

© Коллектив авторов, 2018
УДК 616.5-001.4-003.9:599.323.4:576.8.093.3

В. А. Миханов, Р. А. Абземелева, Н. Р. Бакаева, О. Ю. Сипайлова, К. В. Корочина

ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАТИВНОГО ГИСТОГЕНЕЗА КОЖИ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТАБОЛИТОВ КУЛЬТУРЫ *BACILLUS SUBTILIS* 804

Кафедра патологической анатомии (зав. — проф. В. С. Полякова), ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России

Цель — изучение влияния метаболитов культуры *Bacillus subtilis* 804 на процессы репаративного гистогенеза при заживлении глубоких линейных ран кожи крыс.

Материал и методы. 40 крысам линии Вистар нанесены линейные раны на коже длиной 3 см, глубиной до гиподермы. В опыте раны орошали раствором метаболитов культуры *Bacillus subtilis* 804, в контроле — изотоническим раствором NaCl. Использовали методики гистохимии и морфометрии; измеряли на 3-, 7-е и 11-е сутки объёмную плотность микрососудов, коллагеновых волокон, аморфного вещества, клеток эпидермиса и дермы.

Результаты. В опыте наблюдались более ранняя миграция макрофагов в зону повреждения, ускоренная пролиферация и дифференцировка эпителиоцитов и фибробластов с заменой коллагена III типа на I.

Выводы. Метаболиты *Bacillus subtilis* 804 оптимизируют функции клеток-эффекторов репаративного процесса, что способствует ускоренному заживлению ран.

Ключевые слова: кожа, крысы, раны кожи, репаративная регенерация, *Bacillus subtilis* 804

Изучение проблем репаративной регенерации является одной из фундаментальных задач биологии и медицины [1, 3]. Ключевую роль в пролиферации и дифференцировке различных клеток кожи и других тканей играет группа пептидов, относящихся к фактору роста фибробластов (ФРФ) [2, 4, 5]. В 2009 г. в Оренбургской государственной медицинской академии под руководством проф. В. И. Никитенко были получены продукты жизнедеятельности бактерий штамма *Bacillus subtilis* 804, стимулирующие рост фибробластов (ФБ) человека в культуре.

Целью настоящего исследования явилось изучение структурно-функциональных аспектов биостимулирующего влияния метаболитов культуры *Bacillus subtilis* 804 на процессы репаративного гистогенеза при заживлении глубоких линейных ран кожи крыс.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования проводили на 40 крысах-самцах линии Вистар массой $180,0 \pm 10,0$ г. Все исследования на животных были выполнены в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1984), «Хельсинкской декларацией этических принципов» (1975) и ее пересмотренным вариантом от 2008 г. Было получено одобрительное заключение локального этического комитета Оренбургского государственного медицинского университета (протокол № 82 от 20.06.2013 г.). После удаления волосяного покрова на спине животных в стерильных условиях под ингаляци-

онным наркозом были выполнены линейные раны на коже длиной 3 см, глубиной до гиподермы. Животные были разделены на 2 группы по 20 крыс. В 1-й (подопытной) группе зону раневого дефекта кожи однократно орошали 1,0 мл стерильного раствора метаболитов культуры *Bacillus subtilis* 804 в дозе равной 0,015 мкг/кг массы тела крысы. Во 2-й (контрольной) группе на рану наносили 1,0 мл изотонического раствора NaCl. Животных выводили из опыта на 3-, 7-е и 11-е сутки после нанесения раны на кожу. У подопытных и контрольных животных иссекали участки кожи с послеоперационными ранами и подлежащими тканями. Кусочки тканей фиксировали в 10 % растворе формалина, забуференного по Лилли, затем обезживали в этаноле возрастающей крепости и заливали в целлоидин и парафин по общепринятой методике. Гистологические срезы толщиной 5 мкм после депарафинизации исследовали при помощи световой микроскопии с применением гистологической (окраска гематоксилином Майера и эозином), гистохимической (окраска по Маллори, толуидиновым синим), иммуногистохимической (выявление экспрессии белка Ki-67, коллагена I–III типа) методик исследования. С помощью программы оптического анализа ImageJ 1.46h по цифровым микрофотографиям проводили морфометрическую оценку эпидермиса и дермы [подсчёт объёмной плотности сосудов микроциркуляторного русла, коллагеновых волокон (КВ), аморфного вещества, клеток]. При оценке экспрессии Ki-67 рассчитывали индекс пролиферации (ИП) по формуле: $ИП = (n/N) \times 100\%$, где n — число меченых ядер, N — общее число ядер в базальном и шиповатом слоях в поле зрения (на микрофотографии). В ходе иммуногистохимического исследования использовали моноклональные антитела и систему визуализации фирмы BioGenex, США. При проведении статистической обработки результатов вычисляли средние значения абсолютных

Сведения об авторах:

Миханов Василий Александрович (e-mail: vmikhanov@gmail.com), Абземелева Регина Асраровна, Бакаева Назиля Рифкатовна, Сипайлова Ольга Юрьевна, Корочина Кристина Владимировна, кафедра патологической анатомии, ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, 460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6

и относительных величин (М), ошибки средних величин (m) и t-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования. Область раневого дефекта кожи крыс в контрольной группе на 3-и сутки характеризуется интенсивной воспалительной реакцией в фазе экссудации. На фоне массивной инфильтрации полиморфно-ядерными лейкоцитами (ПЯЛ) и интерстициального отека (что отражается в увеличении объемной плотности аморфного вещества) наблюдалось небольшое число макрофагов (МФ). Активно продолжается лейкодиapedез. Эпителизация в большинстве случаев отсутствует либо нарастающий эпителий не покрывает полностью раневой дефект кожи. На 3-и сутки в подопытной группе определяется эпителизация раны под струпом. Эпителиальный пласт достигает 2–3 слоев. Воспалительная реакция — незначительная с преобладанием отечного компонента над инфильтративным. Соотношение МФ и нейтрофилов увеличивается по сравнению с контролем и составляет 2,3:1 соответственно (таблица).

Развитие грануляционной ткани (ГТ) и полное закрытие раневого дефекта эпителием наблюдали в контрольной группе на 7-е сутки. Однако наличие в ткани воспаления, недостаточная макрофагальная реакция задерживали эпителизацию, а также пролиферацию и дифференцировку ФБ. Тонкие КВ ($2,8 \pm 0,2$ мкм) были представлены коллагеном III типа. На 7-е сутки в подопытной группе процесс интеграции коллагеновых фибрилл продолжался, значимо нарастала ($p < 0,01$ в сравнении с контролем) толщина КВ до $3,9 \pm 0,3$ мкм. На 7-е сутки уже инициировался процесс реорганизации ГТ, выражающийся в запустевании и редукции сосудов, постепенной деградации коллагена III типа и появлении зрелого коллагена I типа. В результате значительно увеличения пролиферативной активности эпителиоцитов формировались до 6–7 слоев эпителия, что соответствовало нормальной толщине эпидермиса кожи крысы.

На 11-е сутки в подопытной группе в связи с завершением формирования эпителиального пласта, дифференцирующегося на все функциональные слои, наблюдалось снижение ИП. Собственно дерма была представлена плотной волокнистой неоформленной соединительной тканью,

Соотношение объемной плотности тканевых структур соединительной ткани и индекса пролиферации эпителиоцитов в области раневого дефекта кожи у крыс подопытной и контрольной группы на разных сроках репарации

Структуры	Срок, сутки																	
	3-и				7-е				11-е									
	Группа																	
	Контрольная			Подопытная			Контрольная			Подопытная								
Аморфное вещество, %	28,2±1,1			11,8±0,5*			12,6±1,3			8,3±0,2*			8,7±0,5			5,9±0,4*		
	30,1±1,2			23,1±1,1*			22,9±1,4			21,6±0,5			24,5±1,2			13,1±0,7*		
Клетки (ФБ, ПЯЛ, МФ, тучные клетки и лимфоциты), %	ФБ	ПЯЛ	МФ	ФБ	ПЯЛ	МФ	ФБ	ПЯЛ	МФ	ФБ	ПЯЛ	МФ	ФБ	ПЯЛ	МФ	ФБ	ПЯЛ	МФ
	6,2± ±1,1	16,1± ±1,2	2,0± ±0,1	11,9± ±1,3*	2,9± ±0,2*	6,6± ±0,6*	10,1± ±1,2	4,2± ±1,0	4,9± ±0,1	12,3± ±1,3*	0,7± ±0,2*	7,5± ±0,8*	12,1± ±1,1	1,7± ±0,2	6,5± ±0,5	7,9± ±1,5*	0,1± ±0,1*	4,2± ±0,4*
Волокнистые структуры, %	32,3±1,5			44,4±1,4*			41,6±1,3			60,6±2,1*			57,7±1,9			74,4±2,6*		
Сосуды, %	9,4±0,2			20,7±1,2*			23,2±1,1			9,5±1,0*			9,1±0,6			6,6±0,3*		
ИП эпителиоци- тов, %	35,4±0,2			72,3±0,2*			62,3±0,2			92,3±0,2*			82,4±0,2			38,2±0,2*		

матрикс которой содержал КВ коллагена I типа, преимущественно ориентированных вдоль ФБ и базальной мембраны в соответствии с функциональной нагрузкой на ткань. Также заметно уменьшалась средняя толщина КВ до $2,4 \pm 0,2$ мкм.

Морфологическая картина в контроле на 11-е сутки была сходна с таковой в опыте на 7-е, хотя и здесь можно отметить ряд отличий. Во-первых, меньшее значение ИП базальных кератиноцитов, что определяло замедление эпителизации и связано с нарушением созревания ГТ. Во-вторых, большая толщина КВ ($4,1 \pm 0,4$ мкм) в контроле на 11-е сутки и ($3,9 \pm 0,3$ мкм) в опыте на 7-е сутки.

Обсуждение полученных данных. В работе дано описание с количественной оценкой изменений структурных элементов области заживления глубоких линейных ран кожи крыс на разных сроках репарации. Известно, что заживление ран зависит от выраженности воспалительной реакции [1, 3]. Более высокий макрофагально-нейтрофильный индекс в подопытной группе свидетельствует об изначально меньшей выраженности воспалительного процесса, более быстром очищении раны и переходе на следующие этапы заживления по сравнению с контрольной группой. Уже на 3-и сутки в опыте инициируется процесс образования ГТ. Фибробластический дифферон гетерогенен: наряду с юными ФБ, отмечались функционально активные формы. Благодаря синтетической деятельности ФБ состав межклеточного вещества имел концентрацию и соотношение гликозаминогликанов и гликопротеинов, необходимых для инициации процесса агрегации молекул коллагена в фибриллы, что подтверждается формированием тонких коллагеновых волокон толщиной до $2,3 \pm 0,3$ мкм. Известно, что толщина волокон коллагена III типа меньше волокон коллагена I типа [5]. По нашим наблюдениям при увеличении содержания коллагена I типа в процессе заживления происходит одновременное уменьшение средней толщины КВ. Мы полагаем, что данное явление связано с преобладанием коллагенолиза коллагена III типа над синтезом коллагена I типа. Активность синтеза коллагена I типа и сборка КВ уступают деградации зрелых КВ, состоящих из коллагена III типа. Этим же можно объяснить и большую толщину КВ в контроле на 11-е сутки ($4,1 \pm 0,4$ мкм) по сравнению с опытом на 7-е сутки ($3,9 \pm 0,3$ мкм), что обусловлено менее выраженной реакцией МФ и замедлением процессов коллагенолиза уже зрелых КВ коллагена III типа. Полученные результаты соответствуют

данным литературы о реорганизации соединительной ткани при репаративных процессах [1, 3].

Выводы. 1. Применение метаболитов *Bacillus subtilis* 804 лимитирует выраженность воспалительного процесса, что определяет раннюю миграцию МФ в зону повреждения и ускоренное очищение раневого дефекта.

2. Входящие в состав метаболитов *Bacillus subtilis* 804 вещества стимулируют миграцию в рану фибробластов, их пролиферацию и дифференцировку, что обеспечивает формирование гетерогенного фибробластического дифферона уже на 3-и сутки после нанесения раны, а на 7-е сутки определяет перестройку грануляционной ткани с заменой беспорядочно ориентированных коллагеновых волокон, содержащих коллаген III типа, на функционально ориентированные пучки с коллагеном I типа.

3. При местном применении метаболиты *Bacillus subtilis* 804 стимулируют пролиферацию эпителиоцитов, способствуя ускоренному темпу формирования функционально и морфологически полноценного эпидермального пласта уже на 7-е сутки после альтерации.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: В. А. М.

Сбор и обработка материала: В. А. М, Р. А. А.

Статистическая обработка данных: В. А. М, Н. Р. Б, О. Ю. С., К. В. К.

Анализ и интерпретация данных: В. А. М.

Написание текста: В. А. М, Р. А. А.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аничков Н.Н., Волков К.Г. Морфология заживления ран. М.: Медгиз, 1951. 123 с. [Anichkov N.N., Volkov K.G. Wound Healing Morphology. M.: Medgiz, 1951. 123 p. In Russ.].
2. Гончарова В.П. Факторы роста фибробластов // Физиологический журнал им. Сеченова. 1994. Т. 80, вып.9. С. 163 [Goncharova V.P. Fibroblast Growth Factors // Fiziologicheskii zhurnal im. Sechenova. 1994. Vol. 80, № 9. P. 163. In Russ.].
3. Шехтер А.Б., Берченко Г.И. Грануляционная ткань: воспаление и регенерация // Арх. пат. 1978. Т. XL, вып.8. С. 20–28. [Shekhter A.B., Berchenko G.I. Granulation tissue: inflammation and regeneration // Arkhiv patologii. 1978. Vol. XL, № 8. P. 20–28. In Russ.].
4. Akita S., Akino K., Imaizumi T. Basic fibroblast growth factor accelerates and improves second-degree burn wound healing // Wound Repair Regen. 2008. Vol. 16, № 5. P. 635–641.
5. Cheng W., Yan-hua R., Fang-gang N., Guo-an Z. The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury in African // African J. Biotechnol. 2011. Vol. 10. № 13. P. 2524–2529.

Поступила в редакцию 26.10.2018

**CHARACTERISTICS OF SKIN HISTOGENESIS
REPARATIVE AS AFFECTED
BY THE METABOLITES
FROM BACILLUS SUBTILIS 804 CULTURE**

*V. A. Mikhanov, R. A. Abzemeleva, N. R. Bakayeva,
O. Yu. Sipailova, K. V. Korochina*

Objective —to study the effect of metabolites from the culture of *Bacillus subtilis* 804 on the reparative histogenesis in rats during the healing of deep linear skin wounds.

Materials and methods. Linear 3.0 cm-long full thickness (extending to the hypodermis) skin wounds were inflicted to 40 Wistar rats. In the experimental group, the wounds were irrigated with a solution of the metabolites of *Bacillus subtilis* 804 culture, while in the control group they were treated with NaCl

isotonic solution. Histochemical and morphometric methods were applied; at Days 3, 7 and 11 the microvessel, collagen fiber, amorphous substance, epidermal and dermal cell volume density was measured.

Results. In the experimental group, the earlier migration of macrophages to the damaged region was observed, as well as accelerated proliferation and differentiation of epithelial cells and fibroblasts, accompanied by replacement of type III collagen by type I.

Conclusions. Metabolites of *Bacillus subtilis* 804 optimize the functions of effector cells of the reparative process, which promote the accelerated wound healing.

Key words: *skin, rats, skin wounds, reparative regeneration, Bacillus subtilis 804*

Department of Human Anatomy, Orenburg State Medical University, 6 Sovetskaya St, Orenburg 460000