

DOI: 10.18499/2225-7357-2019-8-2-55-59

УДК 616–001.41:616–003.93

14.03.01 – патологическая анатомия

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

© Коллектив авторов, 2019

Регенерация глубоких линейных ран кожи крыс при местном воздействии метаболитами культуры *Bacillus subtilis* 804

В. А. Миханов¹, В. С. Полякова¹, Р. А. Абземелева¹,
Е. И. Шурыгина¹, А. В. Курамысов²

¹ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, Оренбург, Россия

²ГАУЗ «Оренбургская районная больница», Оренбург, Россия

Цель работы – изучение влияния метаболитов культуры *Bacillus subtilis* 804 на процессы заживления глубоких линейных ран кожи крыс.

Материал и методы. Исследование выполнено на 40 крысах линии «Вистар», которым под ингаляционным эфирным наркозом наносили линейные раны кожи длиной 1.0 см и глубиной до гиподермы. Животные были разделены на 2 группы по 20 крыс в каждой. В 1-й опытной группе зону раневого дефекта кожи однократно орошали 1.0 мл стерильного раствора метаболитов культуры *Bacillus subtilis* 804. Во 2-й контрольной группе на рану наносили 1.0 мл физиологического раствора. Ткани из области раневого дефекта изучали при помощи методов световой микроскопии, гистохимии и морфометрии на 3-, 7- и 11-е сутки.

Результаты. В опыте наблюдалась более ранняя миграция макрофагов в зону повреждения, большее значение макрофагально-нейтрофильного индекса, что свидетельствовало об изначально меньшей выраженности воспалительного процесса, более быстром очищении раны и переходе на следующие этапы заживления с ускоренной пролиферацией и дифференцировкой эпителиоцитов и фибробластов с заменой коллагена III типа на I тип.

Заключение. Метаболиты *Bacillus subtilis* 804 оптимизируют функции клеток-эффекторов репаративного процесса, что лимитирует выраженность воспаления и определяет раннюю миграцию макрофагов в зону повреждения, ускоренное очищение раневого дефекта, стимулирует миграцию в рану фибробластов и эпителиоцитов, способствует формированию функционально и морфологически полноценного эпидермального пласта на 7-е сутки, а дермального компонента на 11-е сутки после альтерации, приводит к ограничению склероза при ремоделировании формирующегося рубца, обеспечивая его нормотрофичность.

Ключевые слова: линейные раны кожи, репаративная регенерация, *Bacillus subtilis* 804.

Regeneration of Deep Linear Wounds of Rats' Skin by Local Exposure to Metabolites of a *Bacillus Subtilis* 804 Culture

© V.A. Mikhanov¹, V.S. Polyakova¹, R.A. Abzemeleva¹, E.I. Shurygina¹, A.V. Kuramysov², 2019

¹Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia

²Orenburg District Hospital, Orenburg, Russia

The aim of the research was to study of the effect of metabolites of the culture of *Bacillus subtilis* 804 on the healing processes of deep linear wounds of rats' skin.

Material and methods. The study was performed on 40 Wistar rats, which were made linear skin wounds 1.0 cm in length and depth to the hypodermis under the inhalation ether anesthesia. The animals were divided into 2 groups (20 rats in each). In the 1st experimental group, the area of the skin wound defect was once watered with 1.0 ml of a sterile solution of the *Bacillus subtilis* 804 metabolites. In the 2nd control group 1.0 ml of saline was applied to the wound. Tissues from the area of the wound defect were studied using light microscopy, histochemistry, and morphometry on days 3, 7, and 11.

Results. In the experiment, an earlier migration of macrophages into the damage zone and a higher value of macrophage-neutrophil index were observed, which indicated the initially less pronounced inflammatory process, faster wound cleansing and the transition to the next stages of healing with accelerated proliferation and differentiation of epithelial cells and fibroblasts with the replacement of type III collagen by type I.

Conclusions. The metabolites of *Bacillus subtilis* 804 optimize the function of effector cells of the reparative process, that limits the severity of inflammation and determines the early migration of macrophages to the damaged area, accelerated cleansing of the wound defect, stimulates the migration of fibroblasts and epithelial cells into the wound, contributes to the formation of a functional and morphologically complete epidermal layer on the 7th day, and the dermal component on the 11th day after the alteration, leads to the limitation of sclerosis during remodeling of the forming scar, ensuring its normotrophicity.

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

*Автор для переписки:

Миханов Василий Александрович
 ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, ул. Советская, 6, г. Оренбург, 460000, Российская Федерация
 E-mail: vmikhanov@gmail.com

*Corresponding author:

Vasilii Mikhanov
 Orenburg State Medical University, ul. Sovetskaya, 6, Orenburg, 460000, Russian Federation
 E-mail: vmikhanov@gmail.com

Введение

Не смотря на значительные достижения репаративной медицины в области заживления ран, не вызывает сомнений актуальность данной проблемы и в настоящее время [1, 2, 7, 12]. Особое значение имеет репарация кожных ран при оперативных вмешательствах в косметологической практике и пластической хирургии, т.к. основной задачей здесь является достижение процесса заживления с формированием нормотрофического рубца кожи. На сегодняшний день применяют многочисленные методы как общего, так и местного воздействия на кожные раны, позволяющие корректировать результаты их заживления [1, 13, 18, 19]. Для этого используются различные препараты, в том числе полученные с помощью современной биотехнологии на основе субстанции цитокинов [6, 14, 16, 20]. Из литературы известно, что значительное влияние на регенерацию тканевых элементов кожи оказывают цитокины – факторы роста фибробластов [3, 8, 9, 12]. В 2009 В.И. Никитенко были выделены метаболиты бактерий *Bacillus subtilis* 804, способствующие миграционной активности и пролиферации фибробластов [5].

Цель исследования: изучение структурно-функциональных особенностей биокорректирующего воздействия продуктов жизнедеятельности бактерий *Bacillus subtilis* 804 на процессы формирования рубца в условиях репаративной регенерации линейных ран кожи.

Материал и методы исследования

Объектом исследования служили участки кожи с послеоперационными ранами и подлежащими тканями 40 крыс-самцов линии «Вистар» массой 180.0 ± 10.0 г, полученных из вивария лабораторных животных Оренбургского государственного медицинского университета, где они находились без ограничения доступа к воде и пище. При работе с экспериментальными животными учитывались требования Европейской конвенции по защите позвоночных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Под эфирным наркозом после локальной депиляции на спине животных в межлопаточной области через все слои

кожи наносили линейные раны длиной 1.0 см, с последующим наложением шва, который снимали на 5-е сут. Животным первой группы (20 крыс) на поверхность раневого дефекта наносили 1.0 мл стерильного раствора метаболитов культуры *Bacillus subtilis* 804 с повторением процедуры на 2-е и 3-и сут. Контролем служили 20 крыс, которым поверхность раны орошали 1.0 мл 0.9% водным раствором NaCl на 1-, 2- и 3-и сут эксперимента. Животных вывели из эксперимента с соблюдением всех требований Европейской конвенции по защите позвоночных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заключали в парафин с последующим изготовлением срезов толщиной 5–7 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином Майера и эозином. Для иммуногистохимического выявления белка Ki-67, коллагенов I и III типа применяли антитела и реактивы для визуализации производства BioGenex (США). Проводили морфометрическую оценку результатов исследования. Индекс пролиферации (ИП) вычисляли согласно формуле:

$$\text{ИП} = (n^+ / N) \times 100\%,$$

где n^+ – количество ядер с иммуногистохимически идентифицированной экспрессией белка Ki-67, N – общее количество ядер в исследованной совокупности.

Статистический анализ результатов исследования осуществлялся с использованием программы «STATISTICA-10» и вычислением средней арифметической, ошибки средней, критерия Стьюдента. Значимыми считали различия между средними показателями при $p \leq 0.05$.

Результаты и их обсуждение

В контроле на 3-и сут эксперимента наблюдается массивная лейкоцитарная инфильтрация с небольшим количеством макрофагов. Обилие интракапиллярно расположенных лейкоцитов указывает на продолжающийся процесс лейкодиapedеза, а значительный объем аморфного вещества – на выраженный интерстициальный отек. Нарастающий с краев эпидермис, как правило, лишь частично эпителизирует поверхность раны. В опыте уже на 3-и сут при эпителизации раневого дефекта формируется 2–3 слоя эпителиоцитов. По сравнению с контролем происходит значительное увеличение численности макрофагов при уменьшении лейкоцитарной инфильтрации и отека (табл.).

На 7-е сут в контроле наблюдается полное закрытие раневого дефекта 1–2 слоями эпителиоцитов, но продолжающаяся экссуда-

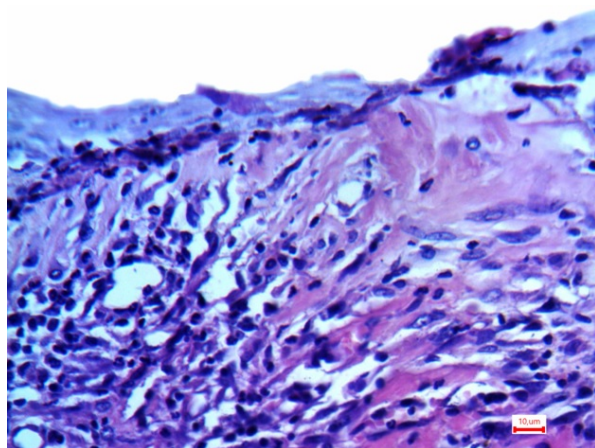


Рис. 1. Резаная линейная рана кожи крысы, контроль, 7-е сут. Окраска гематоксилином Майера и эозином. Ув. 300. Масштабный отрезок – 10 мкм.

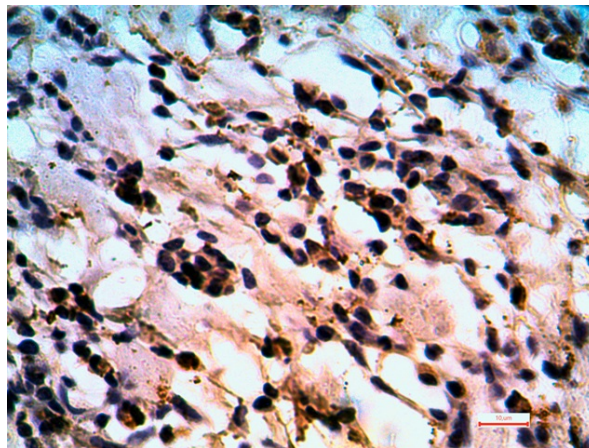


Рис. 2. Резаная линейная рана кожи крысы, контроль, 7-е сут. Иммуногистохимическое выявление коллагена III типа (коричневый цвет). Ув. 600. Масштабный отрезок – 10 мкм.

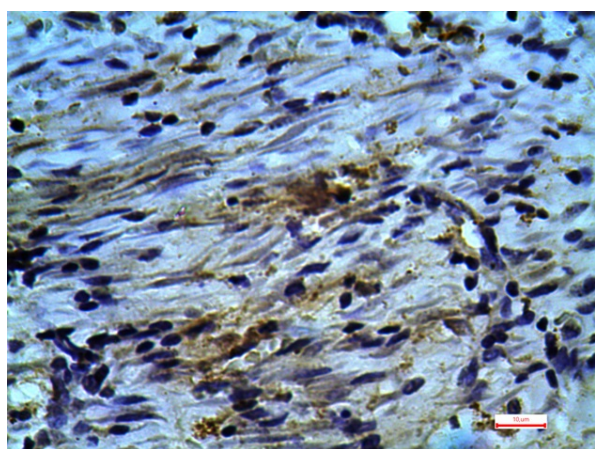


Рис. 3. Резаная линейная рана кожи крысы, опыт, 7-е сут. Иммуногистохимическое выявление коллагена I типа (коричневый цвет). Ув. 600. Масштабный отрезок – 10 мкм.

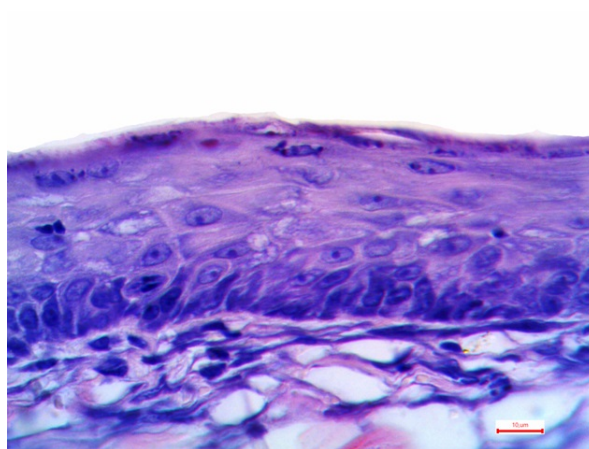


Рис. 4. Резаная линейная рана кожи крысы, опыт, 7-е сут. Окраска гематоксилином Майера и эозином. Ув. 600. Масштабный отрезок – 10 мкм.

Морфометрическая оценка гистологических структур заживающих ран кожи в опытных и контрольных группах, %

Таблица

Тканевые структуры	Сроки репарации					
	3-е сут		7-е сут		11-е сут	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
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**
Клетки	30.1±1.2	23.1±1.1*	22.9±1.4	21.6±0.5	24.5±1.2	13.1±0.7**
- фибробласты	6.2±1.1	11.9±1.3**	10.1±1.2	12.3±1.3*	12.1±1.1	7.9±1.5**
- лейкоциты	16.1±1.2	2.9±0.2***	4.2±1.0	0.7±0.2***	1.7±0.2	0.1±0.1***
- макрофаги	2.0±0.1	6.6±0.6**	4.9±0.1	7.5±0.8**	6.5±0.5	4.2±0.4**
Волокна	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 эпителиоцитов	35.4±0.2	72.3±0.2***	62.3±0.2	92.3±0.2**	82.4±0.2	38.2±0.2***

Примечание: показатель «клетки» объединяет фибробласты, лейкоциты, макрофаги, тучные клетки и лимфоциты; * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ – степень достоверности различий по сравнению контролем соответствующего срока наблюдения.

тивная фаза воспаления при недостаточно развитой пролиферативной фазе, что подтверждается слабо выраженной макрофагальной инфильтрацией, приводит к задержке эпителизации, а также низкому уровню пролиферации и дифференцировки фибробластов (рис. 1). Тонкие коллагеновые волокна

(3.1 ± 0.4 мкм) представлены преимущественно коллагеном III типа (рис. 2).

В опыте на 7-е сут продолжающаяся интеграция коллагеновых фибрилл приводит к увеличению толщины коллагеновых волокон до 5.2 ± 0.3 мкм ($p < 0.01$). Редукция числа кровеносных сосудов с запустеванием их просве-

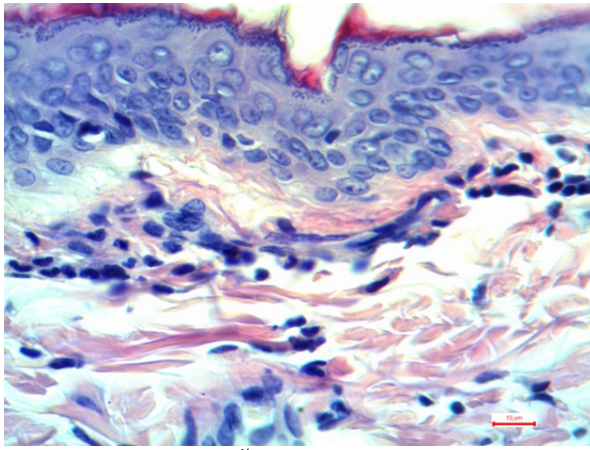


Рис. 5. Резаная линейная рана кожи крысы, опыт, 11-е сут. Окраска гематоксилином Майера и эозинном. Ув. 600. Масштабный отрезок – 10 мкм

тов, а также появление коллагена I типа при уменьшении содержания коллагена III типа подтверждают начавшийся процесс реорганизации грануляционной ткани (рис. 3).

Эпидермис, покрывающий зону раневого дефекта, на этом сроке становится органотипичным для крысы и состоит из 6–7 слоев эпителиоцитов (рис. 4).

На 11-е сут в опыте наблюдается снижение ИП, что подтверждает завершение процесса формирования эпидермиса. Органотипичность строения дермы на этом сроке репарации характеризуется наличием в ней коллагеновых волокон, состоящих большей частью из коллагена I типа, толщиной 4.6 ± 0.2 мкм, направление которых, главным образом, ориентировано параллельно базальной мембране эпидермиса и фибробластам (рис. 5).

В контрольной группе животных гистоморфологические параметры на 11-е сут репаративного процесса соответствуют 7-м сут заживления у опытных животных. При этом контроль характеризуется более медленной эпителизацией раневого дефекта, что подтверждается меньшим значением показателя пролиферативной активности эпителиоцитов – индекса пролиферации и связано с нарушением созревания грануляционной ткани. Толщина коллагеновых волокон в контроле на этом сроке достигает 3.9 ± 0.2 мкм.

В работе проведено описание с количественной оценкой изменений структурных элементов области заживления глубоких линейных ран кожи крыс на разных сроках репарации. Из данных литературы известно, что заживление ран зависит от выраженности воспалительной реакции [1, 2, 6, 7] и скорости новообразования сосудов [12, 13, 16]. Преобладание макрофагов над лейкоцитами в клеточном инфильтрате области кожных ран уже на 3-и сут процесса заживления у опытных животных подтверждает более ранний переход в фазу пролиферации и лимитированность воспалительной реакции в эксудатив-

ной фазе по сравнению с контролем. 3-и сут в опыте характеризуются развитой грануляционной тканью, содержащей не только большое количество кровеносных сосудов, но и синтетически активные формы фибробластов, деятельность которых позволила создать в аморфном веществе на этом сроке заживления концентрацию гликопротеинов и гликозаминогликанов, необходимую для соединения коллагена в коллагеновые волокна толщиной до 2.8 ± 0.3 мкм. Известно, что толщина волокон коллагена III типа меньше волокон коллагена I типа [10]. Результаты нашего эксперимента указывают на уменьшение толщины коллагеновых волокон при увеличении синтеза коллагена I типа в опыте на 11-е сут (4.6 ± 0.2 мкм) по сравнению с опытом на 7-е сут (5.2 ± 0.3 мкм). Мы полагаем, что в данном случае лизис коллагена III типа преобладает над синтезом коллагена I типа, что отражается в преобладании зрелых, а значит и более толстых коллагеновых волокон III типа над пока еще не зрелыми, и, как следствие, временно более тонкими коллагеновыми волокнами I типа. При этом на 11-е сут в контроле происходит утолщение коллагеновых волокон по сравнению с 7-ми сут той же группы животных, что обусловлено замедленной деградацией коллагена III типа из-за меньшей активности макрофагов в контроле по сравнению с опытом. Следствием этого является замедление процесса реорганизации образующейся рубцовой ткани, что подтверждает незавершенность процесса репаративной регенерации в контроле на 11-е сут эксперимента, и в конечном итоге может служить основой для формирования гипертрофической формы рубца. Тогда как раннее начало коллагенолиза коллагена III типа в опытной группе животных уже на 7-е сут эксперимента предотвращает склерозирование избыточно образованной и не редуцированной соединительной ткани, что способствует органотипичности вновь образующегося дермального компонента регенерата и формированию нормотрофического рубца. Полученные данные находятся в соответствии с данными литературы о реорганизации соединительной ткани при репаративных процессах [2, 4, 7, 8, 10, 11, 15].

Заключение

Таким образом, метаболиты *Bacillus subtilis* 804, воздействуя на клеточные факторы репаративного процесса, ограничивают выраженность воспаления, способствуя более ранней миграции макрофагов в зону повреждения, что, в свою очередь, приводит к ускоренному очищению раневого дефекта, стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток, миграцию в рану фибробластов и кератиноцитов, стимулируя образование органотипически полноценного эпидермиса уже

на 7-е сут, а дермального компонента на 11-е сут после альтерации. При этом лимитированное по времени и выраженности воспаление в области раневого дефекта приводит к ограничению склероза при ремоделировании формирующегося рубца, способствуя его нормотрофичности.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

1. Алексеева Н.Т., Клочкова С.В., Никитюк Д.Б., Глухов А.А. Регенерация кожи: актуальные методы воздействия. Воронеж: Научная книга; 2015. 300 [Alexseeva NT, Klochkova SV, Nikityuk DB, Glukhov AA. Regeneratsiya kozhi: aktual'nye metody vozdeystviya. Voronezh: Nauchnaya kniga; 2015. 300] (in Russian).
2. Аничков Н.Н., Волков К.Г. Морфология заживления ран. М.: Медгиз; 1951. 123 [Anichkov NN, Volkov KG. Morfologiya zazhivleniya ran. Moscow: Medgiz; 1951.123] (in Russian).
3. Гончарова В.П. Факторы роста фибробластов. Физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 1994; 80(9):163 [Goncharova VP. Faktory rosta fibroblastov. Fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova. 1994; 80(9):163] (in Russian).
4. Калмыкова Н.В., Андреев-Андреевский А.А., Демьяненко И.А., Манских В.Н., Лагерев А.Е., Попова А.С., и др. Стимулирующий эффект различных форм коллагеновых раневых покрытий на процесс эпителизации ран кожи. Биомедицина. 2017; 4:85–96 [Kalmykova NV, Andreev-Andrievskiy AA, Dem'yanenko IA, Manskih VN, Lagereva EA, Popova AS, et al. The stimulating effect of various forms of collagenic wound coverings on the epithelization process of skin wounds. Biomedicine. 2017; 4:85–96] (in Russian).
5. Никитенко В.И. Патент РФ № 2427644; 2010 [Nikitenko VI. Patent RU № 2427644; 2010].
6. Олышницкая О.В., Масьчева В.И., Кравченко И.В., Нургожин Т.С., Русак Ю.Э., Гуляев А.Е. Использование субстанции фактора некроза опухоли-альфа с целью коррекции процессов заживления ран (обзор литературы). Вестник новых медицинских технологий. 2014; 21(3):180–4
7. Шехтер А.Б., Берченко Г.И. Грануляционная ткань: воспаление и регенерация. Архив патологии. 1978; XL(8):20–8 [Shekhter AB, Berchenko GI. Granulyatsionnaya tkan': vospalenie i regeneratsiya. Arkhiv patologii. 1978; XL(8):20–8] (in Russian).
8. Akita S, Akino K, Hirano A. Basic Fibroblast Growth Factor in Scarless Wound Healing. Advances in Wound Care. 2013 Mar;2(2):44–9. doi: 10.1089/wound.2011.0324
9. Akita S, Akino K, Imaizumi T, Hirano A. Basic fibroblast growth factor accelerates and improves second-degree burn wound healing. Wound Repair and Regeneration. 2008 Sep;16(5):635–41. doi: 10.1111/j.1524-475x.2008.00414.x
10. 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. African J Biotechnol. 2011; 10 (13): 2524–9.
11. Goertz O, von der Lohe L, Lauer H, Khosrawipour T, Ring A, Daigeler A, et al. Repetitive extracorporeal shock wave applications are superior in inducing angiogenesis after full thickness burn compared to single application. Burns. 2014 Nov;40(7):1365–74. doi: 10.1016/j.burns.2014.01.019
12. Guo S, DiPietro LA. Factors Affecting Wound Healing. Journal of Dental Research. 2010 Feb 5;89(3):219–29. doi: 10.1177/0022034509359125
13. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. Pharmacological Reviews. 2004 Dec 1;56(4):549–80. doi: 10.1124/pr.56.4.3
14. Kobayashi F, Matsuzaka K, Inoue T. The effect of basic fibroblast growth factor on regeneration in a surgical wound model of rat submandibular glands. International Journal of Oral Science. 2015 Nov 20;8(1):16–23. doi: 10.1038/ijos.2015.36
15. Leirós GJ, Kusinsky AG, Drago H, Bossi S, Sturla F, Castellanos ML, et al. Dermal Papilla Cells Improve the Wound Healing Process and Generate Hair Bud-Like Structures in Grafted Skin Substitutes Using Hair Follicle Stem Cells. STEM CELLS Translational Medicine. 2014 Aug 26;3(10):1209–19. doi: 10.5966/sctm.2013-0217
16. Lyons SM, Fay MM, Akiyama Y, Anderson PJ, Ivanov P. RNA biology of angiogenin: Current state and perspectives. RNA Biology. 2016 Dec 23;14(2):171–8. doi: 10.1080/15476286.2016.1272746
17. Pastushenko I, Vermeulen PB, Van den Eynden GG, Rutten A, Carapeto FJ, Dirix LY, et al. Mechanisms of tumour vascularization in cutaneous malignant melanoma: clinical implications. British Journal of Dermatology. 2014 Jul 26;171(2):220–33. doi: 10.1111/bjd.12973
18. Pavlov N, Frendo J-L, Guibourdenche J, Degrelle SA, Evain-Brion D, Badet J. Angiogenin Expression during Early Human Placental Development; Association with Blood Vessel Formation. BioMed Research International. 2014; 2014:1–17. doi: 10.1155/2014/781632
19. Staton CA, Valluru M, Hoh L, Reed MWR, Brown NJ. Angiopoietin-1, angiopoietin-2 and Tie-2 receptor expression in human dermal wound repair and scarring. British Journal of Dermatology. 2010 Jul 13;163(5):920–7. doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.09940.x
20. Zhang X, Kang X, Ji L, Bai J, Liu W, Wang Z. Stimulation of wound healing using bioinspired hydrogels with basic fibroblast growth factor (bFGF). International Journal of Nanomedicine. 2018 Jul;13:3897–906. doi: 10.2147/ijn.s168998

Поступила в редакцию 11.02.2019

Принята в печать 6.05.2019

Received 11.02.2019

Accepted 6.05.2019

Для цитирования: Миханов В.А., Полякова В.С., Абземелева Р.А., Шурыгина Е.И., Курамысов А.В. Регенерация глубоких линейных ран кожи крыс при местном воздействии метаболитами культуры *Bacillus subtilis* 804. Журнал анатомии и гистопатологии. 2019; 8(2): 55–59. doi: 10.18499/2225-7357-2019-8-2-55-59

For citation: Mikhanov V.A., Polyakova V.S., Abzemeleva R.A., Shurygina E.I., Kuramysov A.V. Regeneration of deep linear wounds of rats' skin by local exposure to metabolites of a *Bacillus subtilis* 804 culture. Journal of Anatomy and Histopathology. 2019; 8(2): 55–59. doi: 10.18499/2225-7357-2019-8-2-55-59