

УДК 616-001.41:616-003.93

© В.А. Миханов, В.С. Полякова, Р.А. Абземелева, Е.И. Шурыгина, 2013

В.А. Миханов, В.С. Полякова, Р.А. Абземелева, Е.И. Шурыгина
**ЗАЖИВЛЕНИЕ ГЛУБОКИХ СКАЛЬПИРОВАННЫХ РАН КОЖИ
ПОД ДЕЙСТВИЕМ МЕТАБОЛИТОВ КУЛЬТУРЫ BACILLUS SUBTILLIS 804**
*ГБОУ ВПО «Оренбургская государственная медицинская академия»
Минздрава России, г. Оренбург*

Изучены структурно-функциональные аспекты биостимулирующего влияния метаболитов культуры *Bacillus subtilis* 804 на процессы репаративного гистогенеза при заживлении глубоких скальпированных ран кожи. Показано, что применение метаболитов культуры *Bacillus subtilis* 804 в виде однократного послеоперационного орошения раны обеспечило оптимизацию функций клеток – эффекторов репаративного процесса, что послужило основой для становления адекватных эпидермально-соединительнотканых отношений и способствовало ускоренному заживлению ран с формированием функционально и косметически более качественного рубца.

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

V.A. Mikhanov, V.S. Polyakova, R.A. Abzemeleva, E.I. Shurygina
**DEEP DISSECTED SKIN WOUNDS HEALING
UNDER THE ACTION OF BACILLUS SUBTILLIS 804 METABOLITES**

The work studies the structural and functional aspects of biostimulating influence of *Bacillus subtilis* 804 metabolites on reparative histogenesis in the healing of deep dissected skin wounds. The use of *Bacillus subtilis* 804 metabolites in a single post-operative wound irrigation is shown to ensure optimization of functions of repair process cells - effectors that was the basis for the development of adequate relations between epidermis and connective tissue and helped to accelerate the healing of wounds with formation of a functionally and cosmetically better scar.

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

Изучение проблем репаративной регенерации является одной из фундаментальных задач биологии и медицины [1,3]. При регенерации поврежденных тканей ведущую роль играет группа пептидов, относящихся к фактору роста фибробластов (ФРФ) [2,4,5,6,8]. Биотехнологическими методами ростовые факторы могут быть получены в количествах, достаточных для их применения с лечебной целью, и ведутся попытки создания рецептур, включающих в свой состав ростовые факторы. Однако современные методы получения ростовых факторов характеризуются трудоемкостью и дороговизной [7]. В 2009 году в эксперименте сотрудниками кафедры травматологии и ортопедии ОрГМА под руководством профессора В.И. Никитенко были получены продукты жизнедеятельности бактерий штамма *Bacillus subtilis* 804, стимулирующие рост фибробластов (ФБ) человека в культуре. На основе данных метаболитов в 2011 году В.И. Никитенко разработал и зарегистрировал препарат “Винфар” (свидетельство на товарный знак № 433087 от 23.03.2011), выпускаемый в настоящее время ООО “Бакорен”.

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

Материал 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), «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (1986), «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минвуза СССР от 13.11.1984 г. № 724). После удаления волосяного покрова на спине животных в стерильных условиях под ингаляционным наркозом были выполнены скальпированные раны площадью $2,25 \text{ см}^2$, глубиной до гиподермы. Животные были разделены на 2 группы по 20 крыс: 1-я – опытная, в которой зону раневого дефекта кожи однократно орошали 1,0 мл препарата «Винфар» в дозе метаболитов культуры *Bacillus subtilis* 804, равной $0,015 \text{ мкг/кг}$ веса крысы; 2-я – контрольная, животным которой на рану наносили 1,0 мл физиологического раствора. Животных выводили из опыта на 3-и, 7 и 11-е сутки после нанесения раны кожи. Забой и взятие материала осуществлялись согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных». У опытных и контроль-

ных 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-парафин по общепринятой методике. Гистосрезы толщиной 5-6 мкм после депарафинизации исследовали при помощи световой микроскопии с применением гистологического (окраска гематоксилином и эозином и по Майеру), гистохимического (окраска по Маллори, толуидиновым синим), иммуногистохимического (выявление экспрессии белка Ki-67, коллагена I – III типов) методов исследования и морфометрии. С помощью программы оптического анализа ImageJ 1.46h по цифровым микрофотографиям проводили морфометрическую оценку эпидермиса и дермы (подсчёт объемной 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 микроскопа (на микрофотографии). В ходе иммуногистохимического исследования использовали моноклональные антитела и систему визуализации фирмы BioGenex, США. При проведении статистической обработки результатов вычисляли средние значения абсолютных и относительных величин (M), ошибки средних величин (m) и критерий Стьюдента. Различия считали достоверно значимыми при уровне вероятности $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Область раневого дефекта кожи крыс в контрольной группе на 3-и сутки характеризуется интенсивной воспалительной реакцией в фазе экссудации: на фоне массивной нейтрофильной инфильтрации (полиморфно-ядерные лейкоциты (ПЯЛ) достигают $19,4 \pm 1,3\%$ от всех тканевых компонентов) и интерстициального отека (что отражается в увеличении объемной плотности аморфного вещества до $36,5 \pm 1,3\%$) обнаруживается небольшое количество макрофагов (МФ) (табл.1).

Таблица 1

Соотношение объемной плотности тканевых структур соединительной ткани в области раневого дефекта кожи крыс опытной и контрольной групп на 3-и сутки репаративного процесса

Компоненты ткани	Срок репарации – 3-и сутки					
	контроль			опыт		
Аморфное вещество, %	$36,5 \pm 1,3^{**}$			$17,9 \pm 1,5^{**}$		
Клетки (ФБ, ПЯЛ, МФ, тучные клетки и лимфоциты), %	$36,2 \pm 1,4^*$			$25,6 \pm 1,4^*$		
	ФБ	ПЯЛ	МФ	ФБ	ПЯЛ	МФ
	$7,4 \pm 1,2^{**}$	$19,4 \pm 1,3^{***}$	$2,4 \pm 0,1^{**}$	$13,2 \pm 1,5^{**}$	$3,2 \pm 0,2^{***}$	$7,3 \pm 0,8^{**}$
Волокнистые структуры, %	$23,8 \pm 1,5^{**}$			$37,7 \pm 1,4^{**}$		
Сосуды, %	$3,5 \pm 0,3^{***}$			$18,8 \pm 1,3^{***}$		

* Уровень вероятности достоверной разницы между опытом и контролем данного срока $p < 0,05$.

** Уровень вероятности достоверной разницы между опытом и контролем данного срока $p < 0,01$.

*** Уровень вероятности достоверной разницы между опытом и контролем данного срока $p < 0,001$.

Активно продолжается лейкодиapedез. Эпителизация в большинстве случаев отсутствует или нарастающий эпителий не покрывает полностью раневой дефект кожи (рис.1).

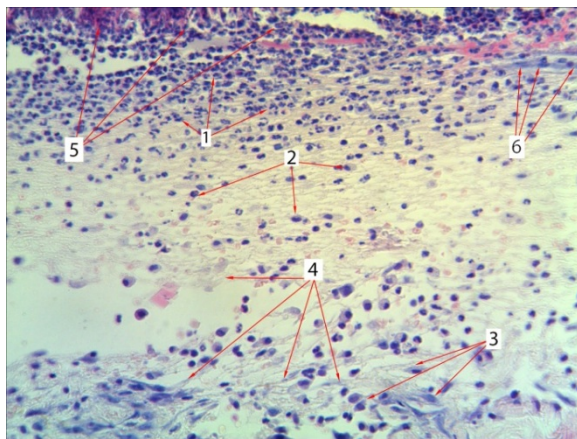


Рис.1. Контрольная группа, 3-и сутки: 1-ПЯЛ; 2-МФ; 3-ФБ; 4-КВ; 5-струп (детрит); 6-эпителий. Окраска гематоксилином и эозином и по Майеру. Общ. ув. $\times 300$

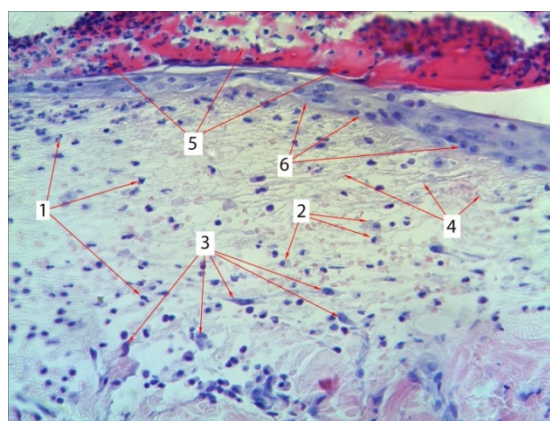


Рис.2. Опытная группа, 3-и сутки: 1-ПЯЛ; 2-МФ; 3-ФБ; 4-КВ; 5-струп (детрит); 6-эпителий. Окраска гематоксилином и эозином и по Майеру. Общ. ув. $\times 300$

Регенерирующая ткань раневого дефекта на 3-и сутки уже очищена от детрита, который представлен струпом на поверхности раны, по этой причине он не учитывался нами при проведении подсчета объемной плотно-

сти тканевых структур соединительной ткани в области раны.

На 3-и сутки в опытной группе определяется эпителизация раны под струпом, эпителиальный пласт в 2-3 слоя (рис. 2). ИП базальных кератиноцитов составляет $68,2 \pm 0,6\%$. Воспалительная реакция незначительная, с преобладанием отека компонента над инфильтративным (ПЯЛ составляют $3,2 \pm 0,2\%$). Соотношение МФ и нейтрофилов увеличивается по сравнению с контролем и составляет 2,3:1 соответственно. Большее значение макрофагально-нейтрофильного индекса в опытной группе свидетельствует об изначально меньшей выраженности воспалительного процесса, более быстром очищении раны и переходе на следующие этапы заживления. Так, уже на 3-и сутки в опыте инициируется процесс образования грануляционной ткани

(ГТ), фибробластический дифферон гетерогенен: наряду с юными ФБ отмечаются функционально активные формы. Благодаря синтетической деятельности ФБ состав межклеточного вещества уже характеризуется концентрацией и соотношением гликозаминогликанов (ГАГ) и гликопротеинов (ГП), необходимыми для инициации процесса агрегации молекул коллагена в фибриллы, что подтверждается формированием тонких коллагеновых волокон толщиной до $2,3 \pm 0,3$ мкм.

Развитие ГТ и полное закрытие раневого дефекта эпителием наблюдаются в контрольной группе на 7-е сутки. Однако наличие в ткани воспаления, недостаточная макрофагальная реакция задерживают эпителизацию (ИП $66,4 \pm 0,5\%$), а также пролиферацию и дифференцировку ФБ (табл. 2).

Таблица 2

Соотношение объемной плотности тканевых структур соединительной ткани в области раневого дефекта кожи крыс опытной и контрольной групп на 7 и 11-е сутки репаративного процесса

Компоненты ткани	Срок репарации 7-е сутки						11-е сутки					
	контроль			опыт			контроль			опыт		
Аморфное вещество, %	$19,8 \pm 1,5^*$			$12,3 \pm 0,3^*$			$13,1 \pm 0,3^{**}$			$6,2 \pm 0,6^{**}$		
Клетки (ФБ, ПЯЛ, МФ, тучные клетки и лимфоциты), %	$23,6 \pm 1,5$			$25,6 \pm 0,6$			$30,5 \pm 1,3^{**}$			$16,5 \pm 0,8^{**}$		
	ФБ	ПЯЛ	МФ	ФБ	ПЯЛ	МФ	ФБ	ПЯЛ	МФ	ФБ	ПЯЛ	МФ
	$10,3 \pm 1,2^*$	$4,4 \pm 1,3^{***}$	$5,1 \pm 0,1^{**}$	$14,6 \pm 1,5^*$	$0,8 \pm 0,2^{***}$	$8,9 \pm 0,8^{**}$	$14,9 \pm 1,2^{**}$	$2,1 \pm 0,3^{***}$	$8,1 \pm 0,7^{**}$	$8,2 \pm 1,5^{**}$	$0,2 \pm 0,1^{***}$	$4,9 \pm 0,4^{**}$
Волокнистые структуры, %	$26,2 \pm 1,3^{**}$			$39,8 \pm 1,7^{**}$			$42,1 \pm 1,9^{**}$			$69,7 \pm 2,6^{**}$		
Сосуды, %	$30,4 \pm 1,3^*$			$22,3 \pm 1,3^*$			$14,3 \pm 0,7^{**}$			$7,6 \pm 0,4^{**}$		

* Уровень вероятности достоверной разницы между опытом и контролем данного срока $p < 0,05$. ** Уровень вероятности достоверной разницы между опытом и контролем данного срока $p < 0,01$. *** Уровень вероятности достоверной разницы между опытом и контролем данного срока $p < 0,001$.

Тонкие КВ ($2,8 \pm 0,2$ мкм) в группе контроля на 7-е сутки представлены коллагеном III типа (рис. 3).

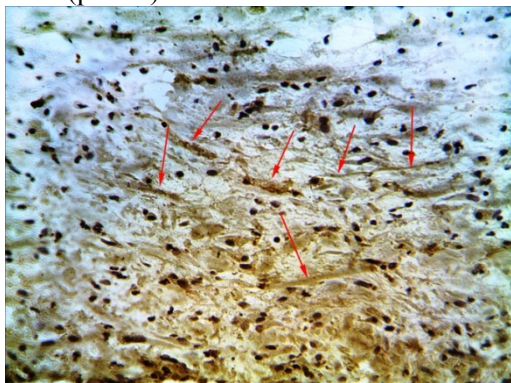


Рис.3. Контрольная группа, 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция на коллаген III типа (коллаген III – коричневого цвета, указан стрелками). Ув. $\times 300$

7-е сутки в опытной группе характеризуются продолжением процесса интеграции коллагеновых фибрилл, что подтверждается достоверным ($p < 0,01$ в сравнении с контролем) увеличением толщины КВ до $3,9 \pm 0,3$ мкм. Примечательно, что в опыте на 7-е сутки уже инициируется процесс реорганизации ГТ, выражающийся в запустевании и редукции

сосудов, постепенной деградации коллагена III типа и появлении зрелого коллагена I типа (рис. 4).

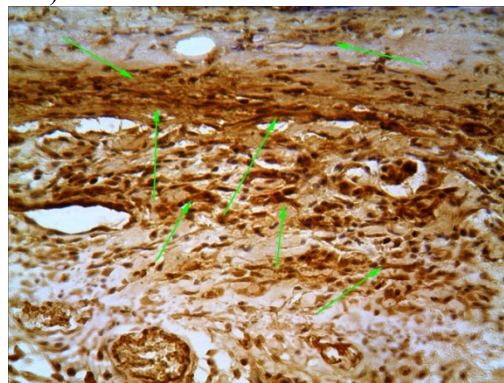


Рис.4. Опытная группа, 7-е сутки. Иммуногистохимическая реакция на коллаген III типа (коллаген III – коричневого цвета, указан стрелками). Ув. $\times 300$

В результате значительного увеличения пролиферативной активности эпителиоцитов (ИП $96,8 \pm 0,9\%$), формируется до 6-7 слоев эпителия, что соответствует нормальной толщине эпидермиса кожи крысы (рис. 5).

В опытной группе на 11-е сутки в связи с завершением формирования эпителиального пласта, дифференцирующегося на все функ-

циональные слои, ИП снижается до $64,6 \pm 0,4\%$. Собственно дерма представлена плотной волокнистой неоформленной соединительной тканью, матрикс которой содержит КВ коллагена I типа, преимущественно ориентированные вдоль ФБ и базальной мембраны в соответствии с функциональной нагрузкой на ткань. Вероятно, в связи с преобладанием коллагенолиза коллагена III типа над синтезом коллагена I типа наблюдается уменьшение средней толщины КВ (до $2,4 \pm 0,2$ мкм), т.е. активность синтеза коллагена I типа и сборки КВ уступают деградации зрелых КВ, состоящих из коллагена III типа.

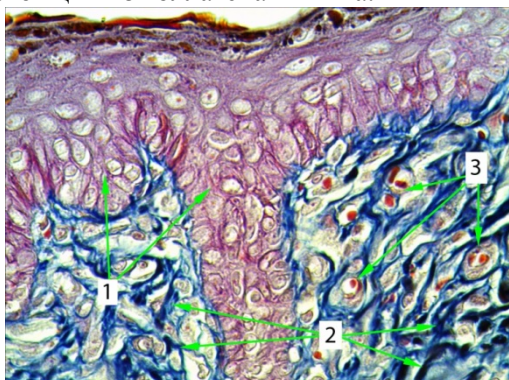


Рис.5. Опытная группа, 7-е сутки. 1-эпителий (пласт), 2-КВ: 3-кровеносные сосуды (капилляры). Гистохимическая окраска по Маллори. Ув. $\times 600$

Морфологическая картина в контроле на 11-е сутки схожа с таковой в опыте на 7-е сутки, хотя и здесь можно отметить ряд отличий. Во-первых, меньшее значение ИП базальных кератиноцитов ($91,6 \pm 0,8\%$ в контроле

на 11-е сутки и $96,8 \pm 0,9\%$ в опыте на 7-е), что определяет 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), обусловленная менее выраженной реакцией МФ и, таким образом, замедлением процессов коллагенолиза уже зрелых КВ коллагена III типа.

Выводы

1. Применение препарата «Винфар» лимитирует выраженность воспалительного процесса (вероятно, в связи с наличием антимикробных веществ в составе метаболитов *Bacillus subtilis* 804), что определяет раннюю миграцию МФ в зону повреждения и ускоренное очищение раневого дефекта.

2. Входящий в состав препарата ФРФ стимулирует миграцию в рану ФБ, 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 ГТ с заменой беспорядочно ориентированных КВ, содержащих коллаген III типа, на функционально ориентированные пучки КВ с коллагеном I типа.

3. При местном применении «Винфар» стимулирует пролиферацию эпителиоцитов, способствуя ускоренному темпу формирования функционально и морфологически полноценного эпидермального пласта уже на 7-е сутки после альтерации.

Сведения об авторах статьи:

Миханов Василий Александрович – к.м.н., ассистент кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО ОрГМА Минздрава России. Адрес: 460000, г. Оренбург, Советская, 6. E-mail: vmikhanov@gmail.com.

Полякова Валентина Сергеевна – д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологической анатомии ГБОУ ВПО ОрГМА Минздрава России. Адрес: 460000, г. Оренбург, Советская, 6. E-mail: profpolyakova@yandex.ru.

Абземелева Регина Асрамовна – врач ординатор ГБУЗ Бюро СМЭ Оренбургской области. Адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Кирова, 40. Тел. 8(3532)77-08-31, e-mail info@orensme.ru.

Шурыгина Елена Ивановна – студентка лечебного факультета ГБОУ ВПО ОрГМА Минздрава России. Адрес: 460000, г. Оренбург, Советская, 6. E-mail shuryginalena@mail.ru.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аничков Н.Н., Волков К.Г. Морфология заживления ран. – М.: Медгиз, 1951. – 123 с.
2. Гончарова, В.П. Факторы роста фибробластов / В.П. Гончарова // Физиологический журнал им. Сеченова. – 1994. – Т.80. – Вып. 9. – С. 163.
3. Шехтер, А.Б. Грануляционная ткань: воспаление и регенерация / А.Б. Шехтер, Г.И.Берченко // Архив патологии. – 1978. – Т.XL. – Вып.8. – С.20-28.
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. Bendfeldt K., Radojevic V., Kapfhammer J. Basic fibroblast growth factor modulates density of blood vessels and preserves tight junctions in organotypic cortical cultures of mice: a new in vitro model of the blood-brain barrier // J. Neurosci. 2007. Vol. 27. № 12. P. 3260-3267.
6. Böttcher R.T., Niehrs C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development // Endocr. Rev. 2005. Vol. 26. № 1. P. 63-77.
7. Ornitz D.M. Fibroblast growth factors // Genon Biology. 2001. № 2. P.3005.1-3005.12.
8. Yao C., Yao P., Wu H., Zha Z. Acceleration of wound healing in traumatic ulcers by absorbable collagen sponge containing recombinant basic fibroblast growth factor // Biomed. Mater. 2006. Vol.1. № 1.P. 33-37.