

# МОДЕЛЬ ИШЕМИЗИРОВАННОЙ ДЛИТЕЛЬНО НЕЗАЖИВАЮЩЕЙ РАНЫ: РЕГЕНЕРАЦИЯ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЖИВОГО ЭКВИВАЛЕНТА КОЖИ

DOI: 10.17691/stm2023.15.5.01  
УДК 616.5–001–089.843–003.93  
Поступила 14.06.2023 г.



**Е.И. Моргун**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной биологии;  
**К.К. Сухинич**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории проблем регенерации;  
**О.С. Роговая**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной биологии;  
**Е.А. Воротеяк**, д.б.н., член-корреспондент РАН, зав. лабораторией клеточной биологии

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334

**Цель исследования** — оценить возможность использования разработанной нами модели ишемизированной длительно незаживающей раны для доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) при трансплантации тканеинженерной конструкции.

**Задачи исследования:** проведение эксперимента по трансплантации тканеинженерной конструкции «живой эквивалент кожи» (ЖЭК) и подбор методов для определения эффективности лечения ишемизированных длительно незаживающих ран во время доклинических исследований на предложенной модели.

**Материалы и методы.** В исследовании использовано 56 мышей BALB/c, которых разделили на группы «контроль» (n=19), «носитель» (n=19) и «ЖЭК» (n=18).

В ходе эксперимента сравнивали динамику регенерации ишемизированных длительно незаживающих ран после трансплантации ЖЭК; коллаген-гиалуроновой пленки, использованной в качестве носителя клеток; и раны без лечения методами гистологии, иммуногистохимии и растровой сканирующей оптоакустической мезоскопии (PCOM).

**Результаты.** Методы гистологии и иммуногистохимии позволили оценить эффективность лечения ишемизированных длительно незаживающих ран во время доклинических исследований. Изучено влияние трансплантации ЖЭК на инфильтрацию раневого ложа воспалительными клетками, на формирование ткани в зоне раневого ложа, на состояние ткани по краям раны, а также на ангиогенез. В работе предложен новый показатель — коэффициент сглаживания (отношение толщины зоны ремоделирования ткани к толщине дермы краев раны), который дает возможность оценить степень заполненности раневого ложа развивающейся тканью. Высокое его значение в группе ЖЭК свидетельствует о том, что трансплантация БМКП влияет на образование грануляционной ткани. Это препятствует механическому напряжению в ране и, как следствие, предотвращает формирование косметического дефекта.

Изучение регенерационных процессов показало, что предложенная нами модель ишемизированной длительно незаживающей раны является пригодной для доклинических исследований БМКП.

**Ключевые слова:** регенерация кожи; ишемизированная длительно незаживающая рана; биомедицинский клеточный продукт; доклинические исследования кожного эквивалента; живой эквивалент кожи.

**Как цитировать:** Morgun E.I., Sukhinich K.K., Rogovaya O.S., Vorotelyak E.A. The model of an ischemic non-healing wound: regeneration after transplantation of a living skin equivalent. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2023; 15(5): 5, <https://doi.org/10.17691/stm2023.15.5.01>

**Для контактов:** Моргун Елена Игоревна, e-mail: lady.morgun2016@yandex.ru

## The Model of an Ischemic Non-Healing Wound: Regeneration after Transplantation of a Living Skin Equivalent

**E.I. Morgun**, PhD, Researcher, Laboratory of Cellular Biology;  
**K.K. Sukhinich**, PhD, Researcher, Laboratory of Regeneration Problems;  
**O.S. Rogovaya**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Cellular Biology;  
**E.A. Vorotelyak**, DSc, Correspondent Member of Russian Academy of Sciences,  
Head of the Laboratory of Cell Biology

Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, 26 Vavilov St.,  
Moscow, 119334, Russia

**The aim** was to evaluate the possibility of using our ischemic non-healing wound model for preclinical studies of biomedical cell products (BCP) during transplantation of a tissue-engineered construct.

**The tasks of the study** were to conduct the experiment on the transplantation of the tissue-engineered construct “living skin equivalent” (LSE) and select methods for determining the effectiveness of treating ischemic non-healing wounds during preclinical studies on the proposed model.

**Materials and Methods.** The study was performed on 56 BALB/c mice divided into the following groups: “control” (n=19), “scaffold” (n=19), and “LSE” (n=18).

During the experiment, the histological, immunohistochemical methods and raster scanning optoacoustic mesoscopy (RSOM) technique were employed to compare the dynamics of regeneration of ischemic non-healing wound using LSE transplantation, collagen-hyaluronic film as a cell scaffold, and a non-treated wound.

**Results.** Histology and immunohistochemistry have been found to be suitable to assess the effectiveness of treating ischemic non-healing wounds during preclinical investigations. The effect of LSE transplantation on infiltration of the wound bed with inflammatory cells, the formation of tissue in the wound bed zone, tissue condition at the wound margins, and angiogenesis has been studied. In addition, a new smoothing coefficient, i.e. the ratio of the thickness of the tissue-remodeling zone to the thickness of the dermis of the wound margins, has been proposed in the study. This coefficient makes it possible to assess the degree of filling the wound bed with the developing tissue. Its high value in the LSE group means that BCP transplantation influences the granulation tissue growth, prevents mechanical stress in the wound preventing thereby cosmetic defects.

Exploration of the regenerative processes has shown that the proposed model of the ischemic non-healing wound is suitable for preclinical studies of BCP.

**Key words:** skin regeneration; ischemic non-healing wound; biomedical cell product; preclinical study of the skin equivalent; living skin equivalent.

### Введение

В норме процесс регенерации кожного повреждения завершается полным восстановлением структуры и функций кожи, однако в случае присоединения инфекции, гипоксии или иммунной дисфункции рана может приобрести статус длительно незаживающей [1]. Такие раны характеризуются избыточным воспалением, повышенным уровнем протеолитической активности и уменьшением отложения матрикса [2]. Стадии регенерации длительно незаживающей раны соответствуют ранозаживлению в норме, однако со значительной задержкой в фазе воспаления [3]. К факторам, вызывающим хронизацию раны, относят диабет, сосудистую недостаточность, истощение, пожилой возраст, местную инфекцию, а также некроз вследствие сдавливания [3, 4]. В зависимости от генеза заболевания выделяют такие типы длительно незаживающих ран, как пролежни, диабетические язвы и ишемизированные длительно незаживающие

раны. Последние трудно поддаются консервативной терапии.

Одним из перспективных направлений в лечении длительно незаживающих ран является трансплантация биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) типа кожных эквивалентов. Такое лечение способствует эффективному ремоделированию грануляционной ткани и устранению косметического дефекта — одного из последствий хронизации ран [5]. Разработка модели ишемизированной длительно незаживающей раны, адекватной человеческой патологии, — неотъемлемая часть исследований, направленных на создание БМКП. Особенности строения, отличающие кожу лабораторных животных от кожи человека, вызывают сложности в создании схожих моделей ишемизированных длительно незаживающих ран [6]. Для приближения процесса регенерации в модели животного к человеческой патологии исследователи нередко используют синтетические конструкции и материалы, что, однако, снижает адекватность моделей.

Например, наличие швов в непосредственной близости к ране вызывает значительный фон при проведении работ, поэтому возникают трудности с интерпретацией результатов. Все это является одной из причин наличия широкого разнообразия моделей ишемизированных длительно незаживающих ран на лабораторных животных [7]. На данный момент в России запатентовано несколько моделей длительно незаживающих ран, однако модели, которая бы полностью подходила для проведения доклинических исследований БМКП, нет.

**Цель исследования** — оценить возможность использования разработанной в нашей лаборатории модели ишемизированной длительно незаживающей раны для доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов при трансплантации тканеинженерной конструкции.

**Задачи исследования:** проведение эксперимента по трансплантации тканеинженерной конструкции «живой эквивалент кожи» (ЖЭК), представляющей собой эпидермально-мезенхимный пласт на носителе; подбор методов для определения эффективности лечения ишемизированных длительно незаживающих ран во время доклинических исследований на предложенной модели.

## Материалы и методы

**Клеточные культуры.** Для приготовления ЖЭК использовали клеточные культуры кератиноцитов и мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из УНУ «Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общепромышленного и биомедицинского направления)» Института биологии развития им. Н.К. Кольцова. Кератиноциты культивировали на среде DMEM/F-12 («ПанЭко», Россия) в соотношении 1:1 с 10% фетальной бычьей сывороткой (ФБС) (HyClone, США), 5 мкг/мл инсулина (Sigma-Aldrich, США), 10-6М изопротеренола (Sigma-Aldrich), 5 мкг/мл трансферрина (Sigma-Aldrich), 10 нг/мл EGF (Sigma-Aldrich) и 1% пенициллина–стрептомицина (Gibco, США). МСК культивировали на среде DMEM («ПанЭко»), содержащей 10% ФБС (HyClone), 1% глутамин (Gibco) и 1% пенициллина–стрептомицина (Gibco).

Для изготовления биологического эквивалента кожи (ЖЭК) на коллаген-гиалуроновой пленке культивировали кератиноциты и МСК мыши. Клетки на носителе были готовы к этапу переноса в рану через 2–3 сут.

**Работа с животными.** Все манипуляции с животными осуществляли под общим наркозом в соответствии с «Правилами для проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Россия, 2010) и «Международными рекомендациями (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (CIOMS и ICLAS, 2012), неукоснительно соблюдали этические принци-

пы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006). Исследование одобрено Комиссией по биоэтике Института биологии развития РАН (протоколы №23 от 15.11.2018 и №28 от 05.09.2019). Животные содержались при свободном доступе к корму и воде. В исследовании использовано 56 мышей линии BALB/c.

Для проведения исследований мыши были разделены на группы «контроль» (n=19), «носитель» (n=19) и «ЖЭК» (n=18). Перед манипуляциями животных вводили в состояние общего наркоза при помощи препарата авертин. Шерсть в области операционного поля удаляли кремом для депиляции (Veet, Канада). После депиляции на кожу мышей наносили прямоугольник 30×10 мм, по центру которого вырезали полнослойное циркулярное отверстие диаметром 5–7 мм. Затем по начерченным линиям мышам выполняли полнослойные параллельные разрезы кожи и отсекали от лоскута все крупные сосуды. Далее останавливали кровотечение с помощью нанесения на лигированные сосуды перекиси водорода. После этого на края лоскута наносили швы, промывали рану и накладывали пластырь Tegaderm™ (Германия).

Трансплантацию носителя и ЖЭК в соответствующих группах проводили путём аппликации этих материалов на раневое ложе животных. После операции накладывали пластырь Tegaderm™.

На 3–5-е сутки мышам групп «контроль», «носитель» и «ЖЭК» промывали раны при помощи стерильного 0,1% раствора гентамицина на DPBS («ПанЭко»). Животных выводили из эксперимента на 5-, 7-, 14-, 21-е сутки путем передозировки наркоза.

**Пробоподготовка биоматериала.** Биоматериал, предназначенный для гистологических исследований, фиксировали в 10% формалине (Biovitrum, Швеция). Биоматериал, предназначенный для иммуногистохимических исследований, помещали в гель OCT Cryomount (HistoLab, Швеция) и замораживали в жидком азоте.

**Гистологическое исследование.** Для гистологических исследований использовали материал, заключенный в парафиновые блоки. Гистологические срезы получали на микротоме Microm HM 430 (Thermo Fisher Scientific, США). Препараты были окрашены гематоксилином–эозином и трихромом по Маллори.

**Иммуногистохимическое окрашивание.** Криосрезы подготавливали по стандартной методике на криостате CM1900 (Leica Microsystems, Германия). Для фиксации использовали 4% параформальдегид. Блок-раствор, на котором разводили антитела, содержал 5% сыворотку животного-производителя вторичных антител. С первичными антителами препараты инкубировали на протяжении ночи. Далее на препараты наносили вторичные антитела, раствор DAPI и заключали в среду BrightMount/Plus (Abcam, Великобритания). В работе использовали первичные моноклональные антитела кролика против Krt14

(1:200; Ab197893; Abscam) и первичные моноклональные антитела крысы против CD31 (1:100; Ab56299; Abscam), а также вторичные антитела козы против крысы AlexaFluor 488 (1:600; Ab150157; Abscam) и вторичные антитела осла против кролика AlexaFluor 488 (1:500; A-21206; Invitrogen, США).

Препараты просматривали и фотографировали при помощи микроскопов моделей BZ-9000E (Keyence, Япония) и IX73 (Olympus, Япония).

**Растровая сканирующая оптоакустическая мезоскопия.** Исследование динамики процесса заживления раны выполняли с помощью мезоскопа RSOM Explorer P50 (iThera Medical, Германия).

**Морфометрия и статистический анализ.** Морфометрический анализ проводили с помощью программы ImageJ. Статистический анализ выполняли в программе Excel, а также с применением программирования R в среде R studio. Для сравнительного анализа данных использовали непараметрический тест для множественных сравнений по Краскелу–Уоллису. Сравнения между группами проводили с помощью теста Данна. Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В предварительных экспериментах нашей лаборатории разработана модель длительно незаживающей раны, которая воспроизводила условия ишемии и была адекватна человеческой патологии [8]. Однако она имела недочеты, что технически препятствовало проведению исследований, связанных с доклиническими испытаниями БМКП. Так, при формировании лоскута наблюдалось обильное кровотечение в раневое ложе, а на 7–14-й день эксперимента раны нагна-

ивались. Кроме того, разработанная модель раны не имела покрытия, которое бы предохраняло БМКП в раневом ложе. Поэтому были выполнены процедуры по оптимизации модели: купирование кровотечения из лигированных сосудов перекисью водорода, промывание раны стерильным 0,1% раствором гентамицина на DPBS во время операции и во время послеоперационного ухода, а также наложение пластыря Tegaderm™ (см. таблицу).

С целью оценки приемлемости предложенной модели для испытаний БМКП был проведен эксперимент, включающий трансплантацию тканеинженерной конструкции ЖЭК или трансплантацию носителя, выдержанного в таких же условиях, что и ЖЭК. Мышам группы «контроль» трансплантацию не выполняли. Раны мышей всех групп закрывали пластырем Tegaderm™.

В качестве методов, позволяющих оценить эффективность лечения ишемизированных длительно незаживающих ран во время доклинических исследований на предложенной модели и сравнить состояние ран, были выбраны гистологический, иммуногистохимический, а также метод растровой сканирующей оптоакустической мезоскопии (PCOM).

### Характеристика раневого процесса методами гистологии и иммуногистохимии

Гистологический анализ показал, что фаза воспаления в вышеописанной модели длится до 5 сут с момента нанесения раны. На этой стадии раневое ложе мышей всех групп характеризовалось инфильтрацией воспалительными клетками. Далее следовала фаза пролиферации — 7–14-е сутки ранозаживления. Во время этой стадии отмечено постепенное

### Негативные факторы для проведения доклинических испытаний биомедицинских клеточных продуктов, возникающие при моделировании ишемизированной длительно незаживающей раны, и способы их решения в предложенной модели

Негативные факторы	Способы решения
Активное кровотечение в ране	Обработка лигированных сосудов перекисью водорода с последующим вымыванием этого раствора 0,1% раствором гентамицина на DPBS
Наличие вспомогательных конструкций (швов, колец) по краям раны, что позволяет моделировать заживление раны не через контракцию (стягивание), а через рубцевание и эпителизацию	Кольца и швы по краям раны отсутствуют; контракции препятствуют швы, расположенные по краям ишемизированного лоскута на расстоянии от раны
Нагноение раны; использование цитотоксичных антисептических растворов	Использование 0,1% раствора гентамицина на DPBS препятствует нагноению раны, но при этом не приводит к гибели клеток в составе биомедицинских клеточных продуктов
Локализация раны, усложняющая проведение эксперимента ввиду самоповреждения животного или труднодоступности для экспериментатора	Нанесение раны в межлопаточную область, труднодоступную для животного, но при этом удобную для проведения экспериментальной работы
Отсутствие раневого покрытия или использование непрочной, а также непрозрачной повязки затрудняет динамическое наблюдение за состоянием раны	Использование пластыря Tegaderm™ (который является прозрачным и удобным в использовании) позволяет проводить наблюдение за состоянием раны

формирование грануляционной ткани в раневом ложе. На 21-е сутки наступала фаза реэпителизации и ремоделирования рубца. Большинство ран животных всех групп характеризовалось зрелым рубцом и наличием сформированного эпителия. Проведенный гистологический анализ позволил подробно охарактеризовать и сравнить состояние ран животных всех групп согласно стадиям ранозаживления. В качестве критериев оценки эффективности лечения раны при помощи БМКП предложены следующие параметры: васкуляризация раневого ложа, инфильтрация воспалительными клетками раневого ложа, состояние зоны ремоделирования ткани в раневом ложе, а также количество волосяных фолликулов (ВФ) по краям раны [9].

**Стадия воспаления**

Как уже было сказано выше, задержка раневого процесса на фазе воспаления и чрезмерный воспалительный ответ лежат в основе приобретения раной статуса длительно незаживающей [10]. Избыточная инфильтрация раневого ложа нейтрофилами является ключевым фактором в развитии хронического воспаления и может рассматриваться в качестве гистологического биомаркера длительно незаживающих ран [4]. На 5-е сутки раневое ложе многих мышей из группы «контроль» было заполнено воспалительным инфильтратом. Отмечена миграция воспалительных клеток в жировую ткань и соединительнотканную фасцию под раневым ложем и по краям раны. Кроме того, обнаружены существенная деградация эпидермиса и дермы по краям раны, а также участки погибших клеток (рис. 1, б). Раны многих мышей из группы «носитель» имели схожую гистологическую картину (рис. 1, в). В то же время у большинства мышей из группы «ЖЭК» наблюдалась умеренная инфильтрация раневого ложа, жировой ткани и фасции всей раневой области воспалительными клетками (рис. 1, г). Сравнение исследуемых групп продемонстрировало тенденцию к снижению площади воспалительного

инфильтрата раневого ложа мышей группы «ЖЭК» (рис. 1, а). Исходя из этого, можно сделать предположение об иммуномодулирующем эффекте ЖЭК благодаря наличию в его составе МСК.

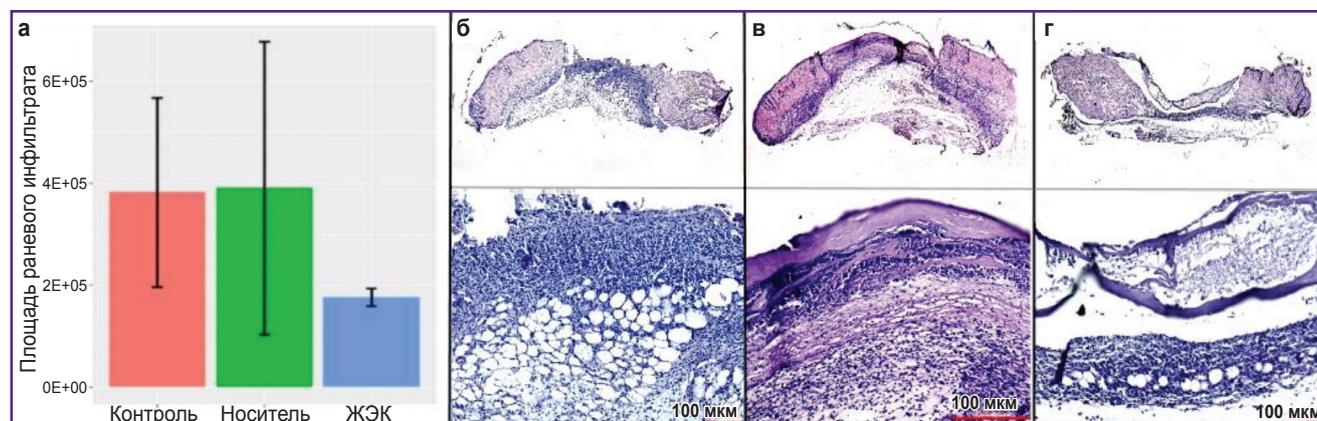
**Стадия пролиферации**

*Грануляционная ткань.* В период пролиферации происходило созревание грануляционной ткани у мышей всех групп. Однако отмечен ряд существенных различий в формировании грануляционной ткани у мышей из группы «контроль» и мышей из группы «ЖЭК».

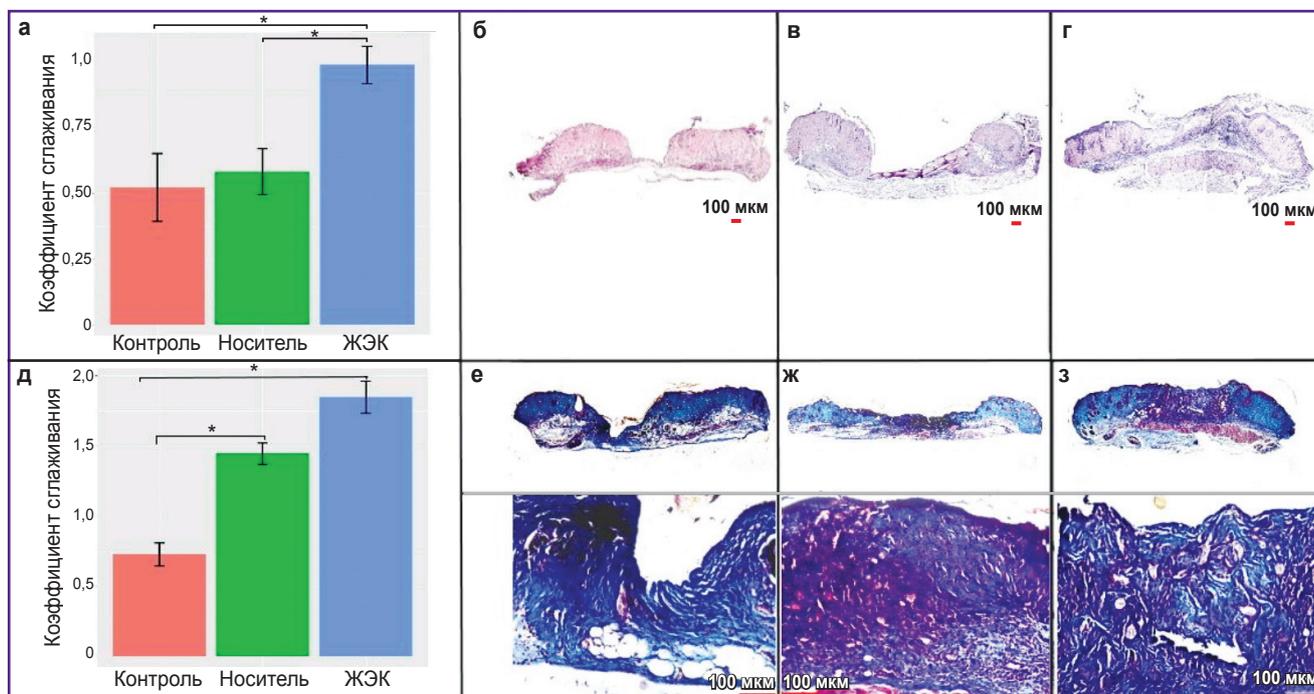
Как известно, длительно незаживающая рана характеризуется нарушениями формирования грануляционной ткани по разным причинам. Например, сверхпродукция нейтрофилами активных форм кислорода вызывает повреждения внеклеточного матрикса [4]. Предполагают также, что нормальному рубцеванию препятствует TNF-α, индуцирующий активность коллагеназы [11–13].

В группе «контроль», имитирующей длительно незаживающую рану без лечения, у большинства животных на гистологических препаратах ран была отмечена большая разница между толщиной дермы по краям и толщиной зоны ремоделирования ткани по центру раны. Края раны значительно возвышались над раневым ложем на 7-е сутки эксперимента (рис. 2, б). В группе «носитель» наблюдалась схожая картина (рис. 2, в). В группе «ЖЭК» на 7-е сутки у большинства животных толщина зоны ремоделирования ткани в раневом ложе практически достигала краев раны (рис. 2, г).

На 14-е сутки у многих животных из группы «контроль» толщина зоны ремоделирования ткани все еще была значительно меньше толщины дермы краев раны (рис. 2, д), в группе «носитель» толщина зоны ремоделирования ткани частично или полностью достигала краев раны (рис. 2, ж), а в группе «ЖЭК» у большинства животных зона ремоделирования ткани полностью заполняла раневое ложе по ширине и



**Рис. 1. Регенерация длительно незаживающей раны на стадии воспаления:**  
 а — площадь воспалительного инфильтрата в группах «контроль», «носитель» и «ЖЭК»;  
 состояние раны мыши на 5-е сутки, окрашивание гематоксилином–эозином: б — «контроль», в — «носитель», г — «ЖЭК»



**Рис. 2. Регенерация длительно незаживающей раны на стадии пролиферации:**

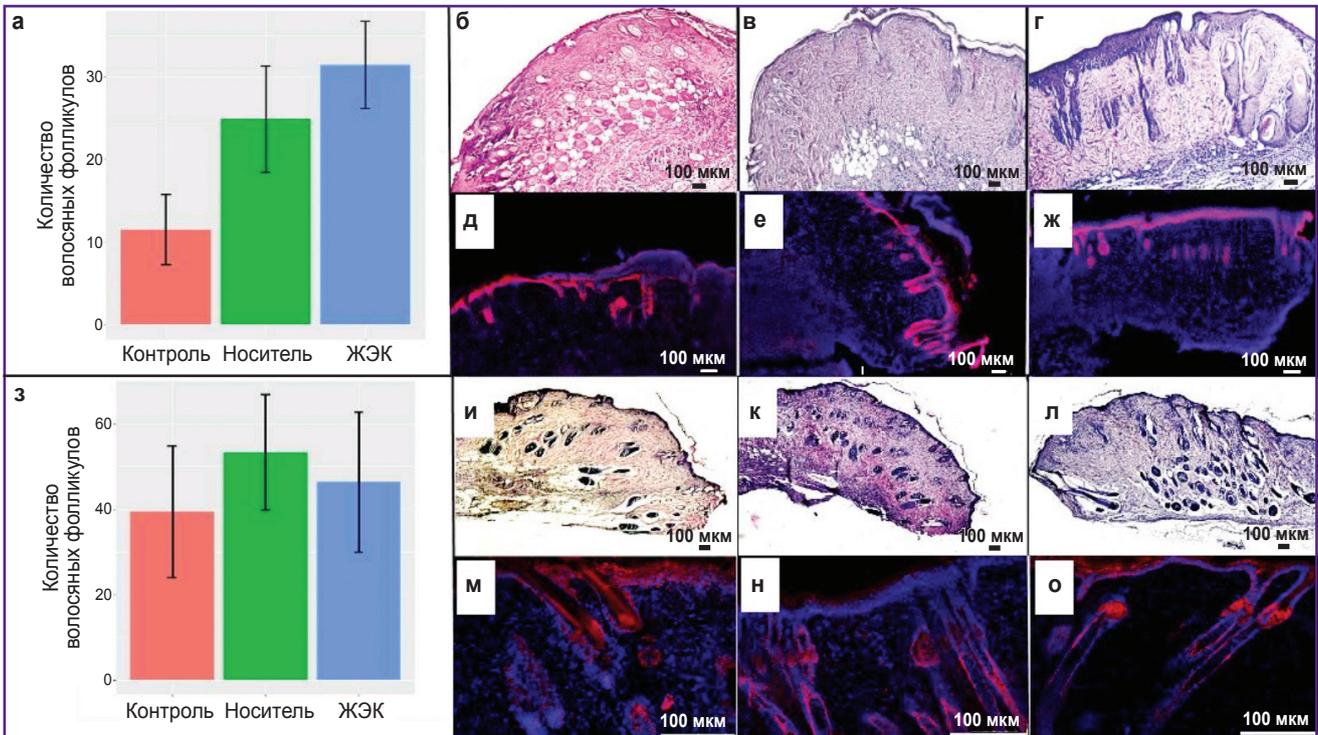
коэффициент сглаживания в группах «контроль», «носитель» и «ЖЭК» на 7-е (а) и 14-е сутки (д), \*  $p \leq 0.05$ ; состояние раны мыши на 7-е сутки, окрашивание гематоксилином–эозином: б — «контроль», в — «носитель», г — «ЖЭК»; состояние раны мыши на 14-е сутки, окрашивание по Маллори: е — «контроль», ж — «носитель», з — «ЖЭК»

высоте (рис. 2, з). Морфологически середина раны у мышей группы «контроль» на 14-е сутки характеризовалась скудным количеством ткани, а в группах «носитель» и «ЖЭК» — обильным; грануляционная ткань в группе «ЖЭК» отличалась хорошо визуализируемыми волокнами. Для описания эффективности лечения при трансплантации ЖЭК в отношении влияния на грануляции введено понятие «коэффициент сглаживания», который определяет отношение толщины зоны ремоделирования ткани раневого ложа к толщине дермы краев ран. В группе «ЖЭК» коэффициент сглаживания был статистически значимо выше, чем таковой в группах «носитель» и «контроль» на 7-е сутки, что свидетельствовало об эффективности трансплантации ЖЭК в устранении дефекта грануляционной ткани, который может привести к косметическим проблемам (рис. 2, а). На 14-е сутки коэффициенты сглаживания в группах «ЖЭК» и «носитель» были статистически значимо выше, чем в группе «контроль», при этом статистически значимо не отличались друг от друга (рис. 2, д).

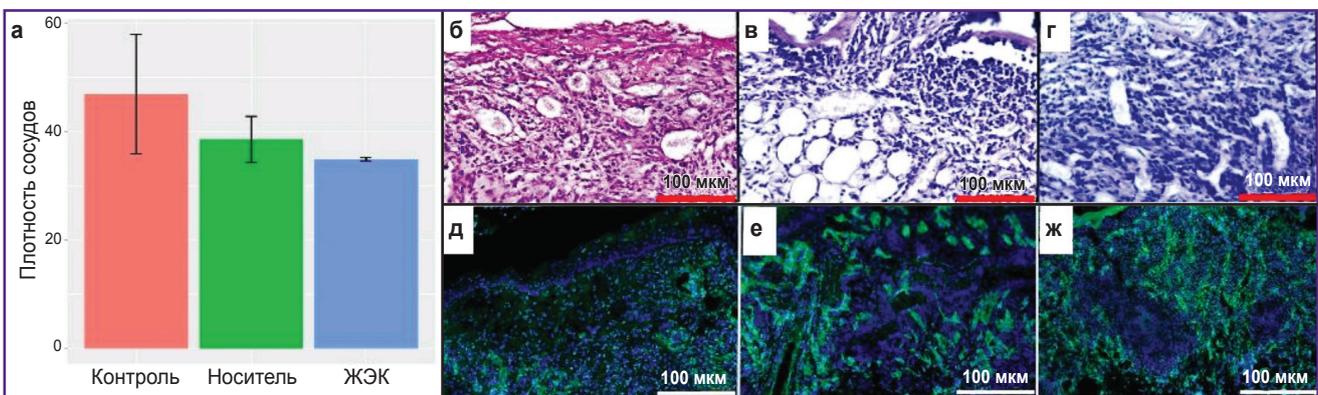
*Состояние ткани по краям ран. Волосные фолликулы: гибель и регенерация.* На 7-е сутки у многих животных всех трех групп продолжались дегенеративные изменения ткани краев ран. Ввиду индивидуальных различий между темпами регенерации наблюдались различные варианты состояния краев ран на данную временную точку: умеренная дегенерация интерфолликулярного эпидермиса, дермы и ВФ по краям раны;

массовая гибель данных структур с дальнейшим формированием струпа; частичная регенерация ткани. Известно, что регенерация ВФ может происходить в ходе различных процессов: регенерации в случае микроповреждения, регенерации в случае утраты части ВФ, раноиндуцированного неогенеза волос, характерного для крупных полнослойных ран грызунов [14], а также раноиндуцированного анагена [15]. В нашей работе определить тип регенерации, в ходе которой происходило восстановление ВФ в процессе заживления ишемизированной длительно незаживающей раны, не представлялось возможным ввиду технических сложностей. В связи с этим мы употребляем термин «регенерация ВФ» без конкретизации ее вида.

В нашем эксперименте отмечены определенные различия в динамике процессов дегенерации, гибели и регенерации ВФ у животных групп «контроль» и «ЖЭК». Так, у многих мышей из группы «контроль» наблюдалась массовая гибель ВФ по краям раны. Клетки ВФ характеризовались выраженными дегенеративными изменениями, а также кариолизисом (рис. 3, б). В то же время в группе «ЖЭК» многие ВФ, расположенные по краям ран, имели либо нормальную морфологию, либо характеризовались умеренными признаками дегенерации (рис. 3, в). Среднее количество ВФ на край раны в группе «ЖЭК» увеличилось по сравнению с группой «контроль». Это может свидетельствовать о том, что ЖЭК способствует сохранению ВФ или ускоряет процесс их регенерации (рис. 3, а).



**Рис. 3. Регенерация длительно незаживающей раны на стадии пролиферации:** среднее количество волосяных фолликулов на край раны в группах «контроль», «носитель» и «ЖЭК» на 7-е (а) и 14-е сутки (з); состояние края раны мыши на 7-е сутки, окрашивание гематоксилином–эозином: б — «контроль», в — «носитель», г — «ЖЭК»; окрашивание антителами к Krt14, ядра докраснены DAPI: д — «контроль», е — «носитель», ж — «ЖЭК»; состояние края раны мыши на 14-е сутки, окрашивание гематоксилином–эозином: и — «контроль», к — «носитель», л — «ЖЭК»; окрашивание антителами к Krt14, ядра докраснены DAPI: м — «контроль», н — «носитель», о — «ЖЭК»



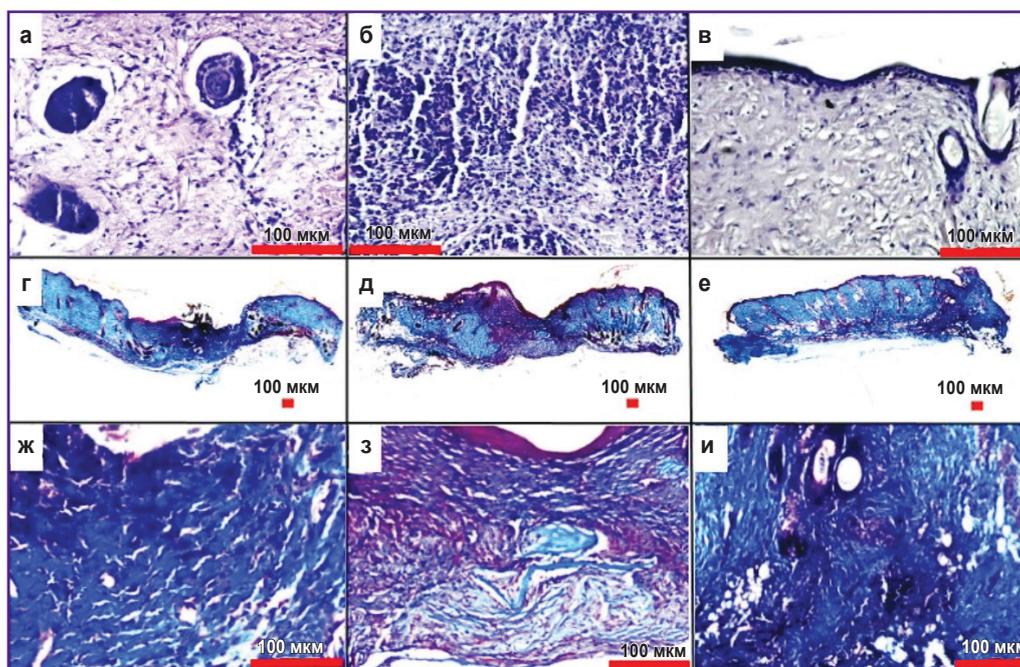
**Рис. 4. Регенерация длительно незаживающей раны на стадии пролиферации:** а — плотность сосудов в раневом ложе мышей групп «контроль», «носитель» и «ЖЭК»; состояние раневого ложа мыши на 7-е сутки, окрашивание гематоксилином–эозином: б — «контроль», в — «носитель», г — «ЖЭК»; окрашивание антителами к CD31, ядра докраснены DAPI: д — «контроль», е — «носитель», ж — «ЖЭК»

На 14-е сутки ВФ большинства ран имели нормальную морфологию; количество ВФ в группах статистически значимо не отличалось. Таким образом, темпы регенерации ВФ во всех трех группах сравнялись (рис. 3, з).

*Интенсивность ангиогенеза.* Количественный

анализ выявил отсутствие статистически значимых различий между плотностью сосудов в раневом ложе у мышей всех трех групп на 7-е сутки. Следовательно, ЖЭК не влияет на ангиогенез (рис. 4).

*Ремоделирование рубца и реэпителизация.* На 21-е сутки большинство ран у животных всех групп



**Рис. 5. Регенерация длительно незаживающей раны на стадии ремоделирования рубца и реэпителизации:**

состояние раневого ложа мыши в исследуемых группах на 21-е сутки, окрашивание гематоксилином–эозином: а — «контроль», зрелый рубец с ВФ; б — «носитель», инфильтрация воспалительными клетками, преобладание клеточного компонента над волокнами; в — «ЖЭК», зрелый рубец с ВФ; окрашивание по Маллори: г, ж — «контроль»; д, з — «носитель»; е, и — «ЖЭК»

характеризовались формированием рубца и реэпителизацией (рис. 5). У многих мышей в рубцовой ткани волокна преобладали над клеточным компонентом, а также наблюдались ВФ в фазе зрелого анагена. Исходя из этого, можно сделать вывод о полной завершенности процесса регенерации раны. Однако у некоторых мышей в раневом ложе клеточный компонент преобладал над волокнами, отмечалась инфильтрация воспалительными клетками, что говорит о незавершенности процесса ранозаживления. Оба варианта ранозаживления встречались у мышей всех трех групп. Таким образом, темпы регенерации в группах на 21-е сутки уравнивались.

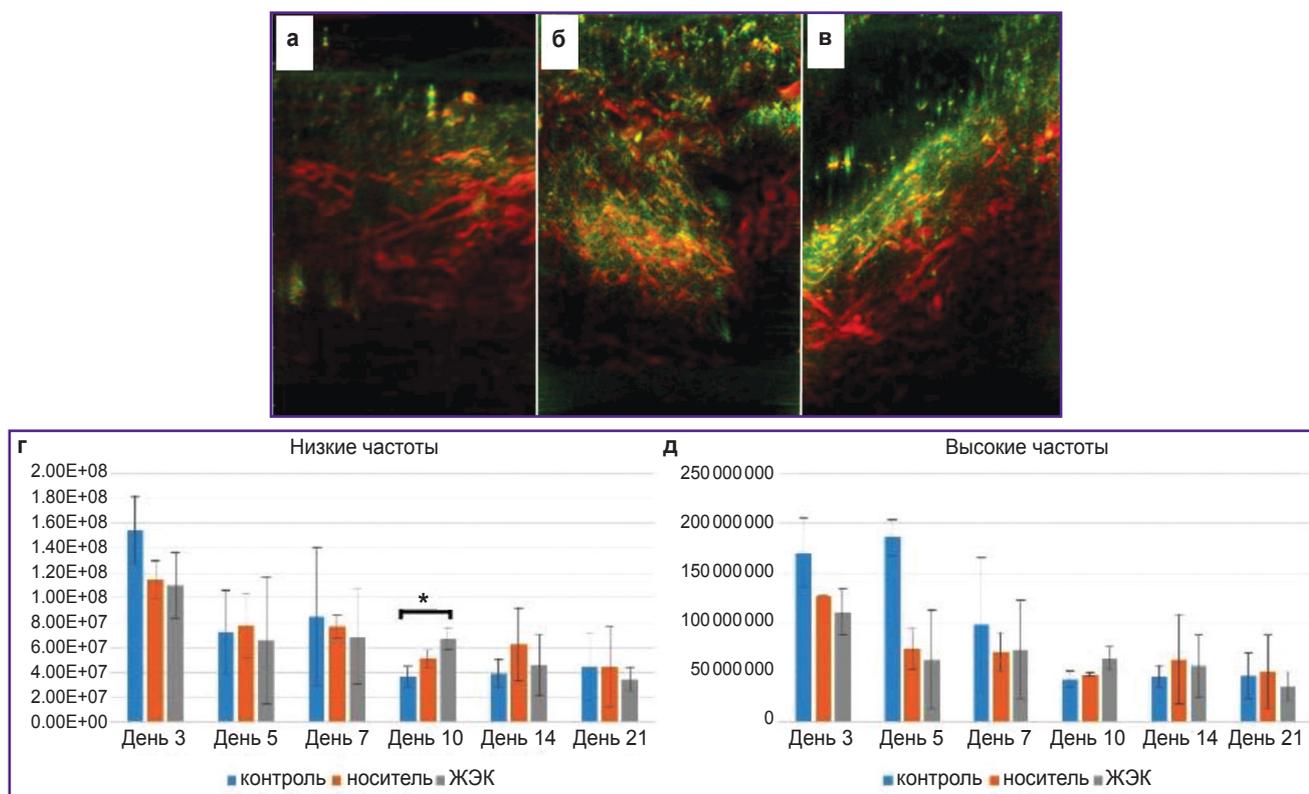
### **Характеристика раневого процесса методом растровой сканирующей оптоакустической мезоскопии**

Растровая сканирующая оптоакустическая мезоскопия — новейшая неинвазивная технология, позволяющая получать изображения в высоком разрешении. Для проведения РСОМ осуществляется сканирование интересующего участка кожи при помощи датчика параллельно с освещением пучком оптических волокон. Оптоакустические волны, генерированные в ткани в ответ на пульсирующее освещение, фиксируются; полученное изображение представляет собой трехмерное

распространение абсорбированного света в коже. Реконструированные изображения демонстрируют распределение меланина и гемоглобина в эпидермисе и дерме, что позволяет получать изображение микроваскулярной системы кожи на глубине до 1–2 мм [16].

Поскольку РСОМ успешно используется в исследованиях таких патологий кожи, как псориаз и атопическая экзема [17], в текущей работе данный метод применили для оценки динамики кровотока раны в качестве критерия удачной трансплантации БМКП. Измерения были проведены на 3-, 5-, 7-, 10-, 14- и 21-е сутки. В результате эксперимента установлено, что на 10-е сутки интенсивность сигнала на низких частотах в группе «ЖЭК» статистически значимо превышала таковую в группе «контроль» (рис. 6, в). Данный факт можно интерпретировать в пользу того, что ЖЭК способствует ангиогенезу во время ранозаживления.

В ходе работы при исследовании раневого ложа с помощью РСОМ возник ряд труднопреодолимых технических сложностей. Так, материал, из которого был сконструирован носитель для клеток ЖЭК, затруднял проведение эксперимента и создавал значительный фон. Кроме того, трансплантат мешал наблюдению за состоянием микроваскулярного русла под ним, в то время как рана мышей без трансплантации оставалась открытой, из-за чего сравнение полученных ре-



**Рис. 6. Исследование раневого ложа методом растровой сканирующей оптоакустической мезоскопии:** трехмерная реконструкция сосудов мыши на 21-е сутки в группах «контроль» (а), «носитель» (б) и ЖЭК (в); низкочастотный сигнал представлен красным цветом, высокочастотный — зеленым; интенсивность сигнала на низких (г) и высоких (д) частотах, \*  $p \leq 0,05$

зультатов представлялось некорректным. Проведению измерений препятствовал не только трансплантат, но и пластырь, снятие которого создавало риск инфицирования раны. Кроме того, во время измерений животное, чей организм испытывал нагрузку из-за кровопотери, продолжительное время вынужденно пребывало в состоянии общего наркоза, что негативно сказывалось на его состоянии и нередко приводило к гибели. Все это позволяет заключить, что РСОМ не может быть рекомендован для оценки эффективности трансплантации БМКП во время доклинических исследований.

### Заключение

Изучение регенерационных процессов показало, что предложенная нами модель ишемизированной длительно незаживающей раны является пригодной для доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов. Оценка таких параметров, как инфильтрация раны воспалительными клетками, состояние зоны ремоделирования ткани, количество волосяных фолликулов, васкуляризация раневого ложа, согласно соответствующим стадиям ранозаживления, методами гистологии и иммуногистохимии является адекватной и подходит для доклинических исследо-

ваний биомедицинских клеточных продуктов на изучаемой модели. Кроме того, в работе был предложен новый показатель — коэффициент сглаживания, который, являясь отношением толщины зоны ремоделирования ткани к толщине дермы краев раны, позволил оценить степень заполненности раневого ложа развивающейся тканью. Его высокое значение в группе «ЖЭК» означает, что трансплантация биомедицинских клеточных продуктов влияет на свойства фибробластов, препятствует механическому напряжению в ране и, как следствие, предотвращает формирование косметического дефекта. Данный показатель позволит оценивать состояние зоны ремоделирования ткани в раневом ложе с трансплантацией и без нее и таким образом прогнозировать эффективность биомедицинских клеточных продуктов на предмет устранения косметических дефектов.

Оценка динамики кровотока раны методом растровой сканирующей оптоакустической мезоскопии не может быть рекомендована для доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов на предложенной модели ввиду ее особенностей.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность сотрудникам Сколковского института науки и технологий д.х.н., профессору Д.А. Горину, к.б.н.

М.В. Новосёловой и к.б.н. О.С. Гусяковой за помощь в проведении исследований методом РСМ.

**Финансирование исследования.** Работа выполнена в рамках Государственного задания ИБР РАН №0088-2021-0016 и поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение №075-15-2021-1063 от 28.09.2021.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Литература/References

1. Xu F., Zhang C., Graves D.T. Abnormal cell responses and role of TNF- $\alpha$  in impaired diabetic wound healing. *Biomed Res Int* 2013; 754802, <https://doi.org/10.1155/2013/754802>.
2. Zhang J., Yang X., Wang H., Zhao B., Wu X., Su L., Xie S., Wang Y., Li J., Liu J., Liu M., Han F., He T., Zhang W., Tao K., Hu D. PKC $\zeta$  as a promising therapeutic target for TNF $\alpha$ -induced inflammatory disorders in chronic cutaneous wounds. *Int J Mol Med* 2017; 40(5): 1335–1346, <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3144>.
3. Eming S.A., Krieg T., Davidson J.M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 2007; 127(3): 514–525, <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700701>.
4. Zhao R., Liang H., Clarke E., Jackson C., Xue M. Inflammation in chronic wounds. *Int J Mol Sci* 2016; 17(12): 2085, <https://doi.org/10.3390/ijms17122085>.
5. Васильев А.В. *Клеточные механизмы репарации тканевых повреждений*. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М; 2003.  
Vasiliev A.V. *Kletochnye mekhanizmy reparatsii tkanevykh povrezhdeniy*. Avtoref. dis. ... dokt. biol. nauk [Cellular mechanisms of tissue damage repair. DSc Thesis]. Moscow; 2003.
6. Lindblad W.J. Considerations for selecting the correct animal model for dermal wound-healing studies. *J Biomater Sci Polym Ed* 2008; 19(8): 1087–1096, <https://doi.org/10.1163/156856208784909390>.
7. Моргун Е.И. *Динамика процессов репарации и клеточной гибели в модели ишемизированной длительно незаживающей кожной раны у мышей*. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М; 2021.  
Morgun E.I. *Dinamika protsessov reparatsii i kletochnoy gibeli v modeli ishemizirovannoy dlitel'no nezazhivayushchey kozhnoy rany u myshey*. Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk [Dynamics of repair processes and cell death in a model of ischemic long-term non-healing skin wound in mice. PhD Thesis]. Moscow; 2021.
8. Morgun E.I., Rogovaya O.S., Vorotelyak E.A. Ischemic

non-healing skin wound model: cell death and wound healing mechanisms. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2018; 10(4): 69–77, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.4.08>.

9. Chermnykh E.S., Kiseleva E.V., Rogovaya O.S., Rippa A.L., Vasiliev A.V., Vorotelyak E.A. Tissue-engineered biological dressing accelerates skin wound healing in mice via formation of provisional connective tissue. *Histol Histopathol* 2018; 33(11): 1189–1199, <https://doi.org/10.14670/hh-18-006>.

10. Han G., Ceilley R. Chronic wound healing: a review of current management and treatments. *Adv Ther* 2017; 34(3): 599–610, <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0478-y>.

11. Brenner D., O'Hara M., Angel P., Chojkier M., Karin M. Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Nature* 1989; 337(6208): 661–663, <https://doi.org/10.1038/337661a0>.

12. Dayer J., Beutler B., Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 1985; 162(6): 2163–2168, <https://doi.org/10.1084/jem.162.6.2163>.

13. Salomon G.D., Kasid A., Cromack D.T., Director E., Talbot T.L., Sank A., Norton J.A. The local effects of cachectin/tumor necrosis factor on wound healing. *Ann Surg* 1991; 214(2): 175–180, <https://doi.org/10.1097/0000658-199108000-00012>.

14. Wang X., Hsi T.S., Guerrero-Juarez C.F., Pham K., Cho K., McCusker C.D., Monuki E.S., Cho K.W., Gay D.L., Plikus M.V. Principles and mechanisms of regeneration in the mouse model for wound-induced hair follicle neogenesis. *Regen (Oxf)* 2015; 2(4): 169–181, <https://doi.org/10.1002/reg.2.38>.

15. Wang X., Chen H., Tian R., Zhang Y., Drutskaya M., Wang C., Ge J., Fan Z., Kong D., Wang X., Cai T., Zou Y., Wang J., Wang J., Wang S., Qin Z., Jia H., Wu Y., Liu J., Nedospasov S.A., Tredget E.E., Lin M., Liu J., Jiang Y., Wu Y. Macrophages induce AKT/ $\beta$ -catenin-dependent Lgr5<sup>+</sup> stem cell activation and hair follicle regeneration through TNF. *Nat Commun* 2017; 8: 14091, <https://doi.org/10.1038/ncomms14091>.

16. Li X., Dinis U.S., Aguirre J., Bi R., Dev K., Attia A.B.E., Nitkunanantharajah S., Lim Q.H., Schwarz M., Yew Y.W., Thng S.T.G., Ntziachristos V., Olivo M. Optoacoustic mesoscopy analysis and quantitative estimation of specific imaging metrics in Fitzpatrick skin phototypes II to V. *J Biophotonics* 2019; 12(9): e201800442, <https://doi.org/10.1002/jbio.201800442>.

17. Nau T., Schönmann C., Hindelang B., Riobo L., Doll A., Schneider S., Englert L., He H., Biedermann T., Darsow U., Lauffer F., Ntziachristos V., Aguirre J. Raster-scanning optoacoustic mesoscopy biomarkers for atopic dermatitis skin lesions. *Photoacoustics* 2023; 31: 100513, <https://doi.org/10.1016/j.pacs.2023.100513>.