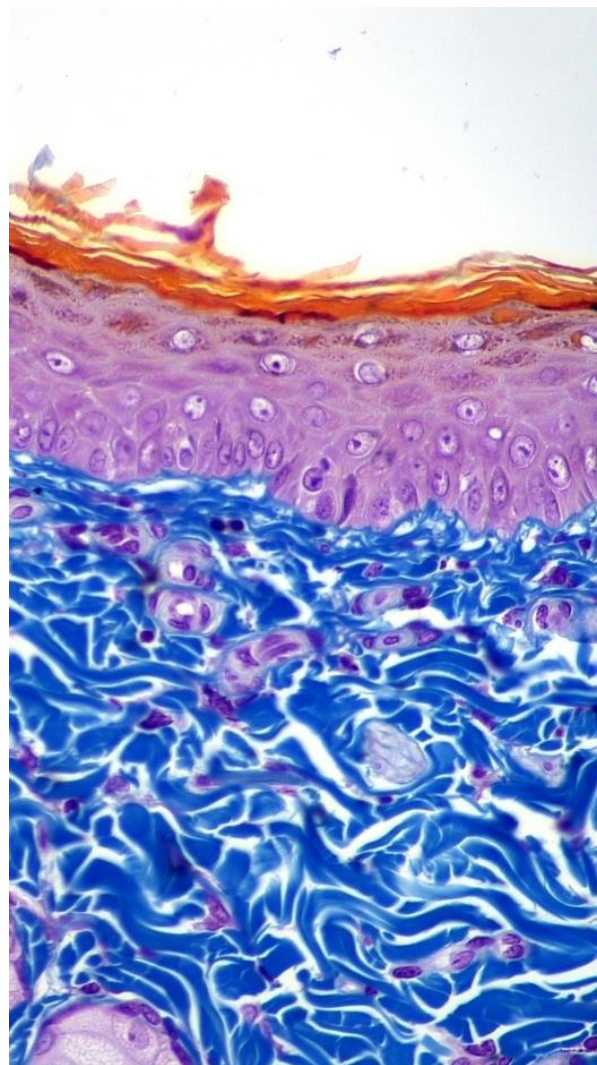


Рис. 4. Микрофото препарата кожи зоны введения импланта через 4 месяца. Окр. по Маллори. Ув.: $\times 400$

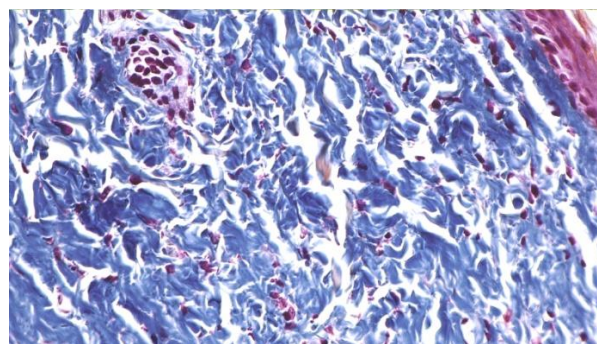


Рис. 5. Микрофото препарата кожи зоны введения импланта через 4 месяца. Окр. по Маллори. Ув.: $\times 400$

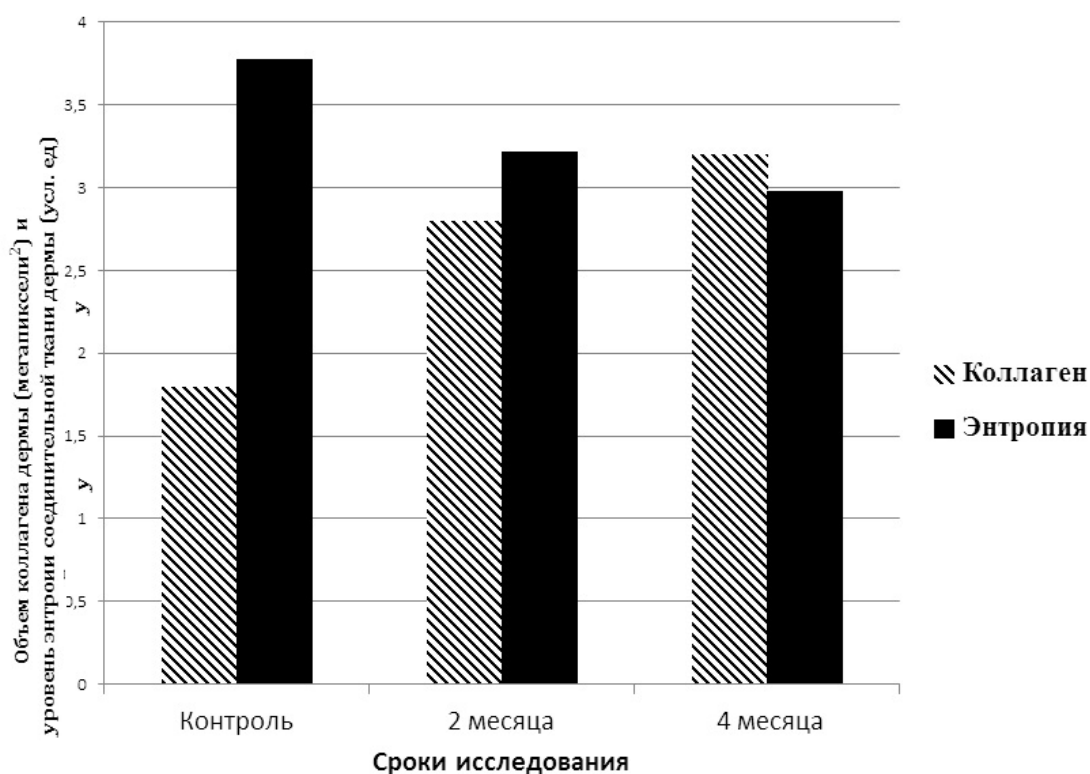


Рис. 6. Динамика объема коллагена в экстрацеллюлярном матриксе и уровня структурной тканевой энтропии дермы в зоне термического ожога кожи контрольной и экспериментальной групп животных в различные сроки исследования

Изучение распределения коллагена с использованием иммуногистохимического метода позволило охарактеризовать типы синтезируемого коллагена. Так, оказалось, что имплант в срок, соответствующий двум месяцам, обеспечивает синтез коллагена I типа в количественном отношении больше обычного в 2 раза, что подтверждает эффект неоколлагеногенеза на фоне введения препарата. При этом наиболее высоким уровнем экспрессии проколлагена характеризуются клетки фибробласты. Отдельные участки аморфного компонента дермы окрашены диффузно и экспрессируют низкий уровень синтеза коллагена. В зоне импланта визуализируются микросферы, стенки их определяются за счет единичных, тонких, слабо окрашенных фибрилл. При выявлении коллагена I типа спустя 4 месяца после пребывания в зоне дермы импланта фибробласты выглядят более крупными с большим числом отростков, что указывает на активацию в них процесса экзоцитоза проколлагена. Повышение уровня экс-

прессии коллагена I типа отмечается и в зоне ЭЦМ.

Коллаген III типа в срок, соответствующий 2 месяцам наблюдения, накапливается в дерме в большем количестве, чем коллаген I типа, в то же время зона экспрессии этих двух типов коллагена совпадает. Это, прежде всего, фибробласты, заполненные тропоколлагеном. Число этих клеток нарастает, но они мелкие, вытянутой веретеновидной формы с многочисленными отростками, заполненными секретом. В зоне импланта к этому сроку уровень экспрессии коллагена III типа умеренный. Обращает на себя внимание положительная реакция содержимого микросфер, которое выглядит в виде мелкодисперсной массы с умеренной экспрессией коллагена III типа. В условиях пролонгирования срока пребывания препарата филлера до 4 месяцев, уровень экспрессии коллагена III типа в зоне импланта не меняется, а в дерме над ним визуализируется большое число фибробластов с высоким уровнем экспрессии коллагена III типа.

Результаты наших экспериментов показали, что процесс регенерации ЭЦМ дермы, приуроченный к двум месяцам пребывания филлера в дерме, индуцирует эффект неокollaгеногенеза, регистрируемый при гистохимическом его выявлении по Маллори, при этом процесс неокollaгеногенеза с пролонгированным действием филлера до 4-х месяцев нарастает.

Дифференцированное выявление коллагенов I и III типов с использованием антител подтверждает активацию темпа неокollaгеногенеза фибробластами как дермы, так и импланта к концу второго месяца, причем этот факт прослеживается в распределении коллагена как I, так и III типа. Темп синтеза первого сохраняется достаточно высоким до 4-х месяцев пребывания филлера в дерме. Что же касается коллагена III типа, то отмечается усиление темпа синтеза его в зоне дермы к сроку, соответствующему 2-м месяцам, к 4-м месяцам синтез его в зоне импланта снижается. В самой дерме характер распределения коллагена III типа остается высоким и

соответствует картине двух месяцев пребывания филлера в зоне ожога.

Заключение. Таким образом, полученные данные позволяют считать, что использование биodeградируемого препарата филлера на основе гидроксиапатита кальция «Radiessse» представляется перспективным для регенерации дермы после ожога и может обеспечить получение ЭЦМ дермы, имеющего состав и сборку коллагеновой сети, приближенной к естественной. Использование показателя энтропии подтверждает общность структурной организации дермы. Не исключено, что выявленный тип формирования ЭМЦ может обеспечить становление межклеточных коммуникаций для фибробластов, макрофагов и кератиноцитов, что обеспечит процесс модуляции синтезируемой дермы, аналогично имеющейся *in vivo*. Предлагаемая в эксперименте стратегия с использованием собственных клеток организма для синтеза внеклеточного матрикса, аналогичного естественному, может явиться альтернативой существующим методам лечения ожогов.

Литература References

1. Zhang X, Kang X, Jin L et al. Stimulation of wound healing using bioinspired hydrogels with basic fibroblast growth factor (bFGF). *Int J Nanomed.* 2018;(13):3897-3906. DOI: 10.214/IJN.S168998.
2. Velnar T, Bunc G, Klobucar R et al. Biomaterials and host versus graft response: A short review. *Bosn J Basic Med Sci.* 2016;16(2):82–90. DOI: 10.17305/bjbm.2016.525
3. Urciuolo F, Casale C, Imparato G et al. Bioengineered Skin Substitutes: The Role of Extracellular Matrix and Vascularization in the Healing of Deep Wounds. *J Clin Med.* 2019;8:2083. DOI: 10.3390/jcm 8122083
4. Hesketh M, Sahin KB, West ZE et al. Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 2017;18:154. DOI: 10.3390/ijms18071545
5. Zavgorodniia MI, Makeeva LV, Slavcheva OS et al. Cellular and molecular basics of the wound healing. *Morphologia.* 2016;10(3):19-23
6. Gorokhova VS, Chernovol PA, Chenovol VP i dr. Variabel'nost' otveta trombocitov na ADF: ot teorii trombogeneza k prakticheskomu primeniyu bogatoy trombocitami plazmy. *Klinicheskaya i laboratornaya diagnostika.* 2016;61(6):363-367. In Russian
7. Gilroy D, De Maeyer R. New insights into the resolution of inflammation. *Semin Immunol.* 2015;27(3):161-168. DOI: 10.1016/j.smim.2015.05.003.
8. Donati G, Watt FM. Stem cell heterogeneity and plasticity in epithelia. *Cell Stem Cell.* 2015;16:465-476. DOI: 10.1016/j.stem.2015.04.014.
9. Rittie L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. *J. Cell Commun Signal.* 2016;10(2):103-120. DOI: 10.1007/s12079-016-0330-1
10. Motwani MP, Flint JD, De Maeyer RP et al. Novel translational model of resolving inflammation triggered by UV-killed *E. coli*. *J Pathol Clin Res.* 2016;2(3):154-165. DOI: 10.1002/cjp2.43
11. Schlader ZJ, Vargas NT. Regulation of Body Temperature by Autonomic and Behavioral Thermoeffectors. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 2019;47:116-126
12. Lombardi B, Casale C, Imparato G et al. Spatiotemporal Evolution of the Wound Repairing Process in a 3D Human Dermis Equivalent. *Adv. Healthc. Mater.* 2017;6:1–11. DOI: 10.1249/jes.0000000000000180
13. Martorina F, Casale C, Urciuolo F et al. In vitro activation of the neuro-transduction mechanism in sensitive organotypic human skin model. *Biomaterials.* 2017;113:217-229. DOI: j.biomaterials.2016.10.051
14. Boyce ST, Lalley AL. Tissue engineered/ing of skin and regenerative medicine for wound care. *Burns Trauma.* 2018;6:1-10. DOI: 10.1186/s4038-017-0103-y
15. Fetah K, Tebon P, Goudie MJ et al. The emergence of 3D bioprinting in organ-on-chip systems. *Reports Prog. Biomed. Eng.* 2019;1:012001. DOI: 10.1088/2516-1091ab 23df
16. Tarassoli SP, Jessop ZM, Al-Sabah A et al. Skin tissue engineering using 3D bioprinting: An evolving research field. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.* 2018;71:615–623
17. Shukla Boulet LP. Airway remodeling in asthma: update on mechanisms and therapeutic approaches. *Curr Opin Pulm Med* 2018;24(1):56-62. DOI: 10.1097/mcp.0000000000000441

18. Michalek IM, Lelen-Kaminska K, Caetano Dos Santos FL. Peptides stimulating synthesis of extracellular matrix used in anti-ageing cosmetics: are they clinically tested? A systematic review of the literature. *Australas J Dermatol.* 2019;60(4):e267-e271. DOI: 10.1111/ajd.13036
19. Krasil'nikova SV, Eliseeva TI, Popov KS i dr. Mul'timorbidnost' patologii verkhnikh dykhatel'nykh putey u detey s bronkhial'noy astmoy. *Pediatrics.* 2018;97(2):19-26. In Russian. DOI: 10.24110/0031-403x-2018-97-2-19-26
20. Avtandilov GG. *Morfometriya. Rukovodstvo.* Moskva: Meditsina, 1990.- 384s. In Russian

Авторы заявляют об отсутствии каких-либо конфликтов интересов при планировании, выполнении, финансировании и использовании результатов настоящего исследования

The authors declare that they have no conflicts of interest in the planning, implementation, financing and use of the results of this study

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Могильная Галина Михайловна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой гистологии с эмбриологией, Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия;
e-mail: rukovoditel2021_kmu@mail.ru

Фомичева Евгения Васильевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры гистологии с эмбриологией, Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия; **e-mail: fomevg@mail.ru**

Евглевский Андрей Александрович, доцент, кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии с эмбриологией, Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия;
e-mail: evglandr@mail.ru

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Galina M. Mogil'naya, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Histology with Embryology, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia;
e-mail: rukovoditel2021_kmu@mail.ru

Evgeniya V. Fomicheva, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Histology with Embryology, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia;
e-mail: fomevg@mail.ru

Andrey A. Evglevskiy, Candidate of Medical Sciences, Docent, Associate Professor of the Department of Histology with Embryology, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia;
e-mail: evglandr @mail.ru