

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Сухов Андрей Владимирович

**Оптимизация заживления операционных ран после реконструктивных
вмешательств на коже в эксперименте**

3.1.9. Хирургия

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Блинова Екатерина Валериевна

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ЗАЖИВЛЕНИЕ КОЖНОЙ РАНЫ: СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД НА МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ И СПОСОБЫ ОПТИМИЗАЦИИ ПРОЦЕССА (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР).....	16
1.1 Основные стадии заживления кожной раны и их регуляция	17
1.2 Ответ резидентных клеток на кожное повреждение: роль в заживлении раны	24
1.3 Роль отдельных клеточных популяций в ранозаживлении	26
1.3.1 Кератиноциты и продуцируемые ими молекулы в заживлении кожной раны: применение в хирургии	26
1.3.2 Фундаментальное и хирургическое значение клеток Лангерганса и дендритных клеток в заживлении кожной раны	28
1.3.3 Значение тучных клеток в заживлении кожной раны: межклеточное взаимодействие и антимикробные свойства	31
1.4 Современные направления развития технологий ранозаживления.....	34
1.5 Использование различных наноматериалов для лечения кожных раневых дефектов	35
1.5.1 Ядерно-оболочечные наночастицы и поверхностная наноинженерия: эффективность применения при раневом процессе	36
1.5.2 Карбоновые наноматериалы в хирургии кожной раны	37
1.5.3 Наноматериалы металлов и металлоидов как перспективные стимуляторы ранозаживления	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	43
2.1 Соблюдение принципов биоэтики при проведении эксперимента с использованием лабораторных животных	44
2.2 Общий план и дизайн экспериментально-хирургического исследования	46
2.3 Лабораторные животные и условия их содержания. Принципы формирования экспериментальных групп	49

2.4 Характеристика наночастиц оксида церия: получение, хранение и применение в экспериментально-хирургических условиях.....	52
2.5 Методы моделирования экспериментальных ран	53
2.5.1 Модель линейной кожной раны у крысы	53
2.5.2 Модель циркулярной кожной полнослойной раны у лабораторной крысы	55
2.5.3 Модель округлой полнослойной кожной раны минипига. Способ планирования кожного лоскута.....	57
2.6 Метод определения прочности и косметических характеристик кожного рубца	60
2.7 Методы морфологического и иммуногистохимического исследования	62
2.7.1 Методы светооптического исследования.....	62
2.7.2 Иммуногистохимический метод исследования.....	63
2.8 Метод определения уровня про- и противовоспалительных цитокинов в ткани кожной раны	65
2.9 Метод изучения активности локальной антиокислительной системы в области экспериментальной раны.....	66
2.10 Метод определения экспрессии рецептора фактора роста фибробластов (FGFR3) с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (rtПЦР).....	67
2.11 Метод оценки интенсивности ангиогенеза в кожной ране на основе лазерной speckle-фотометрии	69
2.12 Статистический анализ результатов проведенного диссертационного исследования	70
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ХИРУРГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЕ ТОПИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЦЕРИЯ НА РАНОЗАЖИВЛЕНИЕ ЛИНЕЙНОЙ И ПОЛНОСЛОЙНОЙ ЦИРКУЛЯРНОЙ КОЖНОЙ РАНЫ КРЫСЫ	72

3.1 Влияние местного применения наночастиц оксида церия на ранозаживление линейной кожной раны крысы	72
3.2 Влияние 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в смеси с N-ацетил-6-аминогексановой кислотой в форме водорастворимого гидрогеля на заживление циркулярной полнослойной кожной раны крыс.....	79
3.3 Влияние 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в смеси с N-ацетил-6-аминогексановой кислотой в форме водорастворимого гидрогеля на патоморфологическую картину полнослойной кожной раны крыс	82
3.4 Влияние топического применения водорастворимого гидрогеля с 1% коллоидным раствором наночастиц оксида церия на воспалительную реакцию и антиоксидантный потенциал тканей раны	87
3.5 Ангиогенез в регенерирующей кожной ране и влияние на него местного применения наночастиц оксида церия	92
3.6 Проллиферативный потенциал клеток и тканей регенерирующей кожной раны под действием топического применения наночастиц оксида церия.....	97
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ Z-ОБРАЗНОЙ ПЛАСТИКИ ДЕФЕКТА КОЖИ МИНИПИГОВ НА ФОНЕ ТОПИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЦЕРИЯ В ВИДЕ ГИДРОГЕЛЯ.....	101
ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	108
5.1 Итоги выполнения диссертационного исследования.....	115
5.2 Перспективы дальнейшего развития темы диссертационного исследования	116
ВЫВОДЫ	117
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Кожа – самый крупный орган человеческого тела, обладающий огромным набором функций – от иммунологической защиты и формирования чувствительности до реализации свойств защитного барьера и контроля температуры и влажности [1]. Заболеваемость, ассоциированная с кожными ранами, остается высокой и обуславливает высокую медико-социальную и экономическую значимость этой проблемы во всем мире. Более того, в последнее десятилетие наблюдается рост первичной заболеваемости, хирургической активности по поводу раневых дефектов, в частности, ожогового и диабетического происхождения [1, 2]. По данным последнего доклада экспертов ВОЗ более 300000 смертей ежегодно обусловлены последствиями кожных ран [3].

Раны характеризуются нарушением целостности кожи вследствие заболевания, травмы или повреждения [4]. Небольшие раны способны к самостоятельному заживлению без потребности в хирургическом или терапевтическом вмешательстве. Однако, обширные поражения кожи требуют незамедлительного и самого внимательного отношения. Наиболее опасными последствиями больших повреждений кожи являются кровотечение и вторичное инфицирование [5]. В зависимости от длительности раневого процесса кожные раны могут быть острые (острые повреждения вследствие несчастных случаев или хирургические нарушения целостности) и хронические [6]. Сразу же после повреждения начинается сложный процесс ранозаживления, включающий ряд последовательно протекающих стадий: стадии тромбообразования, воспаления, регенерации и ремоделирования [7-9].

За последние два десятилетия применение наноматериалов в хирургии кожной раны получило довольно высокое распространение [10-12]. Среди наиболее актуальных достижений в области можно отметить применение наноматериалов для создания самоформирующихся покрытий на рану [13, 14]. Также наноструктуры рассматриваются как эффективные транспортные системы

для таргетной доставки лекарственных средств, обладающих ранозаживляющим и противомикробным действием, в очаг повреждения и воспаления [15, 16]. Вместе с тем, чрезвычайная вариабельность материалов для создания лекарственных наночастиц, сохраняющаяся медико-социальная значимость проблемы лечения кожных ран диктуют необходимость продолжения изыскания эффективных и безопасных подходов к стимуляции ранозаживления, что обуславливает актуальность настоящей диссертационной работы.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время существует довольно широкий спектр наноматериалов, у которых показана способность к стимуляции ранозаживления, в том числе, в сочетании с антимикробными, анестезирующими и иными свойствами [17, 18]. К таковым относятся полимерные материалы – липосомы, целлюлоза, карбид кремния, а также металлы и металлоиды [17, 18]. Все они могут обладать собственной активностью либо допироваться другими молекулами. При этом, формы, в которых указанные наночастицы применяются в хирургической практике, включают коллоидные растворы, эмульсии, мази, пластыри, самоформирующиеся повязки, аэрозоли и др.

Ранее в нашей лаборатории совместно с учеными отдела химии, технологии синтетических лекарственных средств и аналитического контроля АО «ВНЦ БАВ» (г. Старая Купавна) в сотрудничестве с к.м.н. Д.В. Пахомовым была разработана аэрозольная форма наночастиц оксида церия. В экспериментах на животных с сахарным диабетом первого и второго типа топическое применение этой формы позволило не только ускорять ранозаживление, но добиваться формирования противомикробного действия в отношении штамма *S.aureus*, стимулировать ангиогенез в очаге повреждения [17, 18].

Цель и задачи

Провести экспериментально-хирургическое обоснование эффективности применения водорастворимого гидрогеля на основе наночастиц коллоидного раствора оксида церия для лечения неосложненной кожной раны.

1. Изучить динамику заживления линейной кожной раны крысы, прочность формирующегося рубца и его косметические свойства на фоне курсового топического применения коллоидного раствора наночастиц оксида церия в форме гидрогеля.

2. Определить закономерности закрытия полнослойной циркулярной неосложненной кожной раны крысы при местном воздействии коллоидного раствора наночастиц оксида церия в форме гидрогеля.

3. Изучить морфологические особенности 2-4 фаз раневого процесса и влияние на них коллоидного раствора наночастиц оксида церия в форме гидрогеля у экспериментальных животных с открытой плоскостной неосложненной кожной раной.

4. Установить характер влияния наночастиц оксида церия в форме гидрогеля на некоторые звенья местной регуляции асептического воспаления, свободнорадикальных реакций, пролиферации и дифференцировки грануляционной ткани в раневом ложе экспериментального плоского дефекта кожи.

5. Изучить влияние топического воздействия наночастиц оксида церия в форме гидрогеля на неоангиогенез в регенерирующей ране с определением диагностического потенциала метода лазерной speckle-фотометрии в оценке кровотока в моменте времени.

6. Исследовать влияние топического применения коллоидного раствора наночастиц оксида церия в форме гидрогеля на заживление и косметические результаты Z-образной кожной пластики округлой полнослойной кожной раны минипига с планированием лоскутов по Лимбергу.

Научная новизна

Впервые проведено комплексное экспериментально-хирургическое исследование эффективности курсового топического применения коллоидного раствора наночастиц церия в форме гидрогеля на открытые линейную и циркулярную полнослойную неосложненную кожную рану крыс и на область кожно-пластического закрытия округлой кожной раны минипигов.

Установлено, что топическое курсовое применение 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в смеси с N-ацетил-6-аминогексановой кислотой в форме водорастворимого гидрогеля ускоряет заживление линейной кожной раны у крыс Sprague-Dawley, что сопровождается повышением в среднем на 31,4% при сравнении с контролем прочности формирующегося рубцового соединения. При анализе косметических результатов заживления линейной раны показано сокращение площади поверхности рубца, отсутствие его депигментации, эритематозных изменений и телеангиэктазий, атрофических и гипертрофических процессов в области соединения.

Показано, что курсовое (однократно в сутки) воздействие наночастиц оксида церия в форме гидрогеля на неосложненную циркулярную полнослойную кожную рану крыс приводит к сокращению срока полного закрытия раны в среднем до 16,3 сут, уменьшению площади поверхности рубца в среднем до 51,4 мм². Установлено, что в основе полученного эффекта лежит ограничение распространенности и глубины воспалительной реакции, сокращение масштаба инфильтративного процесса. На основе анализа экспрессии маркера Ki-67 и гена *FGFR3* подтверждено ускорение созревания грануляционной ткани и начала реэпителизации.

Установлено, что местное воздействие 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в смеси с N-ацетил-6-аминогексановой кислотой в форме водорастворимого гидрогеля у животных к 5-м суткам наблюдения приводит к ограничению роста тканевой концентрации провоспалительных цитокинов ФНО-альфа и ИЛ-1бета наряду с повышением уровня противовоспалительного цитокина ИЛ-10 в грануляционных тканях раны, что

создает благоприятный баланс межклеточной сигнализации в очаге ранозаживления.

Впервые выявлено, что местное применение 1% НФОЦ однократно в сутки модулирует баланс между свободнорадикальными и антиоксидантными механизмами, позволяет избежать чрезмерной активации липопероксидации, что, в комплексе с другими факторами, сдерживает течение воспалительной фазы раневого процесса и ускоряет ранозаживление.

Показано, что топическое применение 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в гидрогеле в течение 9 суток, предшествующих анализу, приводит к росту плотности CD34+ эндотелиоцитов в формирующихся грануляциях, что отражает интенсификацию формирования кровеносных капилляров, обеспечивающих плотность микрососудов на уровне $11,3 \pm 0,5$ на 1 см² площади поверхности ткани. При применении инновационного метода лазерной speckle-фотометрии для оценки уровня кровотока в моменте времени в группе животных, получавших топическое лечение 1% коллоидным раствором наночастиц церия в виде гидрогеля, к 5-м суткам наблюдения был зарегистрирован максимальный рост интегрального показателя регионарного кровотока в моменте времени до $8,4 \pm 0,4$, что свидетельствовало об ускорении патофизиологического процесса ангиогенеза, обеспечивающего потребности в быстро размножающихся грануляционных тканях, выстилающих дно раны.

В работе установлено, что локальное воздействие наночастицами оксида церия на область Z-образной кожной пластики округлого дефекта кожи минипигов с планированием лоскутов по Лимбергу повышает прочность рубцового соединения и сопровождается однонаправленным (при сопоставлении с результатами, полученными на крысах) косметическими результатами в виде уменьшения площади поверхности рубца, отсутствия пигментных и эритематозных изменений окружающих тканей, атрофических и гипертрофических процессов в области соединения.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенное исследование имеет большое практическое значение. Полученные результаты о ранозаживляющем действии 1% коллоидного раствора оксида церия в форме водорастворимого гидрогеля могут быть с успехом использованы при проведении последующих исследований инновационной хирургической технологии и обладают высоким трансляционным потенциалом для реальной клинической практики.

Полученные результаты обосновывают режим и кратность топического использования наночастиц – при применении 1% коллоидного раствора оксида церия в форме гидрогеля его следует наносить равномерным слоем толщиной до 1 мм на открытую раневую поверхность однократно в сутки в течение 10-15 суток.

Инновационный метод лазерной speckle-фотометрии, впервые примененный в условиях экспериментальной кожной раны может быть использован для неинвазивной и точной оценки интенсивности кровотока и динамики ангиогенеза на поверхности неэпителизированных свежих кожных раневых дефектов.

Методология и методы исследования

Настоящая диссертация представляет собой экспериментально-хирургическое исследование, выполненное с использованием в качестве объекта исследования лабораторных животных двух видов – крыс линии Sprague-Dawley и минипигов. Целесообразность привлечения двух видов животных обосновывается тем, что лабораторные грызуны – крысы – являются наиболее удобным объектом для воспроизведения данного типа экспериментальной патологии, в международной научной периодике имеется большой массив статей, описывающих как способ моделирования кожной раны на этом виде грызунов, так и клиническую и молекулярно-генетическую характеристику этапов раневого процесса при его осложненном и неосложненном течении.

Поскольку разработка новых и / или оптимизация существующих подходов к хирургии кожной раны представляется комплексной и междисциплинарной

проблемой, требующей в своей методологической основе привлечения методов молекулярной биологии, биохимии, органической и физической химии, фармакологии, биомеханики и биоинженерии, этот принцип был положен в построение методологического фундамента настоящего диссертационного исследования, сочетающего в себе основополагающие элементы гносеологической теории познания – сочетания единства научного замысла и поставленных цели и задач, комплексного подхода к их решению, использования необходимой и достаточной доказательной базы для каждого положения диссертации.

В работе изучена эффективность 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в форме водорастворимого гидрогеля, любезно представленная учеными АО «ВНЦ БАВ» (Старая Купавна).

Для воспроизведения экспериментальной патологии использовали модель линейной кожной раны крысы, циркулярной полнослойной неосложненной кожной раны крысы, а также модель округлой полнослойной кожной раны минипига с Z-образной пластикой дефекта и планированием лоскутов по Лимбергу.

Динамику ранозаживления на фоне топического применения гидрогеля с наночастицами оксида церия проводили методом фотофиксации раны с последующей программной обработкой изображений и подсчетом площади раны и рубцового соединения. Определение влияния гидрогеля с наночастицами оксида церия на косметические характеристики формирующегося кожного соединения проводили по шкале SCAR. При окрашивании срезов тканей раневого ложа гематоксилином и эозином и цитохимическим окрашиванием по Ван-Гизону определение влияния гидрогеля с наночастицами оксида церия на динамику морфологических процессов в кожной ране.

Изучение влияния гидрогеля с наночастицами оксида церия на активность свободнорадикальных процессов и антирадикальный статус в кожной ране проводили методом железоиндуцированной хемилюминисценции, концентрацию про- и противовоспалительных цитокинов в области воспаления определяли

количественным ИФА типа «сэндвич». Проллиферативный потенциал в регенерирующей ране оценивали методами ИГХ, а экспрессию гена *FGFR3* – методом ПЦР в режиме реального времени с подтверждением результатов секвенированием по Сэнгеру.

Исследование влияния гидрогеля с наночастицами оксида церия на течение процесса неоангиогенеза в области раневого дефекта проведено с помощью ИГХ определения плотности CD34+ эндотелиоцитов и путем применения инновационной методики лазерной speckle-фотометрии.

Анализ данных проводили методами вариационной статистики с использованием лицензионного пакета статистических программ STATA 17.0.

Положения, выносимые на защиту

1. Топическое применение 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в смеси с N-ацетил-6-аминогексановой кислотой в форме гидрогеля один раз в сутки курсом 10 суток приводит к ускорению заживления линейной хирургической раны кожи крыс и минипигов с повышением прочности рубцового соединения. Применение лечебной технологии сопровождается заметным косметическим эффектом.

2. Местное использование 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в смеси с N-ацетил-6-аминогексановой кислотой в форме гидрогеля один раз в сутки курсом 12 суток вызывает ускорение заживления полнослойной циркулярной неосложненной кожной раны крысы с сокращением площади формирующегося рубца. В основе эффекта лечебной технологии лежит сдвиг межклеточной сигнализации в сторону повышение продукции противовоспалительных цитокинов, ограничение амплитуды свободнорадикальных реакций в области раневого дефекта, активация неоангиогенеза, что на фоне индукции пролиферации и дифференцировки грануляционной ткани сокращает сроки течения асептического воспаления, чрезмерную продукцию коллагена и ускоряет реэпителизацию раны.

3. Применение инновационного метода лазерной speckle-фотометрии позволяет оценивать уровень кровотока в поверхностно расположенных свежих грануляционных тканях регенерирующей раны и по уровню достоверности результатов соответствует иммуногистохимическому определению плотности образованных капилляров на основании оценки экспрессии CD34+ эндотелиоцитов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.1.9. Хирургия, области исследований «Экспериментальная и клиническая разработка современных высокотехнологичных методов хирургического лечения, в том числе эндоскопических и роботических».

Связь диссертации с основными научными темами

Диссертационная работа выполнена при частичной финансовой поддержке договора на выполнение работ в рамках составной части прикладных научных исследований и экспериментальных разработок (СЧ ПНИЭР) ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) по НИР «Экспериментальные исследования по имплантации и неоваскуляризации трехмерных клеточно- и тканеинженерных конструкций», гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации НШ-843.2022.3.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность сформулированных по результатам выполненной диссертационной работы выводов и положений обосновывается строгим следованием протоколу исследования и принципам биоэтики, неукоснительным соблюдением процедур получения исходных данных, их регистрации и учета, использованием в исследовании лицензионного программного обеспечения, валидированных методов получения доказательств, сертифицированного и

поверенного оборудования, лабораторных животных, приобретенных в сертифицированных питомниках, формированием объема выборки необходимого и достаточного для получения репрезентативных результатов, корректных и современных методов медико-биологической статистики.

Апробация диссертационной работы проведена на заседании кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол №9 от 19 сентября 2023 г.

Результаты представленного диссертационного исследования докладывались и обсуждались на XXVIII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2022,23), XXIII Международном конгрессе «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 2022).

Личный вклад автора

Автор выдвинул идею выполнения настоящего исследования, самостоятельно провел глубокий анализ зарубежных и отечественных литературных источников, сформулировал и обосновал научную гипотезу, предложил использование в качестве способа стимулирования ранозаживления топическое применение на область кожного дефекта водорастворимого гидрогеля, содержащего 1% коллоидный раствор наночастиц оксида церия, лично автором обоснована необходимость привлечения всего спектра методологических инструментов для ответа на поставленные задачи. Автор лично выполнял работы по моделированию линейной и циркулярной кожной раны крысы, округлой кожной раны минипига, планировал кожные лоскуты по Лимбергу и проводил Z-образную пластику. Автор непосредственно участвовал в оценке динамики ранозаживления, прочностных и косметических эффектов технологии. Автор включенно участвовал в выполнении иммуногистохимических, морфологических, иммуноферментных и молекулярных исследований. При непосредственном участии автора проведены speckle-фотометрические исследования. Автор

самостоятельно провел обобщение и анализ результатов. Диссертант принял самое деятельное участие в подготовке научных публикаций по теме диссертации, самостоятельно написал рукопись и автореферат работы.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 5 работ, в том числе: 2 научных статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 1 статья в издании, индексируемом в международной базе данных Scopus; 1 патент на изобретение; 1 публикация в сборнике материалов всероссийской научной конференции.

Объём и структура работы

Диссертация написана по традиционному плану, включает следующие разделы: введение, главу 1 – литературный обзор, главу 2 с описанием материалов и методов исследования, главу 3 с результатами исследований эффективности технологии у крыс линейной и циркулярной полнослойной кожной раной, главу 4 с результатами экспериментально-хирургического исследования на минипигах, главу 5, обобщающую результаты и заключающую исследование.

Диссертация изложена на 137 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 24 рисунками и 13 таблицами. Библиографический список содержит выходные данные 169 работ, из которых 5 работ отечественных и 164 – зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. ЗАЖИВЛЕНИЕ КОЖНОЙ РАНЫ: СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД НА МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ И СПОСОБЫ ОПТИМИЗАЦИИ ПРОЦЕССА (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

Заживление раны – это тонко регулируемый патофизиологический процесс, который включает взаимодействие между резидентными клетками, популяциями мигрирующих в область повреждения инфильтрирующих клеточных популяций, молекулами межклеточного матрикса цито- и хемокинами. Последовательные этапы процесса ранозаживления направлены на достижение, с одной стороны, контроля над факторами внешней агрессии, эрадикации инородных тел и продуктов, и, с другой стороны, регуляции гомеостаза, направленной на обеспечение поддержания целостности тканей, обеспечение их функциональности в ответ на травматическое повреждение с последующей полной тканевой регенерацией [21, 22].

В соответствии с определением, рана – это повреждение или дезинтеграция нормальной анатомической структуры и функции ткани. Масштаб раневого кожного процесса колеблется в чрезвычайно широких пределах – от небольшого нарушения целостности эпидермиса до более глубоких поражений, достигающих дермы, или простирающихся до подкожных структур с повреждением мышц, сосудов, костей и внутренних органов [23]. В многочисленных работах было показано, что, несмотря на существенные различия в структурно-функциональной организации кожи и внутренних органов и способов поражения, процесс заживления раны характеризуется единой последовательностью связанных друг с другом событий с вовлечением различных типов клеток и межклеточных взаимодействий [24].

Кожа, будучи наружным покровом человеческого тела, выступает в качестве физического барьера, главным образом, благодаря роговому слою (эпидермису). Именно он обеспечивает первичную защиту от воздействия факторов окружающей среды, физической агрессии и инвазии внешних биологических патогенов. Кроме того, поверхностные слои кожи колонизированы

популяциями микроорганизмов, формирующих кожную комменсальную микробиоту, играющую важнейшую роль в обеспечении иммуотренирующей функции кожи [25-27].

Вторичная линия защиты формируется клетками так называемого врожденного иммунитета (тучные клетки, нейтрофилы, макрофаги, некоторые лимфоциты), резидентными дендритными клетками и клетками Лангерганса, которые обеспечивают взаимодействие между врожденными и приобретенными иммунными реакциями, а также неиммунными клетками, такими как кератиноциты эпидермиса и меланоциты [28].

Клетки приобретенного (адаптивного) иммунитета (Т-лимфоциты, цитотоксические популяции Т-клеток, Т-клетки хелперы, $\gamma\delta$ Т-клетки) участвуют в поздних реакциях защиты кожи [29]. Все перечисленные элементы выполняют важнейшую функцию регуляции процесса заживления кожной раны и восстановления гомеостаза после тканевого повреждения, задействуя в этот процесс различные клеточные и тканевые механизмы [30]. Основные клеточные элементы и их функции представлены в таблице 1.

1.1 Основные стадии заживления кожной раны и их регуляция

По современным представлениям заживление кожной раны включает в себя четыре последовательных фазы или стадии (рисунок 1): 1 фаза – гемостаза, продолжительностью от нескольких минут до нескольких часов, 2 фаза – воспаления, которая в среднем длится от 1 до 7 суток, 3 фаза – разрешение воспалительной реакции – пересекается по времени с началом пролиферации и восстановления целостности тканей (продолжительностью от нескольких недель до нескольких месяцев), 4 фаза – фаза ремоделирования, берет свое начало на 3-4 неделе посттравматического периода и может растягиваться в зависимости от тяжести и объема поражения тканей до 2 лет [30].

Таблица 1 – Клетки, задействованные в заживлении кожной раны, и их функции

Вид клеток	Роль в заживлении	Основные медиаторы	Ссылки
1	2	3	4
Кератиноциты	Первичная защита Секреция аларминов и антимикробных пептидом (АМП)	MCP-1 IL-1 β , GM-CSF, TNF- α	[31]
Клетки Лангерганса	Мониторинг присутствия инфекционных агентов и повреждения эпидермиса Антиген-презентирующая функция	IL-2, IL-12, IL-23 IL-10	[29]
Дендритные клетки	Антиген-презентирующая функция с привлечением наивных Т-клеток	TNF- α , CXCL-10, IL-6	[32]
Тучные клетки	Вазодилатация Источник воспалительных медиаторов Рекрутинг нейтрофилов	Гистамин, лейкотриены, простагландины, протеазы, цитокины	[33] [34]
Нейтрофилы	Фагоцитоз и поглощение патогенов, тканевого детрита, продуктов деградации	TNF- α , IL-1 β , IL-1 α	[35] [36]
Моноциты / Макрофаги M1 /	Эффероцитоз Фагоцитоз / секреция провоспалительных	TNF- α / IL-1 β / IL-6 IL-10 / IL-R11	[37] [38]

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
Макрофаги M2	<p style="text-align: center;">цитокинов</p> <p style="text-align: center;">Секреция противовоспалительных цитокинов и стимуляция восстановления</p> <p style="text-align: center;">Реваскуляризация и реэпителизация раны</p>	<p style="text-align: center;">PDGF / FGF / VEGF</p> <p style="text-align: center;">TGF-β / TGF-α</p>	[39]
NK-клетки	<p style="text-align: center;">Цитотоксичность в отношении вирусов, бактерий и стареющих клеток</p> <p style="text-align: center;">Иммунорегуляторные клетки</p>	IFN- γ , TNF- α , IL-10	<p style="text-align: center;">[40]</p> <p style="text-align: center;">[41]</p> <p style="text-align: center;">[42]</p>
iNKT-клетки	Иммунорегуляторные клетки	IFN- γ , IL-4	[43]
ILC2-клетки	Активация макрофагов с фенотипом M2	IL-5, IL-13	[44]

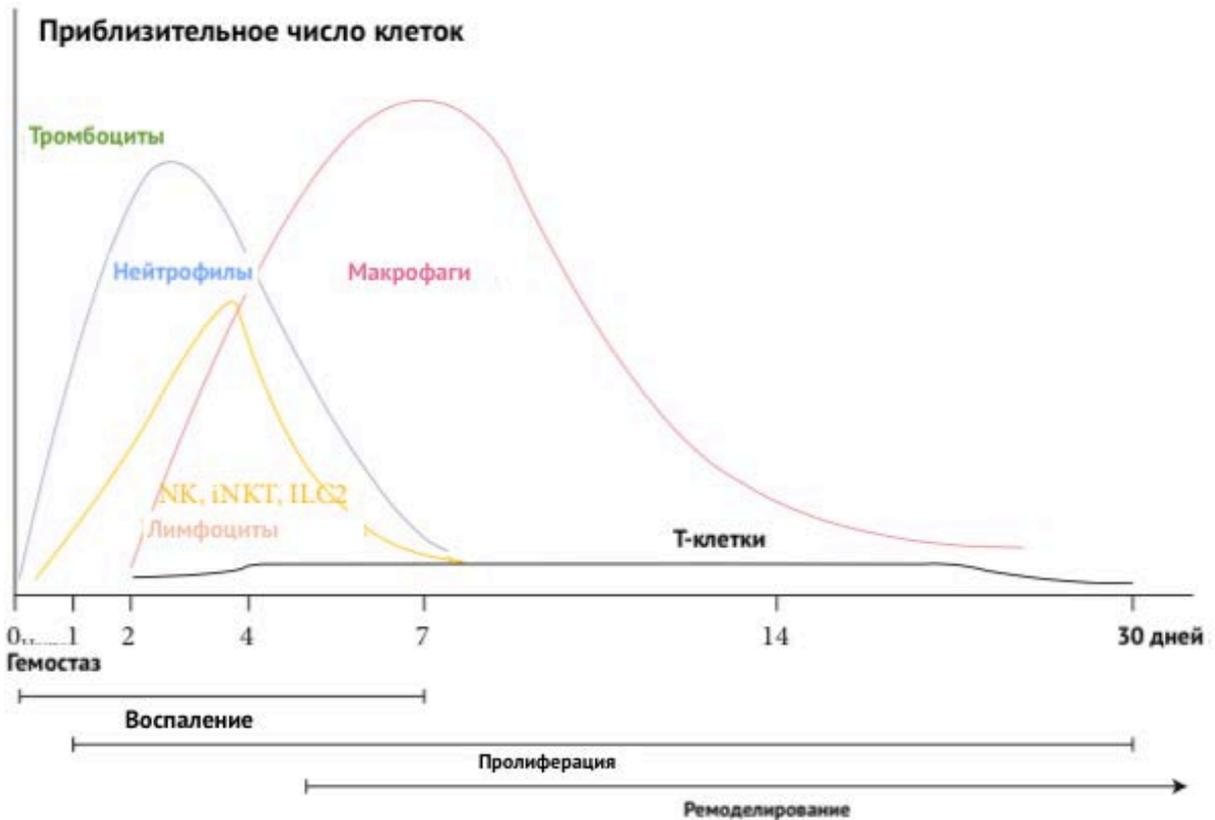


Рисунок 1 – Состав клеточных популяций в течение заживления кожной раны по [45] в редакции автора

Повреждение дермы сопровождается разрывом кровеносных сосудов и формированию кровотока [46,169]. В ответ происходит миграция и аккумуляция тромбоцитов в области кровотечения с активацией процесса тромбогенеза (рисунок 2). На инициальном этапе тромбогенез сопровождается активацией ферментов (факторов) свертывания, приводящих к образованию фибринового сгустка [47,169]. На этом этапе процесса ранозаживления происходит дегрануляция агрегированных тромбоцитов, высвобождение факторов роста и молекул хемотаксиса, таких как фактор роста опухолей бета 1 (TGF- β 1), PDGF и тромбоцитарный фактор 4 (PF4) [48].

На первом этапе в процесс вовлекаются также дендритные клетки и клетки Лангерганса. С помощью рецептора распознавания паттернов, клетки связывают молекулярные паттерны повреждения (DAMPs). Эти молекулы

связаны с клеточным повреждением и в отличие от патоген-ассоциированных молекул неотличимы от молекул организма-хозяина.

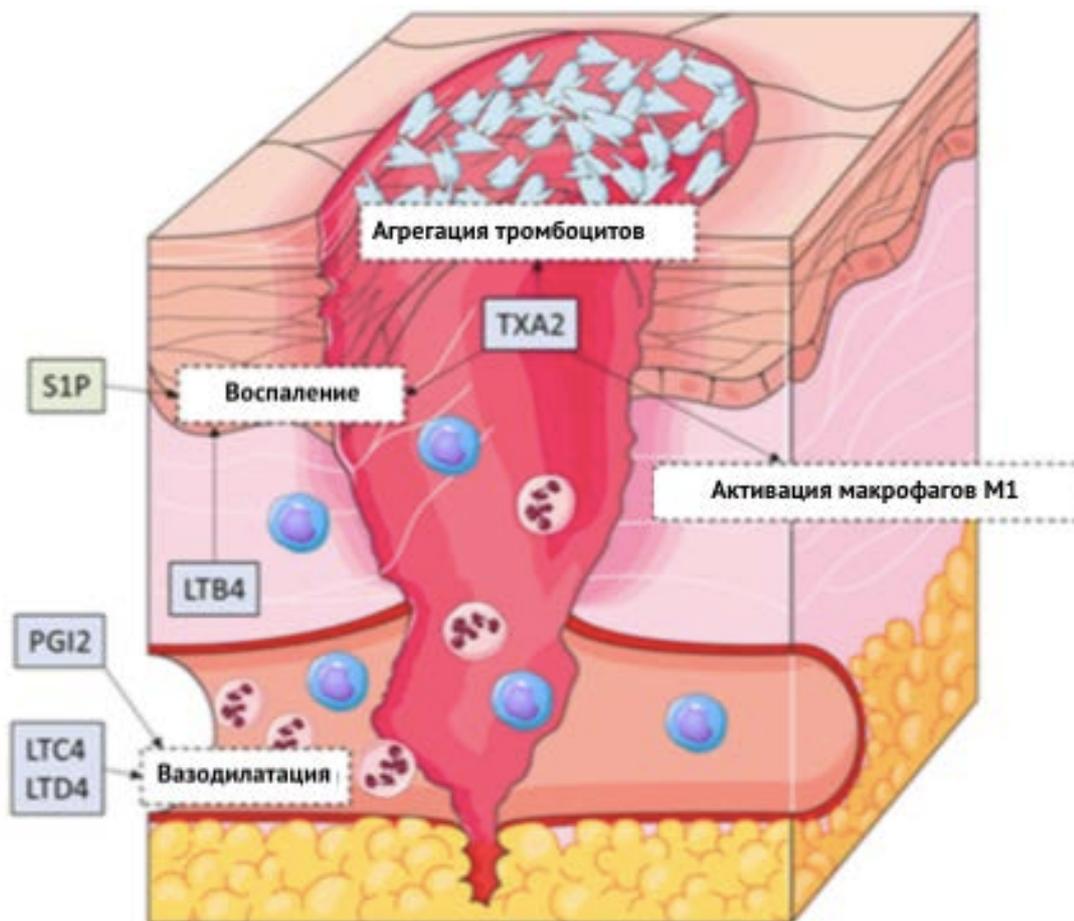


Рисунок 2 – Схематическое изображение гемостатической фазы раневого процесса по [45,169] в редакции автора

В результате кровеносные сосуды расширяются и повышается локальный кровоток. Расширение кровеносных сосудов и интенсификация локального кровотока, вызванная простагландинами, помимо прочего сопровождается лихорадкой и болевым синдромом. Белки плазмы, ее жидкая часть и клетки крови, включая макрофаги и нейтрофилы, выходят за пределы кровеносного русла. Нейтрофилы мигрируют к месту повреждения в силу хемотаксического градиента, создаваемого резидентными клетками кожи (дендритными клетками и клетками Лангерганса). Секреция нейтрофилами цитокинов и хемокинов активирует воспалительно-инfiltrативную

реакцию – вторую стадию раневого процесса [49,169], схематически представленную на рисунке 3.

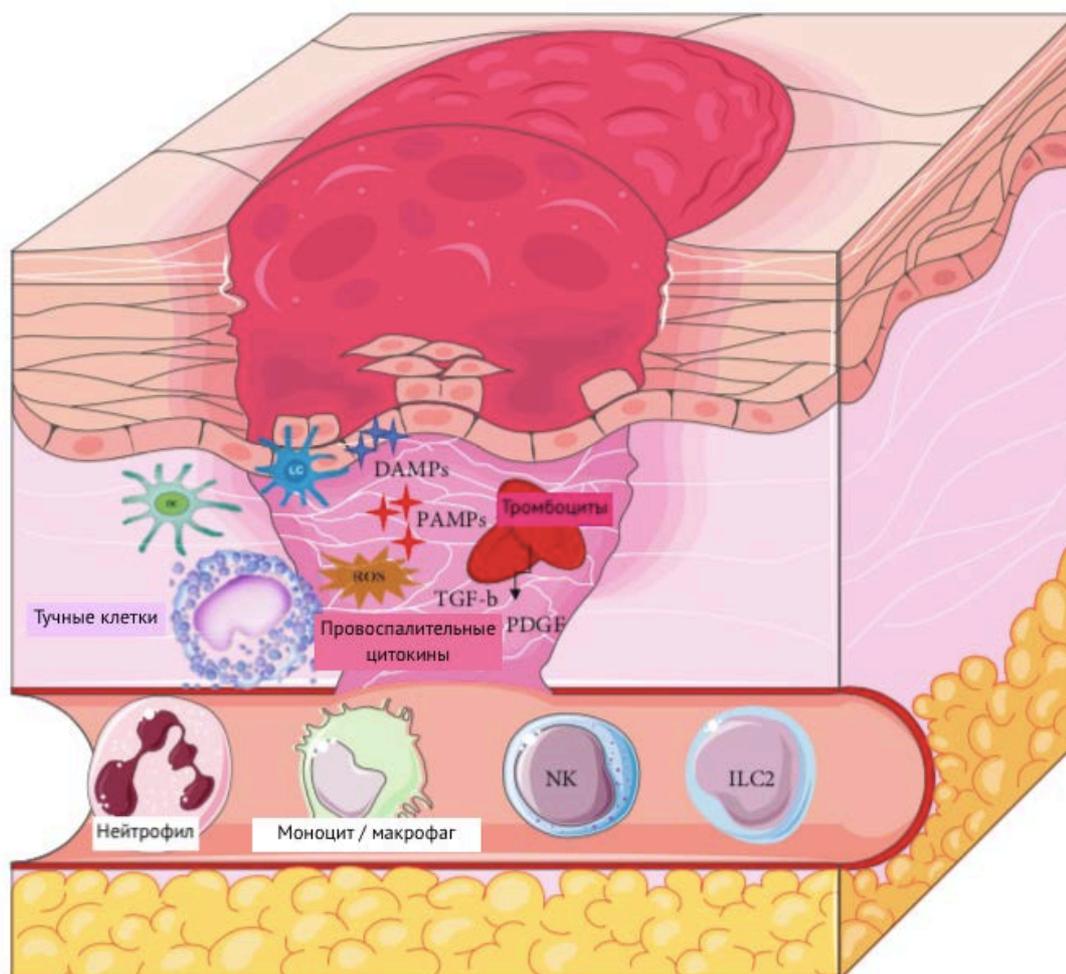


Рисунок 3 – Схематическое изображение воспалительной фазы раневого процесса по [45,169] в редакции автора

Эти клетки взаимодействуют с экстрацеллюлярным матриксом посредством интегринового сайта связывания и мигрируют в ложе раны [50,169]. Необходимо подчеркнуть, что качество и продолжительность воспалительного ответа определяют общий прогресс процесса ранозаживления кожной раны. Если персистенция воспалительной реакции продолжается длительное время, нарушается естественный ход заживления раны с последующим риском формирования хронических кожных язв [51].

Третья фаза раневого процесса (рисунок 4) помимо разрешения воспалительной реакции включает пролиферацию. В течение

пролиферативного процесса ткани, вовлеченные в ранозаживление, начинают восстанавливаться путем эффективного закрытия раневого дефекта, в том числе вследствие миграции кератиноцитов, покрывающих поврежденную поверхность [52,169]. Фибробласты дермы также мигрируют и принимают участие в закрытии кожной раны за счет своей локальной дифференцировки в миофибробласты и продукции необходимого объема экстрацеллюлярного матрикса [53, 54]. Ключевые события фазы пролиферации, следовательно, - образование внеклеточного матрикса, необходимого для созревания нового эпителиального барьера (реэпителизация), образование существенного кровоснабжения посредством активации и течения ангиогенеза, и укрепления поврежденных тканей – фиброплазия.

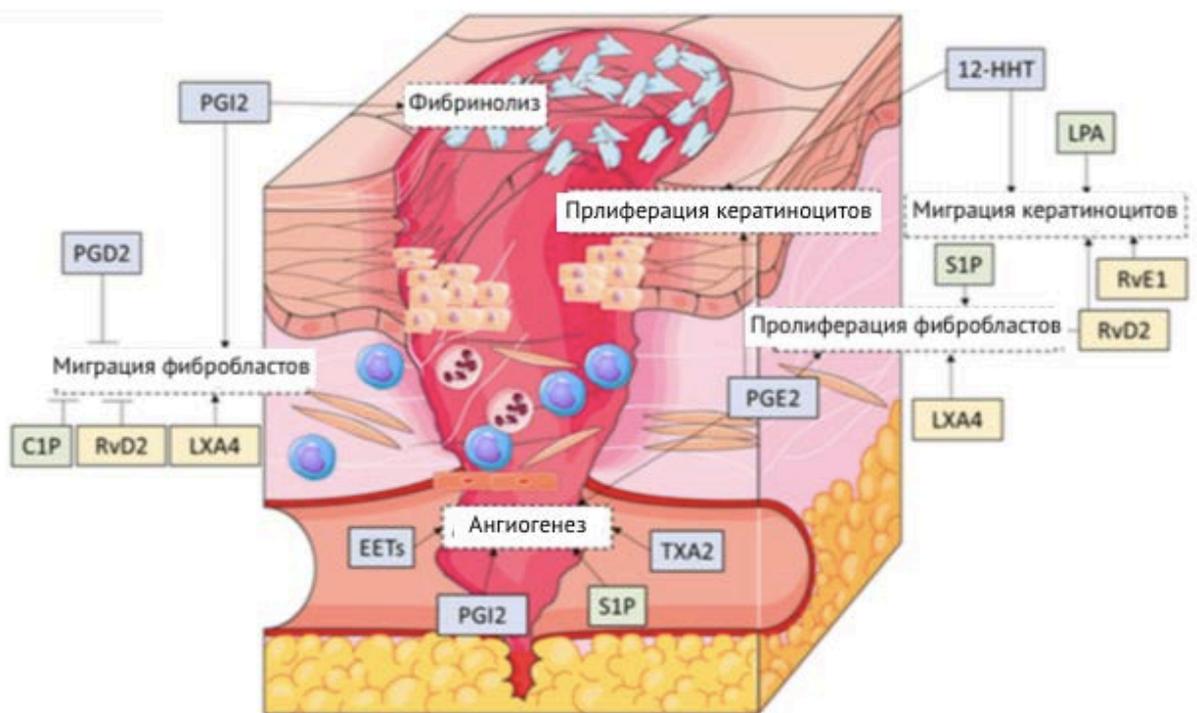


Рисунок 4 – Схематическое изображение фазы пролиферации и реэпителизации раневого процесса по [45] в редакции автора

Четвертая и заключительная фаза раневого процесса (рисунок 5)– фаза ремоделирования – главным образом включает изменение состава

внечелочного матрикса [55]. Именно в течение этой фазы область повреждения приобретает исходную (или близкую к исходной) прочность. Это становится возможным вследствие перераспределения качественной структуры коллагена – коллаген III типа частично деградирует и замещается вновь синтезированным коллагеном I типа. При этом критичным для баланса описываемого процесса – регуляция активаторов и ингибиторов тканевых металлопротеиназ (MMP) [56].

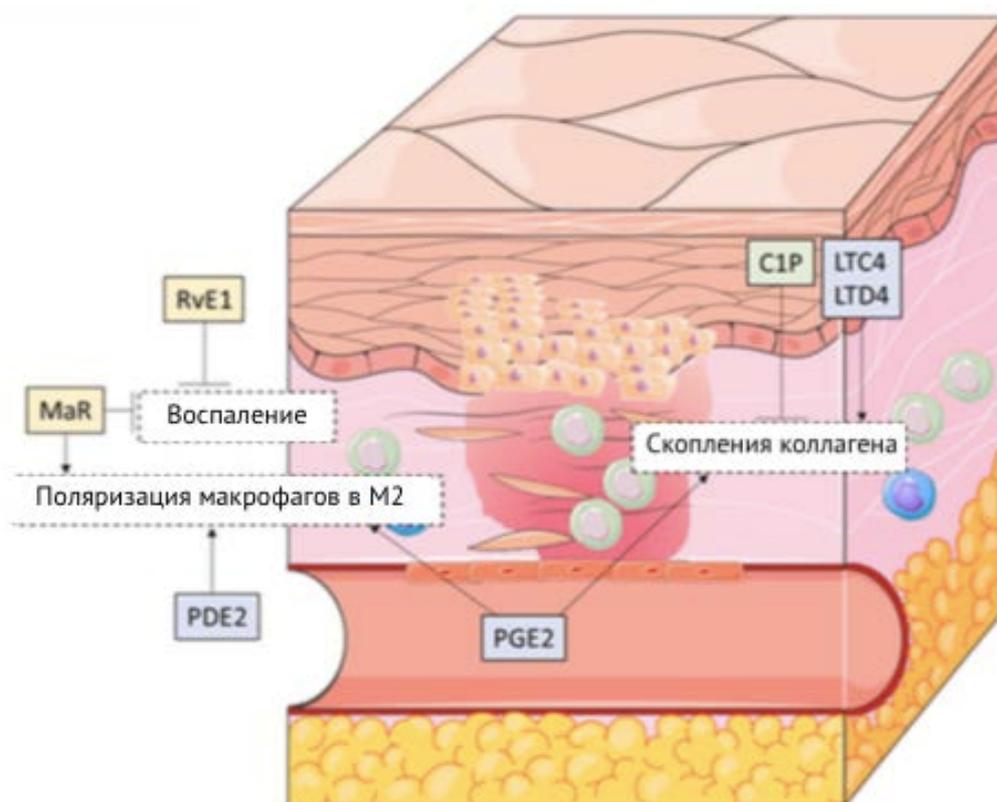


Рисунок 5 – Схематическое изображение фазы ремоделирования раны по [45] в редакции автора

1.2 Ответ резидентных клеток на кожное повреждение: роль в заживлении раны

Различные сигналы могут индуцировать активацию резидентных клеток кожи и рекрутинг циркулирующих клеток воспаления в область раневого процесса. Среди них: высвобождение аларминов, более известных

как ассоциированных с повреждением молекулярных факторов (damage-associated molecular patterns (DAMPs)), к которым относятся мочевая кислоты, ДНК, РНК, компоненты внеклеточного матрикса [57, 58]; выделение воспалительных медиаторов тромбоцитов в течение фазы гемостаза (PF4, CXCL8) [59]; продукция реактивных форм кислорода как иммунными, так и неиммунными резидентными клетками [60].

Активные формы кислорода ($O\cdot$, $OH\cdot$ и H_2O_2) играют решающую роль в немедленной активации тромбоцитов, привлечении лейкоцитов, кератиноцитов, а также миграции и пролиферации фибробластов [61, 62]. Резидентные клетки (кератиноциты, клетки Лангерганса, тучные клетки и макрофаги) распознают потенциальные патогены посредством множественных рецепторов распознавания сигналов (pattern recognition receptors (PRRs)), включая такие как toll-like рецепторы (TLRs), которые связываются с ассоциированными с патогенами сигнальными молекулами (pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)) [62]. Эти реакции запускают каскад сигнальных событий, которые, в свою очередь, стимулируют противомикробную защитную систему, продукцию провоспалительных цитокинов клетками воспаления [63].

Множество иммунных клеток оказываются мобилизованными в ответ на тканевое повреждение кожи (рисунок 3). Большинство из них способны к продукции цитокинов и факторов роста в течение нормального и нарушенного процесса заживления кожной раны. Помимо прочего, способность резидентных клеток кожи активно коммуницировать с привлеченными в очаг повреждения клетками отражает уникальность построения иммунной системы кожи человека.

Необходимо подчеркнуть, что хрупкий баланс между естественным и избыточным течением воспалительной реакции во-многом определяет ответ кожи на тканевое повреждение. В ряде случаев длительное присутствие клеток воспаления – нейтрофилов, провоспалительных макрофагов, продуцирующих локальные воспалительные медиаторы, способствует

трансформации раневого процесса в хроническую фазу [64], что обуславливает необходимость эффективного контроля процесса ранозаживления как хирургического состояния для определения клинических исходов тканевого повреждения и индукции репарации и ремоделирования.

1.3 Роль отдельных клеточных популяций в ранозаживлении

Как мы уже говорили, широкий спектр клеток определяет и участвует в процессе эволюции кожной раны, при этом каждая клеточная линия выполняет свою строго детерминированную функцию. Кооперация клеток осуществляется посредством сложной системы межклеточной рсигнализации.

1.3.1 Кератиноциты и продуцируемые ими молекулы в заживлении кожной раны: применение в хирургии

Кератиноциты – одна из наибольших по численности клеточных популяций эпидермиса, участвующая как в механической, так и иммунной защите кожи от внешних факторов [65]. Они – своего рода стражи организма, распознающие микробные патогены и физико-химические воздействия [66]. В ответ на нарушение целостности кожи они высвобождают медиаторы и участвуют затем в активации резидентных иммунных клеток кожи, таких как тучные клетки, дендритные клетки, клетки Лангерганса, а также способствуют привлечению нейтрофилов и макрофагов в область повреждения [67]. Кератиноциты способны вырабатывать и продуцировать в окружающую среду множество медиаторов: цитокинов (IL-1, TNF- α , IL-6 и IL-10), хемокинов (CXCL- 8, CXCL1), факторов роста (TGF- β , GM-CSF, PDGF и VEGF), антимикробных пептидов (AMP), таких как β -дефенсины 2, 3, 4, кателицидины, и протеины семейства S100.

AMP – пептиды, состоящие из последовательности 12-50 аминокислот, и имеющие так называемую амфипатическую структуру, т.е. содержащие в

своем составе как гидрофильные, так и гидрофобные участки, обладающие выраженной антимикробной активностью [68]. Природные и синтетические АМР довольно широко используются в последнее время для борьбы с бактериальными инфекциями [69]. Они модулируют противоинфекционный тканевой ответ в процессе заживления кожного дефекта [70].

Например, было показано, что низкомолекулярный пептид АМР 17 способен модулировать процесс ранозаживления на экспериментальной модели кожной раны у лабораторных мышей с дефектом кожи, проникающим до мышечного слоя [71]. На описываемой модели, АМР 17 индуцировал привлечение макрофагов в область повреждения и секрецию TGF- β фибробластами наряду с усилением миграции и пролиферации кератиноцитов и фибробластов [71]. Другие подобные пептиды – эпинецидин-1 и SR0379 могут способствовать повышению синтеза коллагена фибробластами в течение фазы ремоделирования [72].

Помимо АМР, в качестве аларминов могут выступать и другие молекулы, например вырабатываемые кератиноцитами кератины: так KRT6, KRT16 и KRT17, продуцируемые стрессовыми кератиноцитами в супрабазальном слое эпидермиса, свидетельствуют о высоком активированном фенотипе указанных клеток в течение процесса патологического повреждения и последующей репарации [73]. Кератины реализуют свою патофизиологическую функцию посредством регуляции местных наследственных иммунных реакций, а также оптимизации свойств кератиноцитов, таких как адгезивность, сохранение механической целостности / устойчивости к патологическому воздействию, пролиферативный потенциал [74, 75].

Одним из перспективных хирургических подходов к лечению кожных ран в последнее время стало применение повязок с применением кератинов. В качестве примера можно привести успешное применение в эксперименте на лабораторных мышях с инсулинзависимым сахарным диабетом биосовместимой повязки на основе биodeградируемого содержащего кератин

порошкового покрытия (fur keratin-derived powder (FKDP)) [76]. При сравнении с группой нелеченных животных использование кератин-содержащего порошка приводило к формированию значимого противомикробного эффекта и статистически достоверно сокращало время закрытия раневого дефекта.

1.3.2 Фундаментальное и хирургическое значение клеток Лангерганса и дендритных клеток в заживлении кожной раны

Клетки Лангерганса составляют от 2 до 4% клеточной популяции эпидермиса. Они способны приобретать фенотип дендритных клеток и реализовывать миграционный фенотип, а также активировать Т-клетки [77]. В ответ на травматическое повреждение клетки Лангерганса ориентируют свои дендриты вертикально через толщу эпидермальных плотных контактов и улавливают антигены посредством дендритных окончаний [78]. После фазы распознавания антигена клетки Лангерганса подавляют собственную экспрессию Е-катгерина (которая в норме обеспечивает их физиологический контакт с кератиноцитами) [79] и приобретают способность мигрировать через дермо-эпидермальные контактные соединения и разрушенный под действием локально высвобождаемых и активизированных матриксных металлопротеиназ 2 и 29 межклеточный матрикс [80].

Миграция клеток Лангерганса происходит из эпидермиса через дерму в регионарные лимфатические узлы, где происходит активация Т-клеточного адаптивного ответа на повреждение и антигенную агрессию [81, 82]. Этот процесс регулируется хемокинами, секретируемыми в области раневого дефекта.

Совместно с дермальными дендритными клетками клетки Лангерганса представляют собой основную антиген-презентирующую популяцию клеток кожи, ответственную за инициацию иммунного ответа. Помимо этого, указанные клеточные популяции демонстрируют также выраженную

функциональную пластичность, поскольку выступают как толерогены в связи с тем, что продуцируют IL-10, который, в свою очередь, индуцирует и активирует пролиферацию резидентных Т-регуляторных клеток, локализованных в коже [84].

В поврежденной и воспаленной коже эндогенные алармины и цитокины, продуцирующиеся кератиноцитами, такие как протеин хемоаттракции моноцитов 1 (monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)), другие провоспалительные сигналы, такие как PAMP, могут активизировать рекрутинг, индукцию и созревание клеток Лангерганса. Вследствие этого повышается Т-клеточная стимулирующая способность и экспрессия молекул главного комплекса гистосовместимости (MHC II) [85].

Позитивная роль клеток Лангерганса в заживлении кожной раны была показана у пациентов с хроническими язвами и диабетической стопой [86]. Так, в частности, повышение популяции клеток Лангерганса прямо ассоциировалось с лучшими клиническими исходами с точки зрения инфицирования и ранозаживления [87].

Дендритные клетки кожи представляют собой довольно гетерогенную клеточную популяцию, классифицируемую на конвенциональные и неконвенциональные дендритные клетки. Вторые, так называемые, плазмоцитоидные клетки, отличаются по происхождению и специфическим функциям [88]. Как и их аналоги клетки Лангерганса, главная функция дендритных клеток – доставка и презентирование антигена CD8 и CD4 Т-клеткам, что играет важнейшую роль в формировании ответной реакции на тканевое повреждение и обеспечение адекватной защиты тканей и организма [89]. Доказательства роли дендритных клеток в закрытии раневой поверхности были получены на основе установления взаимодействия между ними и эпителиальными клетками роговицы на модели заживления язвы роговицы у трансгенных по В6-дифтерийному рецептору мышей деплетированных по субпопуляции дендритных клеток [90].

В роговице после инъекции дифтерийного токсина наблюдалось нарушение ранозаживления и пролонгированная экспрессия CXCL10, тимического стромального лимфопоэтина (TSLP), IL-1, IL-1Ra по сравнению с животными контрольной группы, которым вводили изотонический 0,9% раствор хлорида натрия.

Эти результаты позволили также идентифицировать дополнительные функциональные возможности дендритных клеток по взаимодействию с соседними эпителиальными клетками для поддержания тканевого гомеостаза и восстановления.

В случае с ожоговыми ранами, разрушенные дерма и эпидермис создают условия для чрезвычайно высокой восприимчивости кожного дефекта к инфекционному поражению [91]. На экспериментальной модели у CD11c-DTR трансгенных лабораторных мышах, деплетированных по дендритным клеткам, было показано замедление ранозаживления и формирования грануляционной ткани при сравнении с животными контрольной группы [92]. Исследование показало, что дендритные клетки, появляющиеся в области раны через 4 суток после ожогового поражения участвуют в ускорении ранозаживления путем активации пролиферации фибробластов и продукции TGF- β без избыточного синтеза коллагена и формирования келоидного грубого рубца.

Необходимо отметить, что оба типа клеток – и клетки Лангерганса и дендритные эпидермальные клетки способны продуцировать лангерин – рецептор лектина С-типа [93]. Абляция лангерин-позитивных клеток на мышинной модели у трансгенных животных приводила к активации ранозаживления глубокой кожной раны вследствие ускорения образования неоэпидермиса и формирования грануляционной ткани [94].

1.3.3 Значение тучных клеток в заживлении кожной раны: межклеточное взаимодействие и антимикробные свойства

Тучные клетки имеют миелоидное происхождение и играют большую роль в поддержании структурно-функционального единства кожи как в норме, так и при патологических состояниях. Они широко представлены в барьерных органах, и, в частности, в коже, где на их долю приходится от 2 до 8% всей клеточной популяции [95]. После своего открытия в конце XIX века они являются объектом самого пристального изучения. В том числе изучается и участие этих клеток в развитии патологических процессов.

Хотя тучные клетки одними из первых реагируют на повреждение кожи, до сих пор широко дискутируется значение клеток в ранозаживлении. В течение суток после повреждения тучные клетки накапливаются в области раневого дна, причем их количество прямо коррелирует с концентрацией МСР-1, продуцируемого резидентными кератиноцитами и макрофагами [96]. Более того, уже когда нейтрофилы и лимфоциты полностью исчезают из области раневого дефекта в течение фазы ремоделирования тучные клетки все еще остаются там, доказывая, что они участвуют в реализации всех фаз раневого процесса [97].

В ответ на кожную травму тучные клетки выделяют свои цитоплазматические гранулы, содержащие гистамин, серотонин, химазы, триптазы. Они также продуцируют разнообразные цитокины и медиаторы воспаления, такие как TNF- α и IL-1, а также факторы роста – TGF- β 1 и PDGF [98]. Гистамин и фактор роста эндотелия сосудов способствуют расширению капилляров и проникновению в области патологического процесса нейтрофилов и макрофагов, а также дополнительных тучных клеток (рисунок 6).

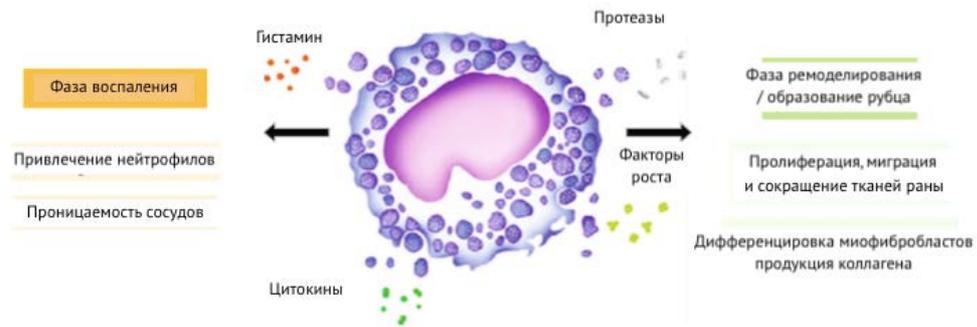


Рисунок 6 – Роль тучных клеток в процессе заживления кожной раны по [45] в редакции автора

Помимо этого, медиаторы, вырабатываемые тучными клетками, стимулируют продукцию провоспалительных агентами клетками-резидентами, что привлекает в пораженную область дополнительные клеточные популяции, активирует пролиферацию эндотелиальных клеток и реваскуляризацию раневой области [99, 100].

Однако, исследования последних лет показали, что взаимодействие между тучными клетками и фибробластами могут наблюдаться и в здоровой коже, при этом гистамин, TGF- β 1 и некоторые сериновые протеазы могут индуцировать пролиферацию фибробластов и продукцию коллагена в неповрежденной коже. Эта находка послужила основанием полагать возможность участия тучных клеток в формировании фибротического тканевого ответа на повреждение [101].

Для подтверждения участия тучных клеток в заживлении кожной раны были проведены эксперименты на трансгенных WBB6F₁-Kit^{W/W-v} и C57BL/6-Kit^{W-sh/W-sh} животных, лишенных тучных клеток [102]. Было установлено, что отсутствие тучных клеток в течение первых 6 суток после повреждения нарушало заживление раны, снижало экстравазацию и привлечение нейтрофилов в раневое ложе [103]. Адаптивный трансфер тучных клеток в параллельной группе в область раны восстанавливал естественный ход патологического процесса.

Другое обстоятельство, ассоциированное с тучными клетками, также имеет непосредственное отношение к заживлению кожной раны. В

частности, способность клеток вырабатывать антимикробные пептиды и формировать экстрацеллюлярные ловушки микроорганизмов [104-106]. Этот процесс был впервые описан для нейтрофилов (NETosis) [107, 108], при этом была показана значительная роль механизма в заживлении кожной раны. Также это свойство описано и для макрофагов (METosis) [109]. Описываемые ловушки представляют собой внеклеточные структуры, состоящие из гранулярных и ядерных компонентов, способных активироваться и убивать микроорганизмы за пределами клеток [107]. Однако, было установлено, что избыточная активация этого процесса, в особенности у нейтрофилов, может послужить источником затягивания ранозаживления вследствие индукции воспалительной фазы процесса [110, 111].

Вместе с тем, установлено, поскольку тучные клетки продуцируют большое количество различных по своей функциональной активности медиаторов, этот тип клеток может быть вовлечен и в нарушение процесса заживления кожной раны, в частности, его фазы ремоделирования. Это было показано на модели хронической незаживающей кожной раны в присутствии избыточного количества тучных клеток [112].

Также ряд ферментов, вырабатываемых тучными клетками, может быть вовлечен в стимуляцию пролиферации фибробластов и дифференцировку миофибробластов, что ведет к избыточной продукции коллагена I, коллагена III и других компонентов внеклеточного матрикса, наблюдаемого в грубых келоидных рубцах [113-116].

Следует отметить, что заживление раны у грызунов фундаментально отличается от такового у человека, главным образом, за счет преобладания сокращения тканей. Однако, в ряде случаев установка специальных ограничителей по периметру раны может обеспечить человекоподобное течение ранозаживления, зависящее от эпителизации, клеточной пролиферации и ангиогенеза [117, 118]. Использование подобных моделей

также позволило идентифицировать ряд особенностей участия тучных клеток в эпителизации, образовании фиброзного рубца [119].

Было показано, что применение ингибиторов тучных клеток, таких как кромогликат натрия, способствует уменьшению размеров фиброзного компонента в рубце и улучшению его косметических свойств, при этом также страдал и процесс реэпителизации за счет снижения продукции ряда биологически активных молекул [120]. Использование кромогликата натрия и кетотифена у йоркширских свиней также продемонстрировало ингибирование фибропролиферации и образования пересокращенного рубца [121]. Что также показало важную роль тучных клеток в раневом процессе.

1.4 Современные направления развития технологий ранозаживления

В настоящее время лечебные опции для применения в клинической практике при возникновении острых или хронических кожных дефектов включают биологические методы, например, противомикробные молекулы иммунного происхождения (дефенсины), терапевтические микроорганизмы (бактериофаги и пробиотики), ранозаживляющие агенты и стимуляторы регенерации (кератиноиды, биофлавоноиды и др.), применение стволовых клеток, использование хирургических тканеинженерных конструкций. Помимо перечисленных подходов могут применяться небιологические методы лечения, такие как реактивные формы кислорода (перекись водорода), образователи окиси азота, различные топические антисептики и антибиотики, воздействие отрицательным давлением, ультразвуковая терапия, а также традиционные оперативные методы – хирургическая обработка раны и ее очистка от некротических и загрязненных тканей, пересадка кожи [122-124].

1.5 Использование различных наноматериалов для лечения кожных раневых дефектов

Лечение, направленное на профилактику вторичных инфекционных осложнений и стимуляцию регенерации кожной раны, представляет собой сложную, комплексную и не решенную до настоящего дня медицинскую задачу. Для активации и стимуляции ранозаживления, как мы уже упоминали выше, могут применяться как локальные, так и системные терапевтические и хирургические воздействия. В то же время, местному лечению, по мнению исследователей и практикующих специалистов в этой предметной области, необходимо отдавать предпочтение вследствие отсутствия системных нежелательных эффектов, направленного и концентрированного воздействия на патологически измененную область и профилактики резистентности микроорганизмов в случае формирования вторичных инфекционных осложнений кожной раны [125].

Многочисленные исследования демонстрируют высокий ранозаживляющий потенциал применения с лечебной целью фармакологических агентов в виде наночастиц. Их использование позволяет стимулировать регенерацию, предотвращать присоединения вторичной флоры в раневой процесс [122, 124].

При повреждении целостности кожного покрова теряется его барьерная функция, в связи с чем даже топически применяемые лекарственные вещества могут вызывать формирование системных реакций вследствие их абсорбции в циркуляцию. Следовательно, при планировании оценки эффективности и безопасности использования наночастиц лекарственных веществ в комплексном лечении кожных повреждений должна учитываться цитотоксичность эукариотических человеческих клеток и возможное системное действие фармакологических агентов. Помимо этого, необходимо учитывать период полувыведения наноматериалов из области нанесения с учетом частоты и объема обработки раны [122, 124].

1.5.1 Ядерно-оболочечные наночастицы и поверхностная наноинженерия: эффективность применения при раневом процессе

Современный технологический уровень развития медицинской техники позволяет синтезировать наночастицы различного размера, формы и структуры. Наиболее широкое применение нашли частицы размером от 10 до 100 нм, имеющие грубо говоря сфероподобную структуру [126]. При этом источником самого наноматериала могут быть как органические, так и неорганические молекулы, например металлы. По структуре типичное строение наночастицы включает ядро, состоящее из молекул или атомов вещества, и поверхностную оболочку, определяющую стабильность и, во многом, функции наночастиц [127]. При этом, следует особо подчеркнуть, что тип наноматериала, его состав, размер самих частиц наряду с объемом и площадью повреждения кожи определяют особенности взаимодействия с клетками-мишенями и, в конечном счете, лечебный успех применения данной технологии [128].

Помимо структуры, наночастицы делятся на фармакологически активные формы и наночастицы – носители активных соединений, таких как стимуляторы регенерации, противомикробные вещества, средства по контролю за воспалительной реакцией. При этом, важно, что носительство подразумевает возможность направленной доставки действующего вещества, оптимизацию его фармакокинетики и фармакодинамики, в том числе повышение местной эффективности на фоне ограничения частоты формирования нежелательных эффектов [129]. Такие наночастицы в последнее время в научной периодике часто называют наноботами. Они могут быть органического (липиды, сурфактант), углеводного (целлюлоза) или неорганического (силикаты, металлические) происхождения [129-132]. Активное вещество также может быть введено в структуру оболочки наночастицы, что и послужило основой названия «ядерно-оболочечные наночастицы» [133].

Следует заметить, говоря об этом типе наночастиц, что одним из обстоятельств, требующих внимательного отношения, являются токсические свойства элементов ядра. В этом случае оболочка наночастицы должна в том числе ограждать окружающие ткани от токсического влияния действующего вещества, обеспечивать своевременное его высвобождение, способствовать трансформации в нетоксическую, неаллергенную и неиммуногенную форму, контролировать высвобождение активного агента именно в тот период раневого процесса, когда это необходимо и определяется лечебной стратегией [129, 133].

Также, необходимо обратить внимание, что одной из целей применения наноматериалов на поверхности кожной раны является, помимо прочего, активность по предотвращению формированию биопленки, служащей прекрасной средой для заселения и размножения патогенных микроорганизмов. Поэтому идея таких наночастиц в том, чтобы профилактировать образование бактериальных пленок либо за счет пассивного действия, либо вследствие контролируемого выделения противомикробных агентов. Последние литературные данные свидетельствуют о прогрессе медицинской науки в этом направлении [134, 135].

1.5.2 Карбоновые наноматериалы в хирургии кожной раны

Привлекательность карбоновых наночастиц для клинической медицины обусловлена их широкой физико-химической пластичностью. К карбоновым наночастицам относятся нанотрубки, графены, карбоновые точки и др.

Термин карбоновые доты (Carbon dots, CD) – это общее понятие, объединяющее широкий спектр карбоновых наночастиц, таких как графен, полимеры, палочки, трубочки и фуллерены. Существует довольно уже

большой набор методов, позволяющих создать все эти формы, и снабдить их формами биологически активных веществ [136].

Карбоновые квантовые доты (Carbon quantum dots, CQD) – одно из последних мировых технологических достижений, связанных с изготовлением мельчайших форм карбоновых наночастиц. В экспериментальных исследованиях у этих частиц были доказаны противомикробные и антиплечные свойства [136]. Их получение на основе хитозаново-декстранового гидрогеля показало высокий ранозаживляющий эффект [137] вследствие редукции активности воспалительного процесса и промоции репаративных процессов в раневом ложе за счет образования грануляционной ткани и синтеза коллагена.

Карбоновые нанотрубочки представляют собой один из наиболее предпочтительных видов наночастиц. Их специфическая большая поверхность позволяет разместить лидо в полости, либо на поверхности необходимые концентрации действующего вещества. Рациональная модификация размеров и формы нанотрубок позволяют улучшить инкапсуляцию лекарства, его стабильность, редуцировать высвобождение и клеточную и тканевую токсичность действующего вещества [138, 139].

В исследовании Chen и соавт. было показано, что применение микросфер, заполненных карбоновыми / хитозановыми нанотрубочками с изониазидом, для лечения вторичных кожных ран у минипигов с костным туберкулезом стимулирует ранозаживление за счет индукции регенерации и повышения популяции Т-клеток [140].

В другом исследовании на экспериментальной модели кожной раны у мышей применение сложной конструкции на основе одностенных и многостенных комплексов карбоновых и хитозановых трубок было продемонстрировано индукцию реэпителизации раны с одновременным снижением частоты формирования грубой фиброзной ткани [141]. Santos коллегами установил, что применение конъюгатов поливинил-алкоголя,

глюкооксидазы и наноуглеродных трубок позволяет активировать процесс ранозаживления [142].

Необходимо особо отметить, что функциональным преимуществом применения карбоновых нанотрубочек перед другими неметаллическими частицами в процессе заживления кожной раны является поддержание высокого миграционного потенциала клеток при использовании этой формы наночастиц, инкорпорированных в гидрогели. Биомедицинское применение гидрогелей, полученных на основе природных полимеров, при этом обеспечивает высокую биосовместимость, биodeградацию, оптимальные механические свойства, гидрофильность и пористость [143].

Интересные результаты были получены в исследовании [144], в котором авторы инкорпорировали многостенные карбоксильные функционально-оптимизированные углеродные нанотрубки диаметром 50-80 нм в композитный гликоль-хитозановый гидрогель. Указанный гидрогель с наночастицами в большей степени рекрутировал фибробласты, чем в отсутствие частиц. Кроме того, наблюдалась более активная клеточная миграция. Было также показано, что указана наноконструкция может выступать как область локальной адгезии клеток, которые реализуют свойства прикрепления, таких как фибробласты. Кроме того, было показано, что полученные преимущества такой лечебной стратегии обусловлены в том числе и оптимальными размерами наноконструктов, имеющих большое пространственное сходство с природными полимерами – коллагеном, эластином и др.

Графен – это углеродный матрикс, состоящий из однослойной или двумерной сетки, дающей большую площадь соприкосновения, высокую тепло- и электропроводность, высокую механическую прочность и отличную биосовместимость [145]. Графен может быть инкорпорирован в гидрогели для улучшения их механических свойств, повышения пористости, что, в свою очередь, стимулирует дополнительную абсорбцию воды. Графен-содержащие гидрогели за счет высокой биосовместимости индуцируют

клеточную адгезию и рост. В этой связи указанные наноматериалы способны ускорять ранозаживление вследствие оптимизации влажностного баланса в раневом ложе [146].

Fan и соавторы показали, что графеновый нанокompозит с серебром обладает высокой ранозаживляющей активностью на модели кожной раны у крыс [147]. Коллоидный раствор оксида графена, приготовленный из графита затем выдерживался в растворе серебра различных концентраций. Нанокompозит, помещенный в хитозановый гидрогель, значительно ускорял реэпителизацию раны, демонстрировал выраженные антимикробные свойства в отношении химиорезистентных штаммов *E. coli*, *S. aureus*.

Fu и коллеги на модели стрептозотоцинового диабета воспроизводили кожную рану у мышей. Наночастицы оксида графена были инкорпорированы в лишенный клеток матрикс и показали прекрасные результаты в качестве механизма направленного транспорта мезенхимальных стволовых клеток для лечения кожного дефекта [148].

В другом исследовании исследователи обработали желатин свиного происхождения метилакриловым ангидридом с получением пористого белого пеноподобного преполимера. В последующем этот полимер обработали графеновым порошком под действием ультрафиолета для формирования связей. Полученный гидрогель с большим размером пор (около 50 мкм) усиливал миграционную способность фибробластов, эндотелиальных клеток и кератиноцитов на модели кожной раны [149].

Tang с соавторами показали высокий ранозаживляющий потенциал полидофамин-редуцированного наноматериала из оксида графена, инкорпорированного в скаффолд из хитозана и фиброина шелка, на модели кожной раны у крыс Sprague-Dawley [150]. Скаффолд проявлял хорошие механические, электроактивные и антиоксидантные свойства. При этом, необходимо подчеркнуть, что оксид графена служил в качестве механического уплотнителя полученного скаффолда и придавал ему дополнительные прочностные свойства.

Равномерно распределенный в скаффолде оксид графена обеспечивал оптимальную электропроводность бионаноматериала и выступал в качестве ловушки реактивных форм кислорода, проявляя свойства антиоксиданта. При сравнении с контрольной группой животных применение оксида графена позволяло на 25% увеличивать скорость закрытия кожного дефекта, начиная с 7 суток наблюдения.

1.5.3 Наноматериалы металлов и металлоидов как перспективные стимуляторы ранозаживления

Ряд металлов в течение веков применялся для лечения ран и проявлял защитные свойства в отношении патогенных микроорганизмов [151]. Наночастицы, основанные на металлах и металлоидах и их соединениях в последнее время нашли широкое распространение в медицине: они применяются в диагностике, медицинской визуализации, доставке лекарственных средств и в качестве противомикробных и ранозаживляющих агентов [152, 153]. За счет своих уникальных свойств – высокого соотношения площади поверхности к объему и поверхностноактивных свойств, металло-содержащие наночастицы имеют значительные преимущества перед обычными солями металлов и металлическими сплавами. В этой связи накоплен довольно большой объем данных о способности металлосодержащих наночастиц активировать регенерацию и реэпителизацию, проявлять бактерицидные свойства в отношении отдельных колоний микроорганизмов и бактерий-пленкообразователей и др. [154-158].

Для создания оптимальных форм применения наноматериалов в хирургии кожной раны могут быть использованы различные матрицы – поливинил алкоголь, хитозан, поликапролактон, целлюлоза и другие [159, 160].

В этой связи настоящее исследование, посвященное поиску потенциального пути оптимизации лечения кожной раны на основе

топического применения наночастиц оксида металла из группы лантоноидов – церия – является безусловно своевременным и актуальным, и, с нашей точки зрения, позволит обосновать эффективность и безопасность применения данного перспективного метода в хирургической клинике.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кожный раневой процесс – это сложный и многоэтапный эволюционный процесс восстановления целостности поврежденных тканей на основе комплекса молекулярных, клеточных и тканевых взаимодействий. Вектор его развития определяется сочетанием природы, объема и глубины поражения кожи, внутренних факторов макроорганизма, и факторов внешней среды, воздействующих на кожный дефект на протяжении его закрытия. В этой связи хирургическое лечебное воздействие представляет собой один из таких внешних факторов, направленный на оптимизацию локального раневого процесса и коррекцию негативных внешних факторов, осложняющих или затрудняющих ранозаживление.

Основной целью нашей работы явилось экспериментально-хирургическое обоснование эффективности применения гидрогеля на основе наночастиц оксида церия для лечения неосложненной кожной раны.

Как известно, помимо оперативных методов хирургического лечения ран кожи – обработки кожной раны, ее ушивания, пересадки кожных лоскутов, – в комплексе интервенций важное значение принадлежит применению биологических, химических, механических и фармакологических воздействий, направленных на восстановление естественной барьерной функции кожи с сохранением максимально удовлетворительных косметических результатов лечения.

Все это делает разработку новых и / или оптимизацию существующих подходов к хирургии кожной раны комплексной и междисциплинарной проблемой, требующей в своей методологической основе привлечения методов молекулярной биологии, биохимии, органической и физической химии, фармакологии, биомеханики и биоинженерии. Именно этот принцип был положен в построение методологического фундамента настоящего диссертационного исследования, сочетающего в себе основополагающие элементы гносеологической теории познания – сочетания единства научного

замысла и поставленных цели и задач, комплексного подхода к их решению, использования необходимой и достаточной доказательной базы для каждого положения диссертации.

2.1 Соблюдение принципов биоэтики при проведении эксперимента с использованием лабораторных животных

Настоящая диссертация представляет собой экспериментально-хирургическое исследование, выполненное с использованием в качестве объекта исследования лабораторных животных двух видов – крыс линии Sprague-Dawley и минипиггов. Целесообразность привлечения двух видов животных обосновывается тем, что лабораторные грызуны – крысы – являются наиболее удобным объектом для воспроизведения данного типа экспериментальной патологии, в международной научной периодике имеется большой массив статей, описывающих как способ моделирования кожной раны на этом виде грызунов, так и клиническую и молекулярно-генетическую характеристику этапов раневого процесса при его осложненном и неосложненном течении.

Выбор минипиггов для воспроизведения неосложненного дефекта кожи был обусловлен необходимостью подтверждения полученных в опытах на грызунах выводов в условиях, наиболее приближенных к реальной клинической практике, то есть на животных, с биологической точки зрения близко стоящих к человеку. Хорошо известно, что у грызунов, в отличие от человека и свиньи, закрытие кожного дефекта на 2-3 этапах ранозаживления во-многом обусловлено ретракцией краев раны вследствие дифференцировки фибробластов в миофибробласты.

Исследования в рамках диссертационной «Оптимизация заживления операционных ран после реконструктивных вмешательств на коже в эксперименте» (исполнитель – Сухов Андрей Владимирович) одобрено на заседании Локального этического Комитета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им.

И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет, протокол заседания № 03-23 от 16.02.2023).

Содержание, обращение и контроль за состоянием лабораторных грызунов и минипиггов осуществлялся при неукоснительном соблюдении стандартных операционных процедур научной лаборатории с экспериментальной операционной кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), а также требований следующих международных и российских нормативных и правовых актов, регулирующих использование животных в исследовательских целях:

1. Федеральный Закон № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» в действующей редакции.

2. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 г. №199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» в действующей редакции.

3. ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (Национальный стандарт Российской Федерации) в действующей редакции.

4. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 224 от 19.07.2007 г. «О санитарно-эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях, испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок» в действующей редакции.

5. ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» (Межгосударственный стандарт, соответствующий «Guidelines for accommodation and care of animals. Species-specific provisions for laboratory rodents and rabbits») в действующей редакции.

6. Директива Совета ЕС от 24 ноября 1986 г. о сближении Законов,

постановлений и административных положений государств ЕС по вопросам защиты животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (86/609/ ЕЕС) с актуальными изменениями и дополнениями.

Все экспериментальные оперативные пособия, вмешательства и манипуляции, причиняющие животным боль, проводились строго под общим обезболиванием. Вид общей анестезии, сведения о ветеринарных лекарственных препаратах для анестезии, особенности проведения обезболивания описаны подробно ниже для каждого вида экспериментального вмешательства.

2.2 Общий план и дизайн экспериментально-хирургического исследования

Общий план и дизайн настоящего экспериментально-хирургического исследования представлен на рисунке 7. В целом работа включала 4 больших этапа. На первом этапе были сформулированы общая концепция работы, выдвинута и обоснована ее идея, определены цель и задачи исследования, выбрана методологическая база. Все это стало возможным после глубокого детального анализа литературных источников, определения выполнимости идеи проекта в условиях лабораторно-материальной базы научной лаборатории с экспериментальной операционной кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Второй этап включал проведение экспериментально-хирургического исследования на крысах Sprague-Dawley. У животных воспроизводили два классических вида кожной раны – линейную кожную рану и циркулярную полнослойную кожную рану.

На модели ушитой линейной раны выполняли следующие виды исследований:

- 1) определение динамики ранозаживления на фоне топического применения гидрогеля с наночастицами оксида церия;
- 2) определение влияния гидрогеля с наночастицами оксида церия на косметические характеристики формирующегося кожного соединения;
- 3) определение влияния гидрогеля с наночастицами оксида церия на прочность сформированного кожного рубца.

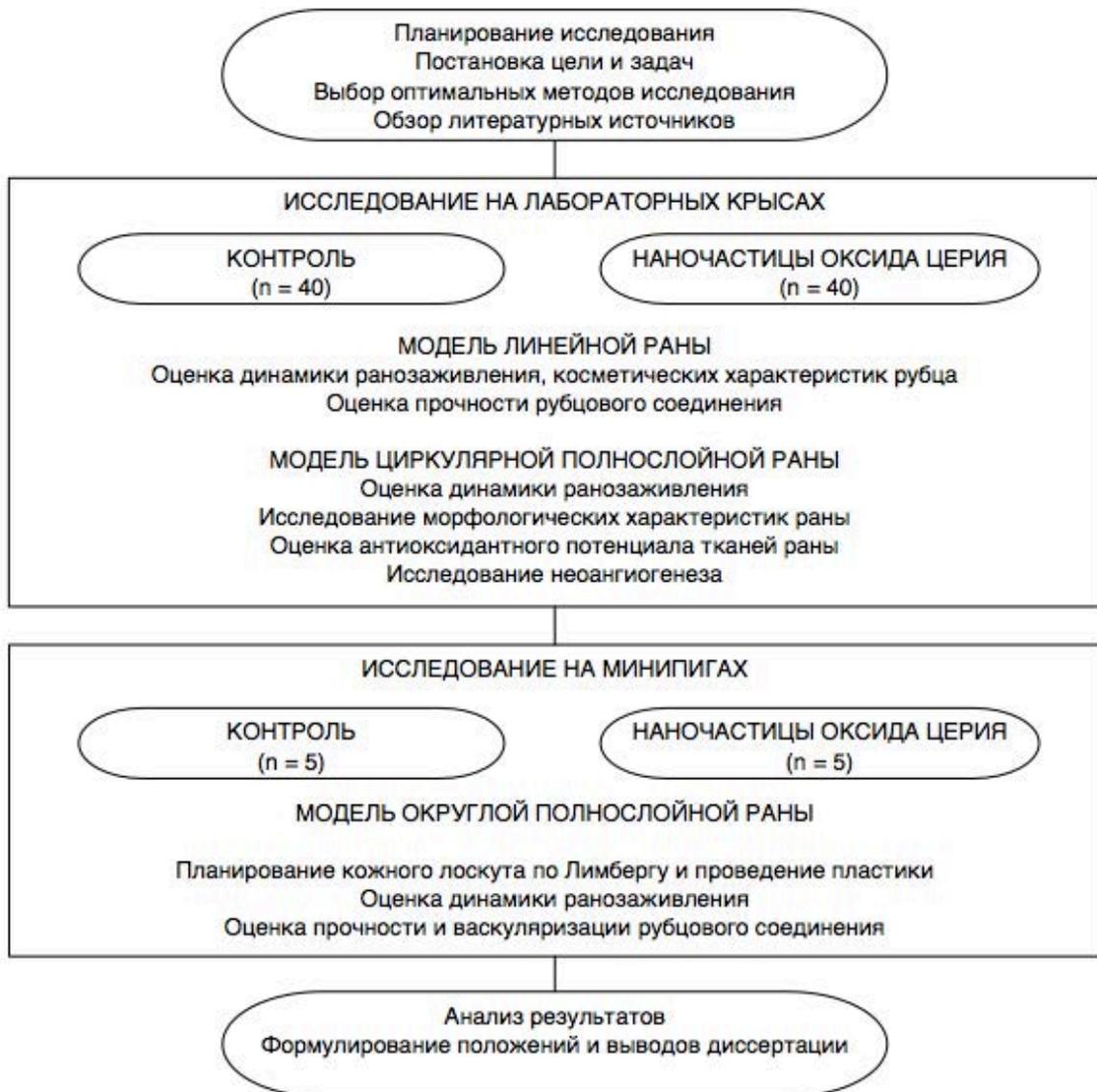


Рисунок 7 – План и дизайн настоящего экспериментально-хирургического исследования

На модели циркулярной полнослойной раны выполняли следующие виды исследований:

- 1) определение динамики ранозаживления на фоне топического применения гидрогеля с наночастицами оксида церия;
- 2) определение влияния гидрогеля с наночастицами оксида церия на косметические характеристики формирующегося кожного соединения;
- 3) определение влияния гидрогеля с наночастицами оксида церия на динамику морфологических процессов в кожной ране;
- 4) изучение влияния гидрогеля с наночастицами оксида церия на активность свободнорадикальных процессов и антирадикальный статус в кожной ране;
- 5) исследование влияния гидрогеля с наночастицами оксида церия на течение процесса неоангиогенеза в области раневого дефекта.

На третьем этапе выполняли моделирование экспериментально-хирургической патологии на минипигах. У животных воспроизводили округлую полнослойную кожную рану с последующим ее закрытием кожным лоскутом.

На модели ушитой округлой полнослойной раны выполняли следующие виды исследований:

- 1) планирование оптимального кожного лоскута по Лимбергу;
- 2) определение динамики ранозаживления на фоне топического применения гидрогеля с наночастицами оксида церия;
- 3) определение влияния гидрогеля с наночастицами оксида церия на косметические характеристики формирующегося кожного соединения и его васкуляризацию;
- 4) определение влияния гидрогеля с наночастицами оксида церия на прочность сформированного кожного рубца.

На четвертом – аналитическом – этапе проведена сводка полученных данных в общий информационный массив, для чего использовались технологические мощности программного обеспечения формирования базы

данных RedCap. Выполнена статистическая обработка результатов, сформулированы выводы и основные положения, выносимые на защиту.

2.3 Лабораторные животные и условия их содержания. Принципы формирования экспериментальных групп

Работа выполнена на 60 лабораторных крысах-самцах Sprague-Dawley весом 180-220 г, приобретенных в питомнике ФГБУН Институт биоорганической химии имени академиков Шемякина и Овчинникова Российской академии наук (г. Пущино) и 10 минипигах-самцах весом 3,5-4,5 кг, приобретенных в специальном питомнике лабораторных животных – филиале ФГБУН Центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства.

Содержание, уход и кормление лабораторных грызунов осуществляли в строгом соответствии с требованиями ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» (Межгосударственный стандарт, соответствующий «Guidelines for accommodation and care of animals. Species-specific provisions for laboratory rodents and rabbits») в действующей редакции.

Животные содержались в виварии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России в специальных помещениях: после поступления из питомника – в карантинном отделении в течение 14 суток, затем, по прохождении ветеринарного внутреннего контроля – переводились в отделение для содержания грызунов. Лабораторные крысы находились до проведения экспериментально-хирургического исследования в пластиковых клетках по 5 особей в каждой с решетчатой крышкой из нержавеющей стали, снабженным приспособлениями для подачи воды и корма при температуре окружающего воздуха 20-22⁰С и постоянной влажности 55-60%.

После выполнения экспериментально-хирургического вмешательства

животные перемещались в лабораторное отделение, где содержались в индивидуальных клетках Т2/1.

Кормление крыс осуществляли специально изготовленным сухим экструдированным кормом по промышленной рецептуре (производство АО «Лабораторкорм», Москва). Для питья применяли водопроводную фильтрованную воду. Подстил из щепки и опилок лиственных пород деревьев того же производителя меняли каждую неделю.

Минипиги содержались также в виварии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России в специальных вольерах, огороженных решеткой из нержавеющей стали. Кормление животных осуществляли сбалансированным комбикормом Дельта-Фидс (производства компании БиоПро, Россия), изготовленном по нашему заказу в соответствии с требованиями ГОСТ Р 50258-92. «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных». Для питья применяли водопроводную фильтрованную воду. Подстил из щепки и опилок лиственных пород деревьев АО «Лабораторкорм» меняли каждую неделю.

Формирование экспериментальных групп проводили при неукоснительном соблюдении требований к максимально возможному сокращению числа животных, подвергаемых воздействию. В этой связи, с учетом требований к репрезентативности научных данных, в состав каждой группы включали не более 5 особей. Отбор животных в группы происходил случайным образом на основании сгенерированной специальной программой – генератором случайных чисел последовательности номеров. Распределение животных и состав экспериментально-хирургических групп представлен в таблице 2.

Все лабораторные животные в группах были помечены для чего использовали специальный несмываемый маркер черного, красного и зеленого цвета. Метки выставлялись на ушных раковинах и хвосте животных. При необходимости метки обновлялись.

На втором этапе проведения исследования – с использованием лабораторных грызунов – животные отдельных групп в зависимости от вида воздействия объединялись в серии по 8 групп и 40 животных в каждой большой серии. Такое объединение диктовалось необходимостью выведения из эксперимента грызунов, находящихся на различных этапах эволюции кожной раны, для проведения морфологического, биохимического, иммуногистохимического, физического и молекулярно-биологического исследования.

Таблица 2 – Распределение животных по экспериментальным группам

Вид животного	Время выведения, n	Виды исследований
1	2	3
Модель линейной раны		
Лабораторные крысы-самцы Sprague-Dawley	<i>14 суток</i> Контроль (5) Лечение (5)	Динамика заживления, косметический эффект, прочность соединения
Модель циркулярной полнослойной неосложненной раны		
Лабораторные крысы-самцы Sprague-Dawley	<i>5 суток</i> Контроль (5) Лечение (5) <i>10 Суток</i> Контроль (5) Лечение (5) <i>15 Суток</i> Контроль (5) Лечение (5) <i>20 Суток</i> Контроль (5) Лечение (5) <i>25 Суток</i> Контроль (5) Лечение (5)	Динамика заживления, морфологическое, биохимическое, иммуногистохимическое, е молекулярно-биологическое исследования

Продолжение таблицы 2

Модель округлой полнослойной раны		
Таблица 2. Продолжение		
1	2	3
Минипиги-самцы	14 суток Контроль (5) Лечение (5)	Динамика заживления, косметический эффект, прочность соединения

2.4 Характеристика наночастиц оксида церия: получение, хранение и применение в экспериментально-хирургических условиях

Наночастицы церия были получены в отделе химии и технологии синтетических лекарственных средств и аналитического контроля АО «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ» (г. Старая Купавна Московской области). Получение исходной фармацевтической формы представляло собой растворение наноформы оксида церия в батарее гликолей различной концентрации, последующее добавление в полученный коллоидный раствор N-ацетил-6-аминогексановой кислоты с образованием стабильной смеси оксида церия и N-ацетил-6-аминогексаноата церия, структура которых представлена на рисунке 8.

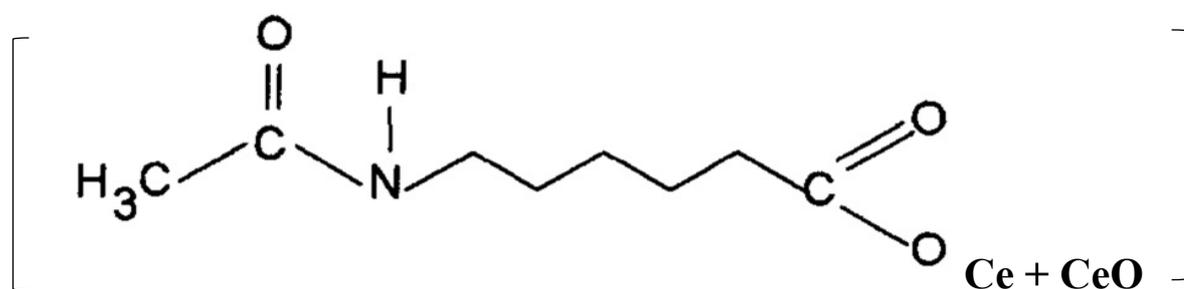


Рисунок 8 – Общая структура коллоидного раствора оксида церия – N-ацетил-6-аминогексаноата церия

На следующем этапе полученный коллоидный раствор оксида церия вносили в гидрогель, полученный путем нагревания в воде при температуре 37⁰ С гликоль-хитозана и диглицидилового эфира полиэтиленгликоля. Полученный прозрачный гидрогель, содержащий 1% (по массе) коллоидного раствора оксида церия – N-ацетил-6-аминогексаноата церия хранили в стеклянной емкости при температуре 3-7⁰ С. Для нанесения на раневую поверхность использовали наноформу оксида церия (1% НФОЦ) комнатной температуры.

Указанную форму наносили на раневую поверхность животных, начиная со вторых суток после моделирования экспериментальной хирургической патологии с помощью стерильного одноразового пластикового шпателя с формированием лечебного слоя толщиной не более 1 мм. Кожную рану у лабораторных крыс и минипигов не закрывали.

2.5 Методы моделирования экспериментальных ран

В своем исследовании мы использовали три модели неосложненной кожной раны: модель линейной кожной раны у крыс, модель циркулярной полнослойной раны у крыс и модель округлой полнослойной раны у минипига. Каждая из представленных моделей имеет свои особенности моделирования, которые будут изложены ниже.

2.5.1 Модель линейной кожной раны у крысы

Половозрелую особь крысы-самца Sprague-Dawley за сутки до операции лишали доступа к пище, утром в день операции – к воде, в день экспериментальной операции взвешивали на электронных весах, наркотизировали изофлураном с помощью наркозной приставки RWD Animal (США) к аппарату искусственной вентиляции для лабораторных грызунов Ugo Basile (Италия) и укладывали на подогреваемую до 25⁰ С

хирургическую площадку-приставку к многофункциональному ветеринарному столу экспериментальной операционной кафедры оперативной хирургии и патологической анатомии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России в положении на брюхе, лапки фиксировали специальными силиконированными держалками во избежание травматизации конечностей животного.

Шерсть на холке животного выстригали, кожу обезжировали 70% раствором спирта этилового, обрабатывали 1% спиртовым раствором иода, и с помощью стерильного хирургического скальпеля вдоль позвоночного столба, отступя на 10-15 мм от условной линии, соединяющей проксимальные края ушных раковин, наносили линейную рану длиной 45 мм на всю глубину кожи и подкожно-жировой клетчатки (рисунок 9). После чего рану ушивали семью однорядными швами с помощью 4,0 нити производства Ethicon (США). Расстояние между стежками составляло 6 мм. Экспериментальную рану обрабатывали 2% раствором гентамицина сульфата и не закрывали повязкой.



Рисунок 9 – Экспериментально-хирургическое моделирование линейной кожной раны у половозрелого самца крысы Sprague-Dawley

Проводили наблюдение над животными в течение 14 суток, проводя визуальную оценку ранозаживления. В течение первых двух дней послеоперационного периода животным два раза в сутки через специальную иглу для кормления (World Precision Instruments, США) внутривенно вводили крахмальный раствор кетопрофена в дозе 15 мг/кг для борьбы с болевым синдромом. Тяжесть боли оценивали по мимической шкале боли [161, 162].

Начиная со вторых суток послеоперационного периода ежедневно в утреннее время крысам опытной группы на рану наносили наноформу оксида церия в виде 1% гидрогеля. Животным контрольной группы наносили гидрогель без присутствия наночастиц оксида церия. На 10 сутки швы снимали. На 14 сутки животные выводились из эксперимента под изофлурановым наркозом. Участок кожи, подкожно-жировой клетчатки, на протяжении 10 мм от раны иссекали и после определения размеров кожного соединения помещали в стерильный охлажденный изотонический 0,9% раствор хлорида натрия для проведения измерений прочности рубцового соединения.

2.5.2 Модель циркулярной кожной полнослойной раны у лабораторной крысы

Половозрелую особь крысы-самца Sprague-Dawley за сутки до операции лишали доступа к пище, утром в день операции – к воде, в день экспериментальной операции взвешивали на электронных весах, наркотизировали изофлураном с помощью наркозной приставки RWD Animal (США) к аппарату искусственной вентиляции для лабораторных грызунов Ugo Basile (Италия) и укладывали на подогреваемую до 25⁰ С хирургическую площадку-приставку к многофункциональному ветеринарному столу экспериментальной операционной кафедры оперативной хирургии и патологической анатомии Института клинической

медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России в положении на брюхе, лапки фиксировали специальными силиконированными держалками во избежание травматизации конечностей животного.

Шерсть на холке животного циркулярно выстригали, кожу обезжировали 70% раствором спирта этилового, обрабатывали 1% спиртовым раствором йода, и с помощью специального пластикового кольцевидного трафарета с наружным диаметром 20 мм хирургическим скальпелем иссекали кожный лоскут диаметром 18 мм на всю глубину кожи и подкожно-жировой клетчатки и устанавливали стерильное пластиковое кольцо, которое снимали на 3 сутки (рисунок 10). Экспериментальную рану обрабатывали 2% раствором гентамицина сульфата и не закрывали повязкой.

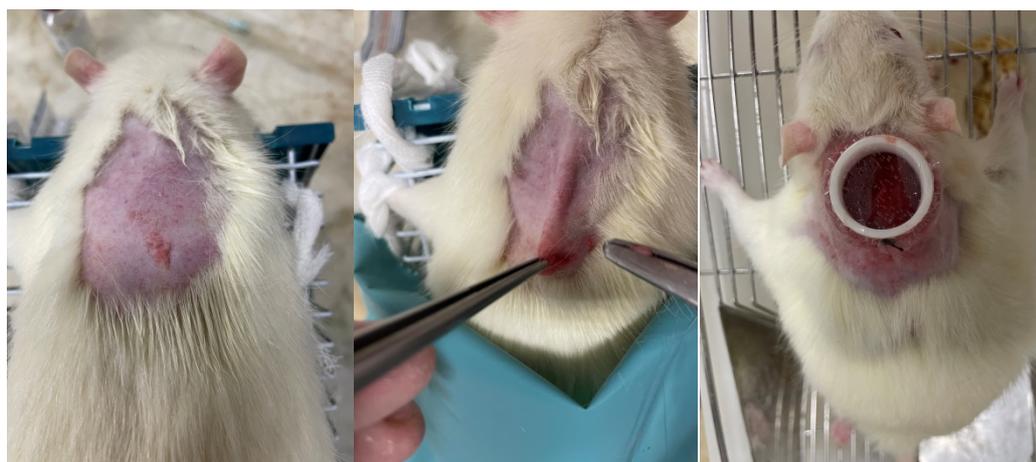


Рисунок 10 – Экспериментально-хирургическое моделирование циркулярной полнослойной кожной раны у половозрелого самца крысы Sprague-Dawley

Проводили наблюдение над животными в течение 25 суток, осуществляя фотофиксацию ранозаживления. Для этого на трипод на фиксированном расстоянии 20 см от раны устанавливали фотокамеру iPhone 13 Pro (Apple Inc. США) и проводили фотосъемку участка кожи с эволюционирующей раной. Площадь раневого дефекта рассчитывали при помощи программной среды ImageJ 8.0 (США). Вычисляли % сокращения площади раневой поверхности от исходной площади раны кожи.

В течение первых двух дней послеоперационного периода животным два раза в сутки через специальную иглу для кормления (World Precision Instruments, США) внутривенно вводили крахмальный раствор кетопрофена в дозе 15 мг/кг для борьбы с болевым синдромом. Тяжесть боли оценивали по мимической шкале боли [161, 162].

Начиная со вторых суток послеоперационного периода ежедневно в утреннее время крысам опытной группы на рану наносили наноформу оксида церия в виде 1% гидрогеля. Животным контрольной группы наносили гидрогель без присутствия наночастиц оксида церия. На 5, 10, 15 и 25 сутки случайным образом из эксперимента выводили по животным под изофлурановым наркозом. Участок кожи, подкожно-жировой клетчатки, на протяжении 5 мм от раны иссекали, разделяли на 3 приблизительно равные сектора, считая от условного центра дефекта.

Один фрагмент фиксировали в 10% забуференном растворе формальдегида для проведения морфологических и иммуногистохимических исследований, второй фрагмент подвергали заморозке до -40°C для последующего проведения иммуноферментного и фотометрического анализа, третий фрагмент подвергали глубокой заморозке до -86°C для выполнения раздела молекулярно-генетических исследований экспрессии фактора роста эндотелия сосудов.

На 5 и 10 сутки перед нанесением гидрогеля с 1% наночастицами оксида церия на открытых участках раневого дефекта проводили лазерную спекл-регистрацию интенсивности кровотока в моменте по формирующимся кровеносным сосудам для определения интенсивности неоангиогенеза.

2.5.3 Модель округлой полнослойной кожной раны минипига. Способ планирования кожного лоскута

Половозрелую особь минипига за сутки до операции лишали доступа к пище, утром в день операции – к воде, в день экспериментальной операции

взвешивали на электронных весах, наркотизировали севофлураном с помощью наркозного аппарата Ugo Basile (Италия) и укладывали на подогреваемый до 25° С многофункциональный ветеринарный хирургический стол экспериментальной операционной кафедры оперативной хирургии и патологической анатомии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России в положении на левом боку, лапы фиксировали специальными резиновыми держалками во избежание травматизации конечностей животного.

Шерсть в правой лопаточной области животного циркулярно сбривали, кожу обезжировали 70% раствором спирта этилового, обрабатывали 1% спиртовым раствором йода. На кожу хирургическим маркером наносили контур округлой формы диаметром 3 см, после чего хирургическим скальпелем иссекали кожу с участком подкожно-жировой клетчатки.

На втором этапе проводили планирование кожного лоскута по Лимбергу. С этой целью на кожу хирургическим маркером в зоне сформированной кожной раны наносили разметку Z-образной формы таким образом, чтобы образуемые Z углы составляли 60° . После этого, приподнимали лоскуты у верхушки анатомическим пинцетом для лучшей диссекции и отслаивания их от поверхностной фасции. Далее производился обмен лоскутами в новом для них положении с учетом направления линий натяжения тканей. Лоскуты ушивали внутрикожным швом с использованием рассасывающегося материала Монокрил 4.0 (рисунок 11).

Проводили наблюдение над животными в течение 14 суток, осуществляя фотофиксацию ранозаживления с оценкой результатов по международной шкале SCAR. Для этого на трипод на фиксированном расстоянии 20 см от раны устанавливали фотокамеру iPhone 13 Pro (Apple Inc. США) и проводили фотосъемку участка кожи с эволюционирующей раной. Площадь раневого дефекта рассчитывали при помощи программной среды ImageJ 8.0 (США).

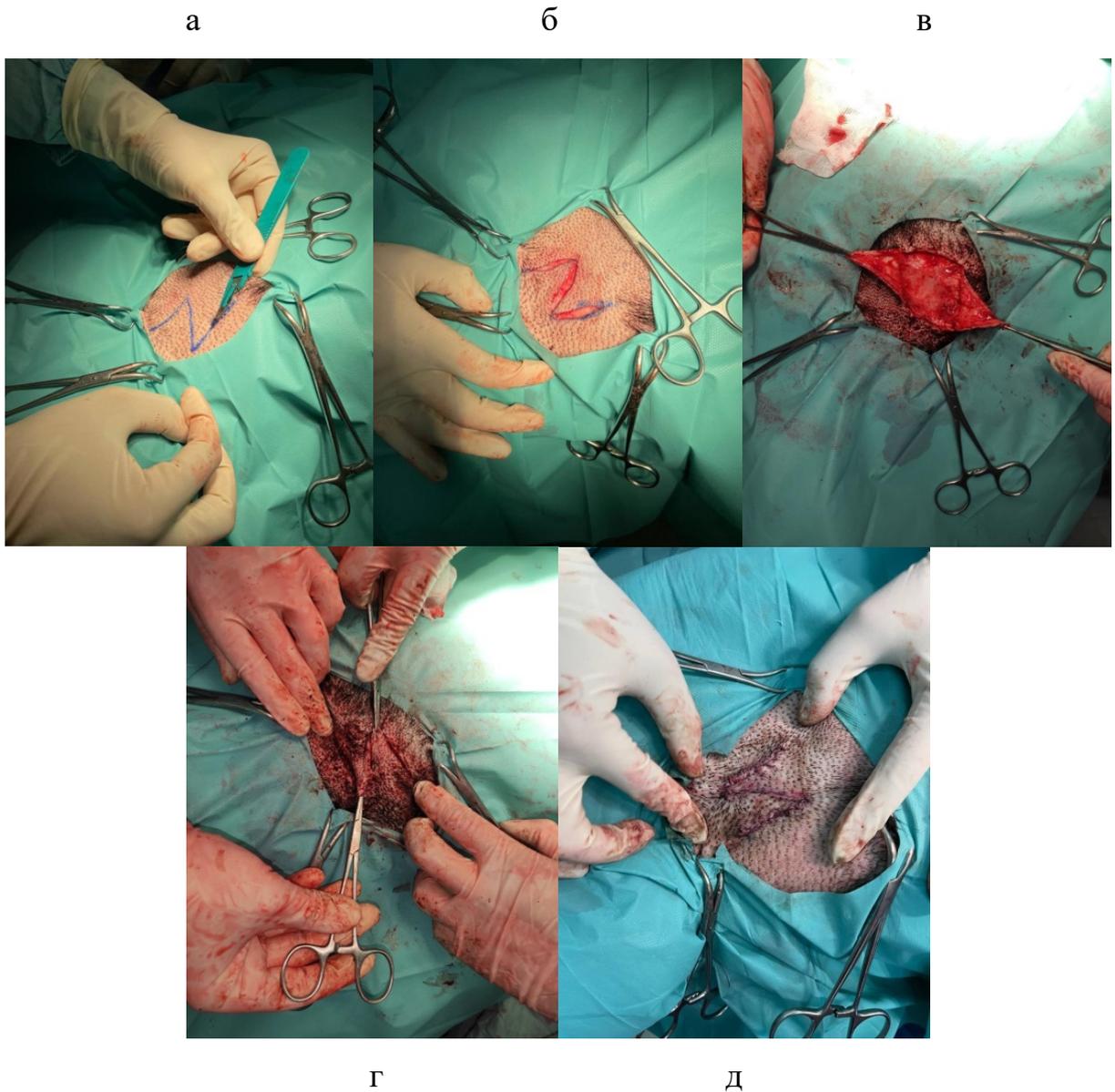


Рисунок 11 – Этапы операции на минипигах (Z-образная пластика по Лимбергу): а – нанесение на кожу разметки хирургическим маркером; б – выполнение линейных разрезов; в – отсепарирование кожных лоскутов; г – перемещение лоскутов; д – ушивание дефекта кожи

В течение первых двух дней послеоперационного периода животным два раза в сутки внутримышечно вводили раствор кетопрофена в дозе 2 мг/кг для борьбы с болевым синдромом.

Начиная со вторых суток послеоперационного периода ежедневно в утреннее время минипигам опытной группы на рану наносили наноформу оксида церия в виде 1% гидрогеля. Животным контрольной группы наносили

гидрогель без присутствия наночастиц оксида церия. На 10 сутки швы снимали. На 20 сутки у животных под севофлурановым наркозом участок кожи, подкожно-жировой клетчатки, на протяжении 8-10 мм от края сформировавшегося рубцового соединения иссекали и после определения размеров кожного соединения помещали в стерильный охлажденный изотонический 0,9% раствор хлорида натрия для проведения измерений прочности рубцового соединения.

2.6 Метод определения прочности и косметических характеристик кожного рубца

Косметические характеристики кожного рубца после экспериментально-хирургического воздействия у лабораторных крыс и минипигов оценивали при анализе стандартизованных фотографических изображений кожных дефектов в исследуемых группах по международной шкале SCAR (таблица 3). Шкала включает оценку в баллах распространенности шрама, степень эритематозных изменений, диспигментации, состояния следов швов, наличие и степень выраженности гипертрофических или атрофических процессов в рубцовой области.

Для оценки прочности сформированного рубца / кожного соединения в области линейной раны использовали специальную динамометрическую систему на базе аппарата Ugo Basile (Италия). Принцип метода основан на измерении силы, затрачиваемой при растяжении фрагмента кожного лоскута содержащего рубцовую ткань, в направлении, перпендикулярном продольной оси рубца, на разрыв соединения.

Таблица 3 – Критерии оценки косметических характеристик рубца в исходе кожной раны после топического лечения на 14 сутки по шкале SCAR

Показатель	Критерии оценки	Баллы
Распространение шрама	Нет/почти невидимый	0
	Тонкая линия	1
	Слабое распространение, заметное при ближайшем рассмотрении	2
	Умеренное распространение, очевидные рубцы	2
	Серьезное распространение	4
Эритема	Отсутствует	0
	Светло-розовый, могут присутствовать телеангиэктазии	1
	Красный, может присутствовать множество телеангиэктазий	2
	Темно-красный или фиолетовый	3
Диспигментация	Отсутствует	0
	Присутствует	1
Следы швов	Отсутствует	0
	Присутствует	1
Гипертрофия/атрофия	Отсутствует	0
	Легкая: пальпируемая, едва заметная гипертрофия или атрофия	1
	Умеренная: отчетливо видная гипертрофия или атрофия	2
	Тяжелая: выраженная гипертрофия или атрофия или келоидное образование	3

В результате получается значение, измеряемое в г/см². В качестве исходного значения показателя разрыва используется значение, полученное на неизменной коже того же лабораторного животного.

2.7 Методы морфологического и иммуногистохимического исследования

При оценке эффективности наночастиц коллоидного оксида церия в виде 1% гидрогеля при экспериментальном повреждении кожи лабораторных крыс использовали как методы классической светооптической микроскопии, так и цитохимические и иммуногистохимические методы окрашивания.

2.7.1 Методы светооптического исследования

Полученные у лабораторных животных фрагменты кожной раны на различных этапах эволюции раневого процесса (5, 10 и 15 сутки после проведения экспериментально-хирургического вмешательства) фиксировали в 10% растворе забуференного формальдегида и подвергали автоматизированному тканевому процессингу на аппарате «STP-120» вида «Карусель» (произведен компанией Thermo-Fisher Scientific, США), после чего блоки заливали в жидкий парафин.

Прошедшие парафинизацию блоки применяли для изготовления гистологических срезов (препаратов). Гистологические срезы (толщина = 4 мкм) изготавливали с помощью микротомы «HM340E» (произведен компанией Microm Laborgerate GmbH, Германия) со строгим соблюдением условия по попаданию в микропрепарат всех слоев кожной неосложненной раны. Выполненные таким образом гистологические срезы окрашивали затем гематоксилином (использовали гематоксилин Карацци) и эозином по методу Хеллендахеля и изучали в световой микроскоп марки «OLYMPUS-BX51» (произведено компанией Olympus, Япония), снабженный цифровой фотокамерой. Далее изображения проходили обработку в цифровой среде ImageJ 8.0 (США).

Для изучения влияния топического применения 1% НФОЦ на формирование и структуру соединительной ткани (продукцию коллагена фибробластами) использовали специальный цитохимический метод

окрашивания – метод Ван-Гизона. Гистологические срезы окрашивали фуксином и пикриновой кислотой.

Для оценки тяжести и распространенности локального воспалительного процесса, количества клеток воспаления – тучных клеток и фибробластов, интенсивности реэпителизации использовали количественную интегральную шкалу по Shekhter et al. [163].

2.7.2 Иммуногистохимический метод исследования

Использовали иммуногистохимический (ИГХ) метод окрашивания для изучения процесса неоангиогенеза и интенсивности пролиферации в раневом ложе. Для этого использовали оценку интенсивности окрашивания мембран CD34 позитивных клеток эндотелия и экспрессию маркера пролиферации Ki67 соответственно. Для проведения ИГХ исследования применяли модификацию метода с использованием термозависимого ретривера эпитопов (производство Thermo-Fisher Scientific, США).

Полученные у лабораторных животных фрагменты кожной раны на различных этапах эволюции раневого процесса (5, 10 и 15 сутки после проведения экспериментально-хирургического вмешательства) фиксировали в 10% растворе забуференного формальдегида и подвергали автоматизированному тканевому процессингу на аппарате «STP-120» вида «Карусель» (произведен компанией Thermo-Fisher Scientific, США), после чего блоки заливали в жидкий парафин. Гистологические препараты (срезы) 4 мкм толщиной приготавливали на автоматизированном гистоинкубаторе «Экросс ПЕ – 4312» (произведено Экросс, Россия) с соблюдением в течение одних суток температурного режима (37⁰ С) и наклеиванием на пластиковое предметное стекло. Процессинг гистологических блоков включал изготовление из каждого 5 срезов: один использовали для окрашивания гематоксилином / эозином, другие 4 отправлялись на последующие этапы ИГХ специальной проводки в соответствии с требованиями и

рекомендациями компаний – производителей наборов антител. При этом, два среза из каждой серии (из 4 препаратов) окрашивали первичными антителами, в то время как два других использовали как позитивный и негативный контроли.

В работе применяли кроличьи рекомбинантные моноклональные анти – CD34 (клон EP 373 Y, производитель Abcam, Великобритания) антитела и рекомбинантные моноклональные кроличьи анти – Ki67 антитела (клон S P 6, производитель Abcam, Великобритания). Для положительного контроля в группах с анти – CD34 окрашиванием применяли ткань почки лабораторной крысы, в группах с окрашиванием с анти – Ki67 антителами использовали ткань селезенки лабораторной крысы. Для негативного контроля применяли проведенные по схожему процессинговому протоколу гистологические срезы, не прошедшие окрашивания первичными антителами.

Степень экспрессии CD34 мембранами эндотелиальных клеток коррелировала с числом сформированных микрососудов в избранных случайным образом (при помощи автоматизированной морфометрической программы) двух полях зрения, включающих изображение свежей грануляционной ткани на расстоянии 1 мм от центра раневого ложа, с использованием увеличения микроскопа x100. Для формирования единого суждения о гистологическом препарате каждое стекло просматривал диссертант и врач-патологоанатом. В случае противоположных мнений проводили пересмотр стекол не ранее, чем через неделю после первичного просмотра с привлечением доктора наук – научного руководителя.

Степень экспрессии Ki67 ядрами высоко пролиферирующих клеток коррелировала с общей интенсивности регенеративных процессов в раневом ложе. Ее определяли в избранных случайным образом (при помощи автоматизированной морфометрической программы) пяти полях зрения, включающих изображение всех слоев раневых тканей и на расстоянии 1 мм от центра раневого ложа, с использованием увеличения микроскопа x400.

Полученные результаты иммуногистохимического исследования подвергались межгрупповому сопоставлению (группа контроля – группа 1% НФОЦ), при этом, уровень экспрессии CD34 выражали как общее количество (в абсолютных значениях) окрашенных микрососудов, интенсивность окрашивания Ki67 выражали в относительных значениях (процентах).

2.8 Метод определения уровня про- и противовоспалительных цитокинов в ткани кожной раны

Определение количественного содержания (концентрации) провоспалительных (ИЛ-1 β , ФНО- α) и противовоспалительного (ИЛ-10) цитокинов в тканях раневого ложа проводили с использованием количественного иммуноферментного (КИФА) анализа типа «сэндвич» в замороженном до -40⁰ С биологическом материале, полученном от выведенных из экспериментально-хирургического наблюдения животных спустя 5 суток после воспроизведения полнослойной кожной раны.

Постановка лабораторного анализа выполнялась в соответствии с описанием к используемым в работе наборам диагностических наборов антител экспертного уровня производства компании CUSABIO BIOTECH Co. LTD (КНР). Применяли наборы крысиных анти-ИЛ-1 β , анти-ФНО- α и анти-ИЛ-10 антител с минимальным пределом определения до 1 пг/мл.

В соответствии с протоколом, пробоподготовка включала трехэтапную заморозку (до -40⁰ С) и последующее размораживание биологического материала, необходимые для разрушения клеточных мембран и поступления их содержимого в экстрацеллюлярное пространство. После термической гомогенизации, размороженный биологический материал подвергали центрифугированию при скорости 5000 оборотов в мин. с охлаждением (при температуре 3-7⁰ С) на протяжении 300 с. По завершении центрифугирования, надосадочная жидкость раскапывалась с помощью специальной микропипетки в 96-луночный микропланшет диагностического

набора, содержащий моноклональные фиксированные анти-ИЛ-1 β , анти-ФНО- α и анти-ИЛ-10 антитела. Затем следовали поочередно промывка несвязанных компонентов, их последующее удаление и внесение в каждую лунку микропланшета конъюгата анти-ИЛ-1 β , анти-ФНО- α и анти-ИЛ-10 антител с биотином.

Добавляли в каждую лунку микропланшета авидин и пероксидазу хрена в виде комплекса с целью последующей активации реакции связывания. Иммуноферментную реакцию останавливали, после чего измеряли оптическую плотность жидкости в каждой лунке диагностического микропланшета в проходящем свете с длиной волны 652 нм. Применяли полуавтоматический микропланшетный ридер марки StatFax 4200 (производство компании Awareness Technology, США) для определения оптической плотности.

2.9 Метод изучения активности локальной антиокислительной системы в области экспериментальной раны

Как известно, вектор и активность процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты тканей и клеток является одним из драйверов повреждения, последующей воспалительной реакции и во-многом определяет успех и исход ранозаживления. В нашем исследовании мы воспользовались одним из наиболее распространенных и точных методов оценки антиокислительного статуса в тканях, в основе которого лежит индукция хемилюминисценции [164]. Для нас также немаловажным было оценить процессы свободнорадикальной липопероксидации в динамике, поэтому оценку осуществляли в точках 5 и 10 суток после проведения экспериментально-хирургической операции. Объектом исследования была свежая грануляционная ткань, покрывающая раневое ложе.

С иссеченной поверхности ран острым способом забирали свежую грануляционную ткань, промывали в охлажденном забуференном

стерильном изотоническом 0,9% растворе хлорида натрия. Биологический материал, полученный таким образом, гомогенизировали при температуре 2-4⁰ С с прибавлением на каждые 100 мг тканей 0,5 мл забуференного стерильного изотонического 0,9% раствора хлорида натрия, после чего гомогенат подвергали центрифугированию при скорости 3000 оборотов в минуту при температуре 2-4⁰ С в минуту на протяжении 15 мин.

В стеклянную кювету с содержанием 0,3 мл надосадочной жидкости в присутствии 0,5 мл фосфатного буфера с рН 7,5 для последующей активации хемилюминисценции прибавляли 0,02 мл 2% раствора пероксида водорода. Последующее измерение хемилюминисценции проводили при помощи хемилюминометра марки «SmartLum-1200» (производство компании DISoft, Россия). Хемилюминисценцию активировали путем прибавления 1 мл 0,05 мМ сульфата железа (II). Реакцию активации сигнала регистрировали на протяжении 5 мин.

Для оценки антиоксидантной активности грануляционной ткани использовали величину обратно пропорциональную количеству вещества, необходимого для ингибирования активированной железом (II) реакции хемилюминисценции.

2.10 Метод определения экспрессии рецептора фактора роста фибробластов (*FGFR3*) с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (rtПЦР)

Для анализа применяли глубокозамороженные (до -86⁰ С) ткань кожных ран, полученных от лабораторных крыс из контрольной и 1% НФОЦ экспериментально-хирургической групп спустя 10 суток после интервенции. Из размороженных специальным образом и гомогенизированных тканей выделяли нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) при помощи специального набора марки «AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit» (производство компании Qiagen, Германия) в строгом соответствии с руководством по

эксплуатации производителя. Концентрацию изолированных нуклеиновых кислот в опытных пробах определяли при помощи экспертных наборов диагностикумов марок «Qubit dsDNA HS Assay» и «Qubit RNA BR Assay» (производитель компания Thermo Fisher Scientific, США) соответственно, на флюориметре Qubit 4 (производитель компания Thermo Fisher Scientific, США).

По 100 нг общей рибонуклеиновой кислоты в каждом аналитическом образце смешивали в 9 мкл 20 пм олигонуклеотидного праймера обратной транскрипции (для гена рецептора фактора роста фибробластов 3 (*FGFR3*) и гена бета-актина (*ACTB*) использовались случайно подобранные декамеры), после чего смесь инкубировалась при температуре 70⁰ С на протяжении 2 минут. После чего реакционная смесь охлаждалась на льду. Реакция обратной транскрипции проводилась при температуре 42⁰ С на протяжении 30 минут с применением набора марки «MMLV RT kit» (производство компании Evrogen, (Россия) в полном соответствии с методическим протоколом производителя. После этого с помощью инактивирующей обратной транскриптазы реакцию останавливали.

Полученную в результате предыдущих этапов комплементарную ДНК (кДНК) в 10 раз разводили и применяли для оценки экспрессии РНК при выполнении rtПЦР.

RtПЦР осуществляли с использованием амплификатора марки «DTPrime amplifier» (производство DNATechnology, Россия). Оценку экспрессии *VEGF* и *ACTB* проводили с использованием набора марки «qPCRmix-HS SYBR» (производство Evrogen, Россия) в полном соответствии с инструкцией по применению диагностического набора.

Следующие олигонуклеотидные праймеры были использованы при проведении анализа:

- для *FGFR3*:

- - *VEGFRT-F*, 5'-*CCCAAATGGGAGCTGTCTCG*-3';

- - *VEGFRT-R*, 5'-*CATCTCAGACACCAGGTCCG*-3;

- для АСТВ:

- - *b-act-for*, 5'-GAGCGGGAAATCGTGCGTGACATT-3';

- - *b-act-rev*; 5'-GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG-3'.

2.11 Метод оценки интенсивности ангиогенеза в кожной ране на основе лазерной speckle-фотометрии

В динамике эволюции кожной раны у бодрствующих животных оценивали локальную васкуляризацию методом лазерной speckle-фотометрии [165]. Принцип метода схематически представлен на рисунке 12.

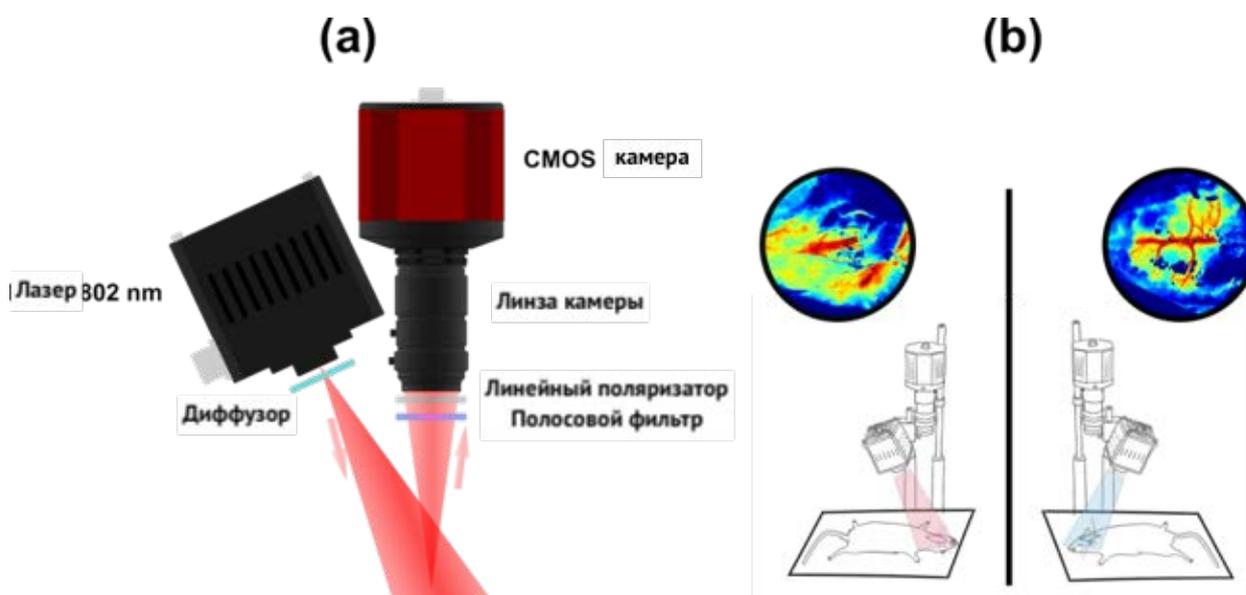


Рисунок 12 – Принципиальная схема устройства (а) и постановка эксперимента по использованию установки лазерной speckle-фотометрической регистрации кровотока в ткани кожной раны

Экспериментальная лазерная фотометрическая установка включала монохромную камеру CS505MU (произведено Thorlabs Inc., США), снабженную оптической установкой (линзой) MVL50M23 того же производителя и лазерным диодом 802 нм.

Время экспозиции лазерного излучения составляло во всех экспериментах 5 мс. Лазерный луч рассеивали при помощи специального диффузора ED1-C20 (произведено Thorlabs Inc., США). Пленочный поляризатор устанавливали перед монохромной камерой для отсека лазерного излучения, отраженного от поверхности раны, ввиду того, что эти пучки не отражают информацию о движении эритроцитов в кровеносном сосуде. Также для фильтрации внешнего светового излучения перед камерой устанавливали полосовой фильтр FB800-10 той же компании-производителя.

Speckle-контраст (K) рассчитывали по формуле (1):

$$K = \sigma / \langle I \rangle, \quad (1)$$

где σ – стандартное отклонение интенсивности излучения, $\langle I \rangle$ – средняя интенсивность освещения. Для задач настоящего исследования Speckle-контраст вычисляли с использованием подвижного окна площадью 7 x 7 пикселей и математического алгоритма, разработанного в программной среде Matlab (произведено MathWorks, США).

На выходе получали контрастное цветное изображение, в котором наименее кровоснабжаемые области окрашивались в цвета синей гаммы, тогда как кровоснабжаемые участки тканей окрашивались в цвета желто-красной гаммы.

2.12 Статистический анализ результатов проведенного диссертационного исследования

Для статистической обработки и сводки исходных экспериментальных данных использовали программную среду формирования баз данных RadCap (США). Экспериментальные результаты выражали в виде непрерывных или дискретных величин. Для характеристики первых использовали среднюю арифметическую со стандартным отклонением, для вторых – абсолютную

величину или долю. Достоверность различий вычисляли при сравнении двух групп при уровне значимости более 95%. Для проверки нормальности распределения величин в совокупности использовали одномерный дисперсионный анализ. При равномерном распределении признаков в совокупности для оценки достоверности различий при сравнении двух групп применяли одномерный t-критерий Стьюдента, при сравнении трех групп – критерий ANOVA с последующим применением критерия Тьюки. При неравномерном распределении признака использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Для оценки достоверности различий в динамике применяли критерий ANOVA. Для сравнения дискретных величин использовали непараметрический точный критерий Фишера.

Вычисления проводили на персональном компьютере iMac с процессором Intel с использованием лицензированной версии статистической программы SPSS (version 16.0, IBM, США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ХИРУРГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

ВЛИЯНИЕ ТОПИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЦЕРИЯ НА РАНОЗАЖИВЛЕНИЕ ЛИНЕЙНОЙ И ПОЛНОСЛОЙНОЙ ЦИРКУЛЯРНОЙ КОЖНОЙ РАНЫ КРЫСЫ

Для оценки динамики, полноты и косметических эффектов ранозаживления на фоне топического применения гидрогеля, содержащего 1% коллоидный раствор наночастиц оксида и N-ацетил-6-аминогексаноата церия, использовали две экспериментально-хирургические модели – модель линейной раны и модель циркулярной полнослойной неосложненной кожной раны у крыс Sprague-Dawley.

3.1 Влияние местного применения наночастиц оксида церия на ранозаживление линейной кожной раны крысы

Начиная со вторых суток послеоперационного периода ежедневно в утреннее время крысам опытной группы на рану наносили наноформу оксида церия в виде 1% гидрогеля. Животным контрольной группы наносили гидрогель без присутствия наночастиц оксида церия. На 10 сутки швы снимали.

В процессе оценки ранозаживления определяли время полного закрытия раневого дефекта, а также измеряли площадь кожного соединения в контроле и у животных, получавших местно наноформу оксида церия в виде 1% гидрогеля (таблица 4).

В контрольной серии опытов время полного ранозаживления составляло в среднем 10 ± 1 суток, тогда как при локальном ежесуточном нанесении наноформы 1% оксида церия в гидрогеле закрытие дефекта проходило статистически значимо быстрее и составляло 6 ± 2 суток ($p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой).

Таблица 4 – Быстрота полного закрытия кожной линейной раны крысы Sprague-Dawley и площадь рубцового соединения на фоне местного нанесения 1% НФОЦ (n = 5 в каждой группе)

Группа животных	Кратность местного применения	Время полного закрытия раны, сутки (M ± SD)	Площадь кожного рубца, мм² (M ± SD)
Контроль (гидрогелевый матрикс)	1 раз в сутки	10 ± 1	109 ± 4
1% НФОЦ	1 раз в сутки	6 ± 2*	88 ± 3*

Примечание: * $p < 0,05$ достоверность различий при сравнении с контролем (одномерный дисперсионный анализ, критерий Манна-Уитни)

Также изменялась и площадь кожного соединения в исходе линейного раневого процесса: в группе контрольных лабораторных крыс она была равна 109 ± 4 мм², а на фоне локального применения наноформы 1% оксида церия в гидрогеле снижалась до 88 ± 3 мм² ($p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой).

На 14 сутки животные выводились из эксперимента под изофлурановым наркозом. Участок кожи, подкожно-жировой клетчатки, на протяжении 10 мм от раны иссекали и после определения размеров кожного соединения помещали в стерильный охлажденный изотонический 0,9% раствор хлорида натрия для проведения измерений прочности рубцового соединения.

Измерение проводили на специально сконструированном приборе на основе динамометра Ugo Basile (Италия) путем определения силы, прилагаемой для разрыва кожного соединения. Сравнивали с силой разрыва интактного участка кожи того же животного (рисунок 13).

Измерение прочности кожи интактных животных проводили в совместных исследованиях с к.м.н. Д.В. Пахомовым [20]. Прочность

интактной кожи крыс-самцов Sprague-Dawley в среднем составляла 521 г/см² (рисунок 13).

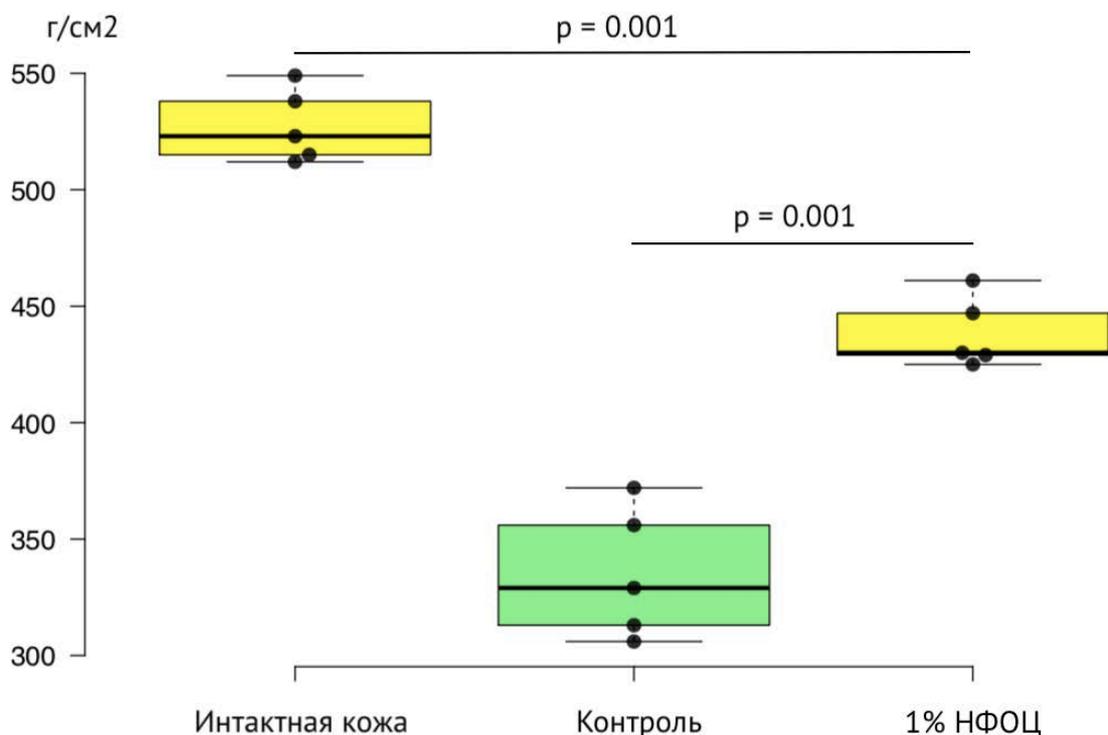


Рисунок 13 – Прочность рубцового кожного соединения в исходе линейной кожной неосложненной раны крыс-самцов Sprague-Dawley (измерение проведено на 14 сутки) на фоне локального применения 1% коллоидного раствора наноформы оксида церия в виде гидрогеля: достоверность различий определяли с помощью критерия ANOVA с последующим применением критерия Тьюки после проверки нормальности распределения одномерным дисперсионным анализом

Прочность рубцового соединения в исходе неосложненной кожной раны в контрольной группе животных заметно снижалась в среднем на 48% и достигала значения 325 г/см² ($p = 0,001$ при сравнении с интактной группой).

Топическое нанесение один раз в сутки в течение 12 суток 1% коллоидного оксида церия в форме наночастиц в гидрогеле сопровождалось значимым повышением прочностных характеристик рубца – сила, требовавшаяся для разрыва кожного соединения возрастала до 427 г/см² ($p =$

0,001 при сравнении с контрольной группой), однако, не достигала значений интактной кожи ($p = 0,001$ при сравнении с интактной группой).

При интегральной оценке эффективности ранозаживления в исследуемых группах с использованием универсальной международной шкалы SCAR нами были получены следующие результаты, представленные в таблица 5 и 6 и на рисунке 13.

Таблица 5 – Критерии оценки косметических характеристик рубца в исходе кожной раны в контроле на 14 сутки по шкале SCAR

Показатель	Критерии оценки	Баллы / n*
1	2	3
Распространение шрама	Нет/почти невидимый	0
	Тонкая линия	1
	Слабое распространение, заметное при ближайшем рассмотрении	2
	Умеренное распространение, очевидные рубцы	2 / 4
	Серьезное распространение	4 / 1
Эритема	Отсутствует	0
	Светло-розовый, могут присутствовать телеангиэктазии	1 / 2
	Красный, может присутствовать множество телеангиэктазий	2 / 3
	Темно-красный или фиолетовый	3
Диспигментация	Отсутствует	0
	Присутствует	1 / 5
Следы швов	Отсутствует	0
	Присутствует	1 / 5

Продолжение таблицы 5

1	2	3
Гипертрофия/атрофия	Отсутствует	0
	Легкая: пальпируемая, едва заметная гипертрофия или атрофия	1 / 4
	Умеренная: отчетливо видная гипертрофия или атрофия	2 / 1
	Тяжелая: выраженная гипертрофия или атрофия или келоидное образование	3

Примечание: * число животных в группе, у которых регистрировали признак

В контрольной группе животных при оценке распространенности рубца преобладали умеренно распространенные очевидные рубцы, при этом у 1 крысы отмечалось серьезное распространение рубцовой ткани за пределы первичного повреждения. Рубец имел эритематозный характер с телеангиэктазиями и явлениями диспигментации и следами швов у всех грызунов, входивших в группу контроля. Также у всех животных отмечали явления гипертрофии / атрофии от умеренной до выраженной степени. Общая интегральная оценка в баллах в этой группе составила 7,8 баллов (рисунок 13).

В группе животных, которым ежедневно наносили гидрогель, содержащий 1% коллоидный раствор наночастиц оксида церия, косметический результат претерпевал значительные изменения в сторону сокращения итогового балла. Так, при оценке распространенности рубца последний был представлен либо тонкой линией, либо слабым распространением очевидных рубцов, при этом у 1 крысы умеренно распространенные очевидные рубцы за пределы первичного повреждения. Рубец либо не имел эритематозных изменений (у 2 животных), либо имел слабо-эритематозный характер с единичными телеангиэктазиями без

Таблица 6 – Критерии оценки косметических характеристик рубца в исходе кожной раны в группе, получавшей 1% НФОЦ, на 14 сутки по шкале SCAR

Показатель	Критерии оценки	Баллы / n*
1	2	3
Распространение шрама	Нет/почти невидимый	0
	Тонкая линия	1 / 2
	Слабое распространение, заметное при ближайшем рассмотрении	2 / 2
	Умеренное распространение, очевидные рубцы	3 / 1
	Серьезное распространение	4
Эритема	Отсутствует	0 / 2
	Светло-розовый, могут присутствовать телеангиэктазии	1 / 3
	Красный, может присутствовать множество телеангиэктазий	2 / 3
	Темно-красный или фиолетовый	3
Диспигментация	Отсутствует	0 / 2
	Присутствует	1 / 3
Следы швов	Отсутствует	0 / 3
	Присутствует	1 / 2
Гипертрофия/атрофия	Отсутствует	0 / 3
	Легкая: пальпируемая, едва заметная гипертрофия или атрофия	1 / 2
	Умеренная: отчетливо видная гипертрофия или атрофия	2 / 1
	Тяжелая: выраженная гипертрофия или атрофия или келоидное образование	3

Примечание: * число животных в группе, у которых регистрировали признак

явлений депигментации и следов швов у большей части грызунов, входивших в группу, получавшую 1% НФОЦ. Также у всех животных отмечали явления гипертрофии / атрофии легкой степени. Общая интегральная оценка в баллах в этой группе составила 4,3 балла ($p < 0,05$ при сравнении с контролем) (рисунок 14).

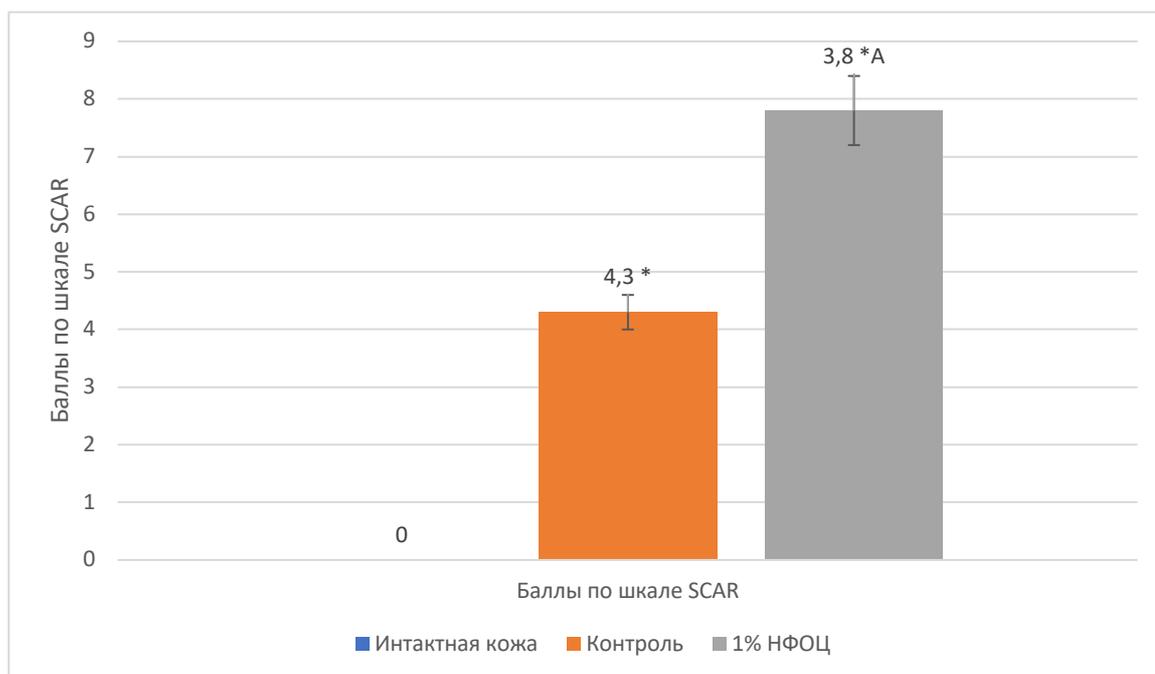


Рисунок 14 – Комплексная интегральная оценка косметического результата заживления линейной кожной раны крыс по международной шкале SCAR на фоне топического применения 1% НФОЦ: * $p < 0,05$ достоверность различий при сравнении с интактной кожей; ^A $p < 0,05$ достоверность различий при сравнении с контролем (одномерный дисперсионный анализ, критерий Манна-Уитни)

Таким образом, топическое использование 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в смеси с N-ацетил-6-аминогексановой кислотой в форме водорастворимого гидрогеля, ускорило заживление линейной неосложненной кожной раны, приводило к повышению прочности рубцового соединения и сопровождалось благоприятными косметическими результатами в виде уменьшения площади поверхности рубца, отсутствия

его депигментации, эритематозных изменений и телеангиэктазий, атрофических и гипертрофических процессов в области рубца.

3.2 Влияние 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в смеси с N-ацетил-6-аминогексановой кислотой в форме водорастворимого гидрогеля на заживление циркулярной полнослойной кожной раны крыс

После выполнения хирургического иссечения кожного лоскута проводили наблюдение над животными в течение 25 суток, осуществляя фотофиксацию ранозаживления. Для этого на штатив на фиксированном расстоянии 20 см от раны устанавливали фотокамеру iPhone 13 Pro (Apple Inc. США) и проводили фотосъемку участка кожи с эволюционирующей раной. Площадь раневого дефекта рассчитывали при помощи программной среды ImageJ 8.0 (США). Вычисляли % сокращения площади раневой поверхности от исходной площади раны кожи (рисунок 15, таблица 7).

В контрольной серии опытов к 10 суткам наблюдения кожный раневой дефект занимал $63 \pm 4\%$ площади исходной полнослойной циркулярной раны, затем к 15 и 20 суткам происходило дальнейшее закрытие дефекта с сохранением $42 \pm 3\%$ и $18 \pm 2\%$ площади повреждения соответственно. Полное закрытие кожного дефекта наблюдалось на $22,8 \pm 1,6$ сутки, при этом площади кожного рубца, измеренная на следующий день после полного закрытия раны, составляла 94 ± 5 мм².

Топическое воздействие на раневую поверхность 1% коллоидным раствором наночастиц оксида церия в форме гидрогеля однократно в сутки сопровождалось заметным ускорением ранозаживления. Так, к 10 суткам наблюдения кожный раневой дефект занимал $24 \pm 2\%$ площади исходной полнослойной циркулярной раны ($p < 0,05$ при сравнении с животными контрольной группы опытов), затем к 15 суткам происходило дальнейшее

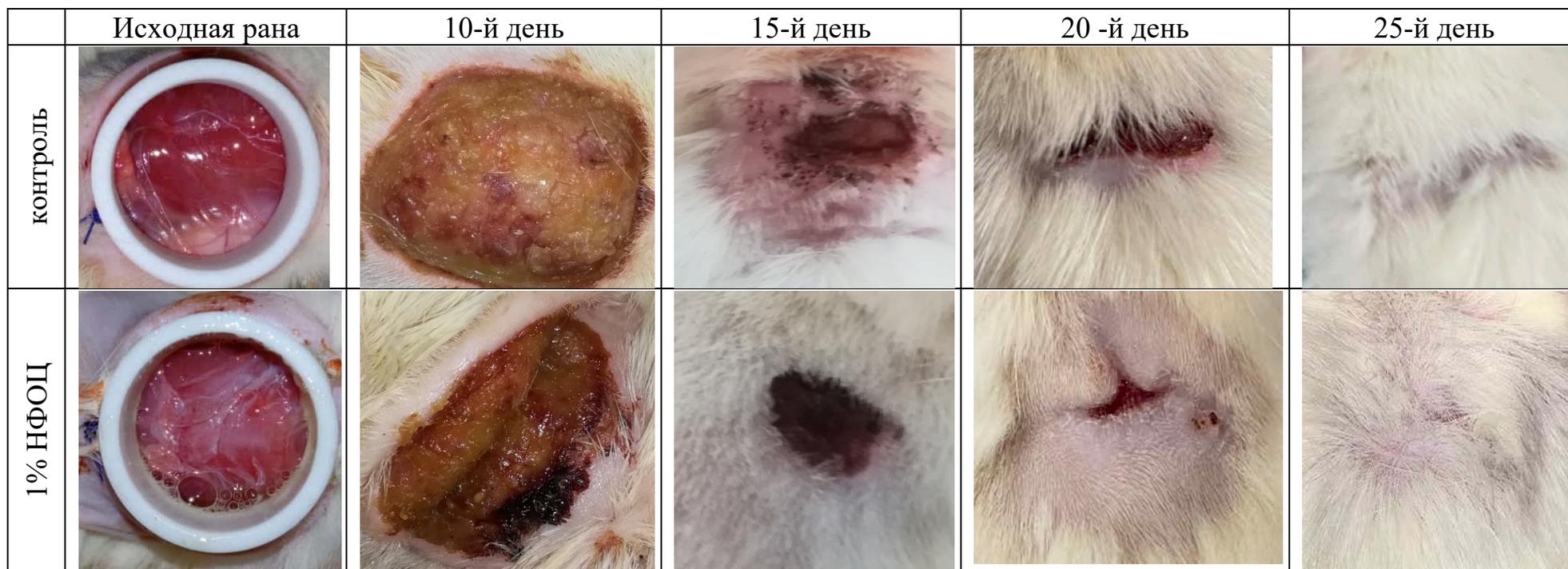


Рисунок 15 – Фотографические изображения динамики кожной полнослойной циркулярной неосложненной раны крысы Sprague-Dawley контрольной группы (локальное использование только гидрогелевой основы) и животного, рану которых обрабатывали 1% НФОЦ

Таблица 7 – Динамика площади (в % к исходным значениям) кожной полнослойной циркулярной неосложненной раны крысы Sprague-Dawley контрольной группы (локальное использование только гидрогелевой основы) и животного, рану которого ежедневно обрабатывали 1% коллоидным раствором наноформы оксида церия в форме гидрогеля (1% НФОЦ)

Экспериментальная группа	Площадь раны (% от исходного значения в мм ²)					Время полного закрытия раны, М ± SD, сутки	Средняя площадь рубца ^a в мм ²
	Исходный размер раны	10-е сутки	15-е сутки	20-е сутки	25-е сутки		
крысы Sprague-Dawley							
Контроль	n = 20 100±0	n = 15 63±4	n = 10 42±3	n = 5 18±2	n = 5 0±0	22,8±1,6	94±5
1% НФОЦ	n = 20 100±0	n = 15 24±2 [†]	n = 10 11±3 [†]	n = 5 0±0 [†]	n = 5 0±0	16,3±1,8 [†]	51±4 [†]

Примечание: [†] p<0,05 при сравнении с контрольной группой животных (одномерный дисперсионный анализ, t-критерий Стьюдента); * значение площади кожного рубца измеряли в сутки, следующие за днем полного закрытия кожного раневого дефекта

закрытие дефекта с сохранением $11\pm 3\%$ площади повреждения ($p < 0,05$ при сравнении с животными контрольной группы опытов), которого ежедневно обрабатывали 1% коллоидным раствором наноформы оксида церия в форме гидрогеля

Полное закрытие кожного дефекта наблюдалось на $16,3\pm 1,8$ сутки ($p < 0,05$ при сравнении с животными контрольной группы опытов), при этом площади кожного рубца, измеренная на следующий день после полного закрытия раны, сокращалась при сравнении с контролем на 45,7% и составляла 51 ± 4 мм² ($p < 0,05$ при сравнении с животными контрольной группы опытов).

3.3 Влияние 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в смеси с N-ацетил-6-аминогексановой кислотой в форме водорастворимого гидрогеля на патоморфологическую картину полнослойной кожной раны крыс

Местное применение 1% коллоидным раствором наноформы оксида церия в форме гидрогеля наряду с макроморфологическими позитивными изменениями (при оценке скорости заживления раны и площади сформированного рубца) приводило также и к микроморфологическим отличиям при сравнении с тканями раны животных контрольной серии опытов (рисунок 16, таблица 8).

В контрольной серии опытов к 5-м суткам раневое ложе выстлано густым фибриновым слоем с обилием нейтрофильных гранулоцитов в более глубоком слое (стрелка черного цвета), в подлежащем слое раневого дефекта определяются множественные фибробласты в фазе пролиферации (стрелка красного цвета). К 10-м суткам раневое ложе заполнено созревающей грануляционной тканью на поверхности которого сохраняется тонкий слой фибрина, грануляционная ткань и особенно фибрин, при этом, густо инфильтрированы нейтрофильными гранулоцитами (стрелка черного цвета),

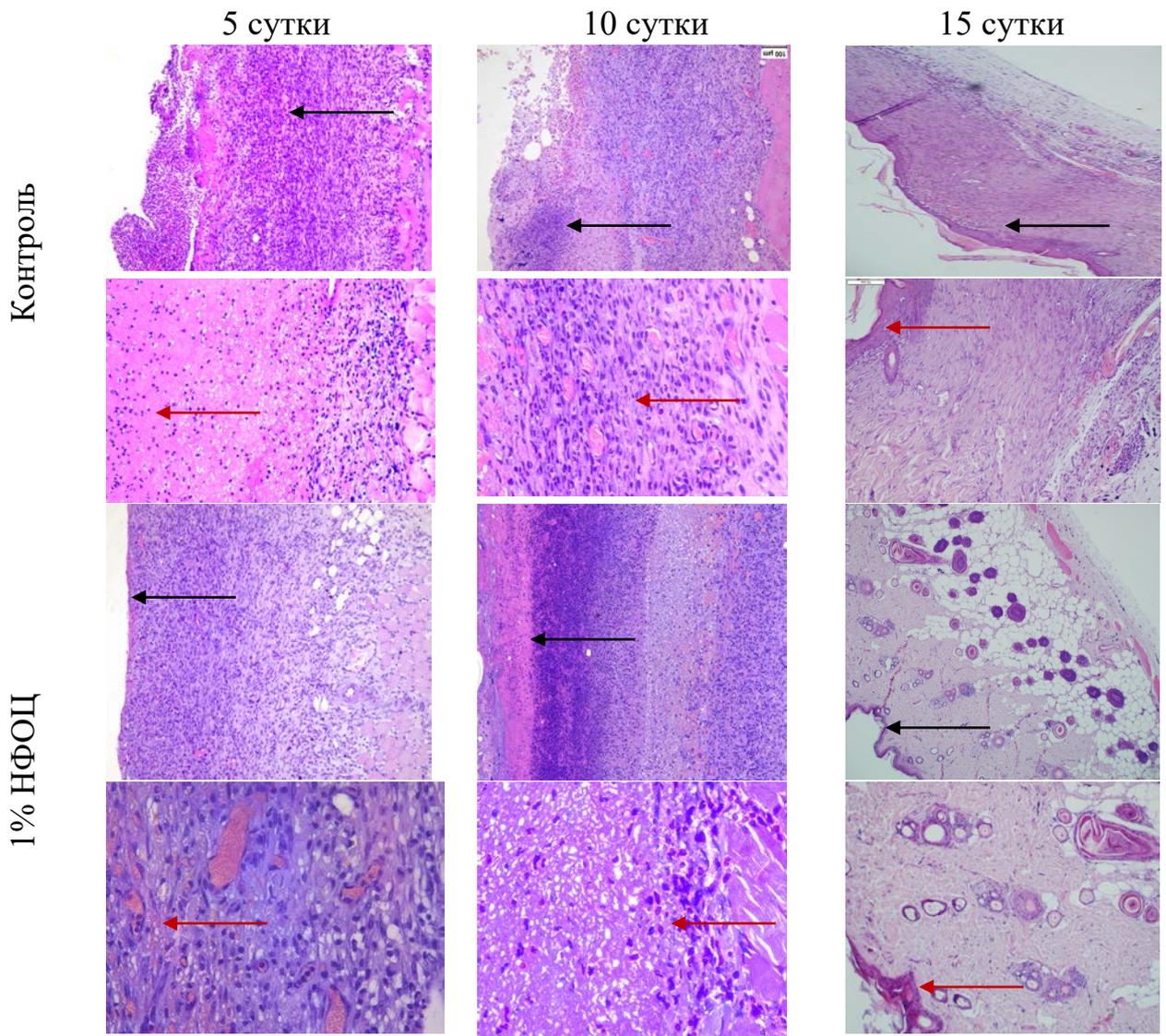


Рисунок 16 – Микрофотографии регенерирующей циркулярной полнослойной кожной раны крысы на 5-е, 10-е и 15-е сутки после формирования кожного дефекта, гематоксилин и эозин: ув. 200х. Пояснения в тексте

подлежащий слой обильно инфильтрирован тучными клетками, макрофагами, фибробластами и лимфоцитами до границы клетчаточного подкожного слоя (стрелка красного цвета). К 15-м суткам в центральной части дна раны видны пучки фибрина, по периферии раневого дефекта определяются признаки реэпителизации (начальные) (стрелка черного цвета), в тонком слое созревающей грануляционной ткани сохраняются лимфоциты,

Таблица 8 – Интегральный анализ патоморфологических изменений в области регенерирующей раны кожи у крыс на фоне топического применения 1% коллоидным раствором наноформы оксида церия в форме гидрогеля по Shekhter и др.

Период оценки, сутки	Экспериментальная группа	Экссудация	Колонии и бактерии	Воспалительная инфильтрация	Нарушения микроциркуляции	Пролиферация фибробластов	Неоангиогенез	Превалирование гранулций	Зрелость гранулций	Фиброзная ткань
5	1% НФОЦ	1	0	2	1	1	2	3	2	0
	Контроль	3	0	3	3	0	0	2	1	0
10	1% НФОЦ	0	0	1	0	3	3	2	3	2
	Контроль	2	0	2	2	2	1	3	2	1
15	1% НФОЦ	0	0	0	0	0	2	2	0	3
	Контроль	1	0	1	1	1	3	0	2	2

Примечания: 0 – отсутствие признака / легкая выраженность, 2 – умеренная выраженность, 3 – выраженная (высокая) степень наличия (тяжести) признака (процесса)

макрофаги, а также нейтрофильные гранулоциты в небольшом количестве (стрелка красного цвета).

В экспериментальной группе животных, получавших местное воздействие на рану гидрогелем с 1% коллоидным раствором наноформы оксида церия к 5-м суткам раневое ложе выстлано густым фибриновым слоем с обилием нейтрофильных гранулоцитов в более глубоком слое (стрелка черного цвета), нижележащий слой, выполненный свежими грануляционными тканями захватывает собственную фасцию (стрелка черного цвета), грануляционная ткань включает макрофаги, лимфоциты. Фибробласты, имеющие овальную и веретеновидную форму, ориентированы параллельно друг другу, имеются кровеносные капилляры в значительном числе (стрелка красного цвета).

К 10-м суткам раневое ложе заполнено фибриновыми пучками, в нижележащих отделах – созревающие грануляционные ткани, густо инфильтрированные фибробластами, имеющими овальную и веретеновидную форму, а также формирующимися кровеносными капиллярами. Некоторые кровеносные капилляры устремлены вертикально (стрелка черного цвета). Хорошо заметная диффузная нейтрофильно-лимфомакрофагальная инфильтрация (стрелка красного цвета). К 15-м суткам представляет собой реэпителизированный кожный дефект (стрелка черного цвета), при этом слой дермы выполнен в том числе зрелыми пучками коллагеновых волокон.

Окрашивание ткани раневого дефекта по Ван-Гизону (цитохимическая реакция) (рисунок 17) обнаруживало масштабную коллагеновую экспансию вследствие чрезмерной пролиферации фибробластов в фокусе асептической воспалительной реакции, у экспериментальных животных, начиная с 10-х суток патологического состояния в контроле.

Местное воздействие на рану экспериментальных крыс гидрогелем с 1% коллоидным раствором наноформы оксида церия один раз в сутки сопровождалось ограничением экспансии коллагена на 10-е сутки

наблюдения над животными, что, вероятно, было сопряжено с сокращением фазы пролиферации фибробластов. При этом, к 15 суткам наблюдали умеренное присутствие организованных коллагеновых волокон в ткани дермы реэпителизированной кожной раны.

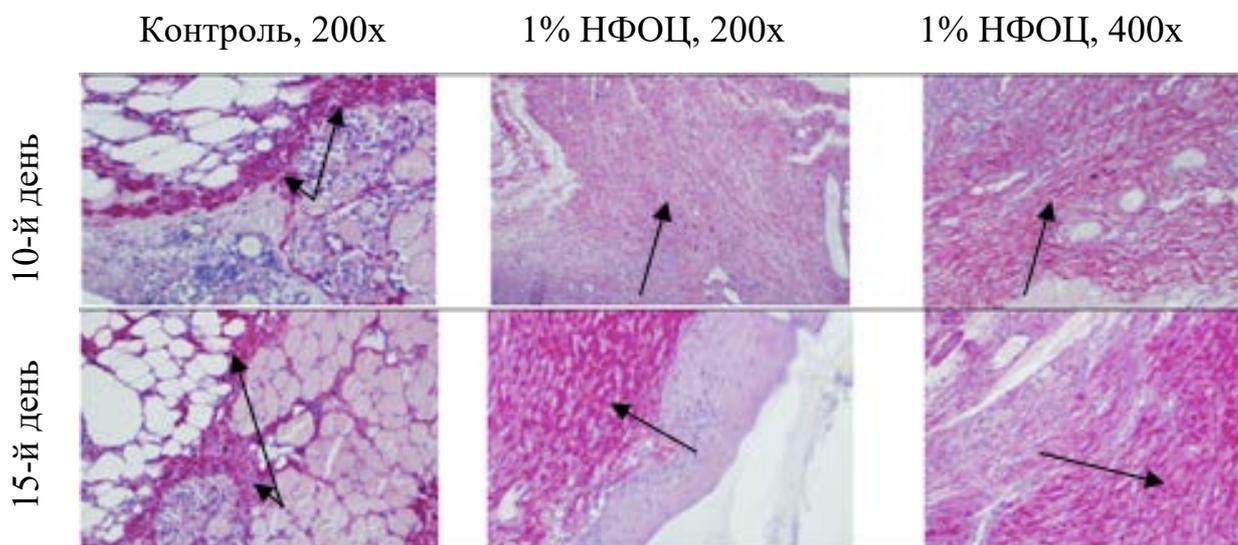


Рисунок 17 – Цитохимическая окраска микропрепарата регенерирующего кожного дефекта крысы Sprague-Dawley фуксином (по Ван-Гизону), 10-е и 15-е сутки регенерации раны, ув. 200x, 400x. Черные стрелки указывают окрашенные фуксином волокна коллагена. В препарата животного контрольной группы ориентированные хаотично тонкие волокна коллагена пенетрируют прилежающую ткань до мышечного слоя. Локальное использование 1% коллоидным раствором наноформы оксида церия приводит к формированию к 10-м суткам процесса ранозаживления организованных компактных масс коллагеновых волокон, представленных единым коллагеновым слоем, с явной трансформацией в ограниченное фиброзное состояние к 15-м суткам наблюдения

Таким образом, патоморфологически ранозаживление полнослойной циркулярной кожной неосложненной раны у крыс было представлено воспалительным асептическим процессом с выраженным интерстициальным отеком, гистиоцитарной и лимфоидной инфильтрацией тканей ложа раны и окружающих тканей к 5-10-м суткам после экспериментального моделирования раневого кожного дефекта, трансформирующимся в формирование фиброзной грубой рубцовой ткани к 20-м суткам наблюдения.

Топическое применение гидрогеля с 1% коллоидным раствором наноформы оксида церия ограничивало распространенность и глубину воспалительной реакции, сокращало масштаб инфильтративного процесса, способствовало ускорению созревания грануляционной ткани и начала реэпителизации.

3.4 Влияние топического применения водорастворимого гидрогеля с 1% коллоидным раствором наночастиц оксида церия на воспалительную реакцию и антиоксидантный потенциал тканей раны

При проведении визуального наблюдения за эволюционирующей кожной раной, выполнении патоморфологического исследования в динамике бы установили, что в контрольной серии у животных полнослойный дефект кожи вызывает развитие интенсивной воспалительной реакции, во-многом определяющей последующие сроки заживления и его результат. Местное воздействие 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в смеси с N-ацетил-6-аминогексановой кислотой в форме водорастворимого гидрогеля сдерживает масштаб воспаления, ускоряет заживление раны с лучшим, чем в контроле косметическим результатом.

Поскольку, как мы уже указывали в литературном обзоре, в основе формирования воспаления лежит продукция провоспалительных цитокинов и хемокинов тучными, дендритными клетками, клетками Лангерганса, макрофагами, а также активация процессов свободнорадикальной липопероксидации, представляло большой научно-практический интерес изучить цитокиновый статус и активность антиоксидантных механизмов в регенерирующей ране под действием 1% НФОЦ. Для этого на 5 сутки наблюдения у 5 экспериментальных животных каждой серии, отобранных случайным образом и выведенных из эксперимента, острым способом забирали грануляционную ткань, в которой определяли количественное содержание провоспалительных цитокинов ФНО-альфа и ИЛ-1бета, а также противовоспалительного цитокина ИЛ-10 методом ИФА типа «сэндвич».

Кроме того, на 5 сутки, а также на 10 сутки наблюдения в грануляционной ткани определяли активность свободнорадикальных реакций и уровень антиоксидантной защиты. Результаты представлены на рисунке 18 и в таблице 9.

В эпидермисе интактной кожи крыс определяются исследуемые цитокины в следующих концентрациях: ФНО-альфа – $2,4 \pm 0,3$ пг/г, ИЛ-1бета – $2,1 \pm 0,2$ пг/г, концентрация противовоспалительного цитокина ИЛ-10 составляет в среднем $3,9 \pm 0,4$ пг/г. Полученные значения говорят о том, что в интактной коже превалируют «защитные» клеточные стимулы.

В контрольной группе животных к 5-м суткам наблюдения регистрировали резкий рост тканевой концентрации провоспалительных цитокинов: ФНО-альфа – до $2,4 \pm 0,3$ пг/г и ИЛ-1бета – до $2,1 \pm 0,2$ пг/г ($p < 0,05$ при сравнении с интактным эпидермисом). Наряду с этим уровень противовоспалительного цитокина ИЛ-10 в грануляционных тканях раны хотя и повышался до $2,4 \pm 0,3$ пг/г ($p < 0,05$ при сравнении с интактным эпидермисом), но не достигал значений провоспалительных маркеров, что создавало воспалительный дисбаланс межклеточной сигнализации в очаге ранозаживления.

Местное воздействие 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в смеси с N-ацетил-6-аминогексановой кислотой в форме водорастворимого гидрогеля у животных к 5-м суткам наблюдения приводило к ограничению роста тканевой концентрации провоспалительных цитокинов: ФНО-альфа – до $2,4 \pm 0,3$ пг/г и ИЛ-1бета – до $2,1 \pm 0,2$ пг/г ($p < 0,05$ при сравнении с контрольными животными), однако значения показателей не достигали уровня неизменной кожи. Наряду с этим уровень противовоспалительного цитокина ИЛ-10 в грануляционных тканях раны значительно повышался до $2,4 \pm 0,3$ пг/г ($p < 0,05$ при сравнении с контрольными животными), что создавало благоприятный баланс межклеточной сигнализации в очаге ранозаживления.

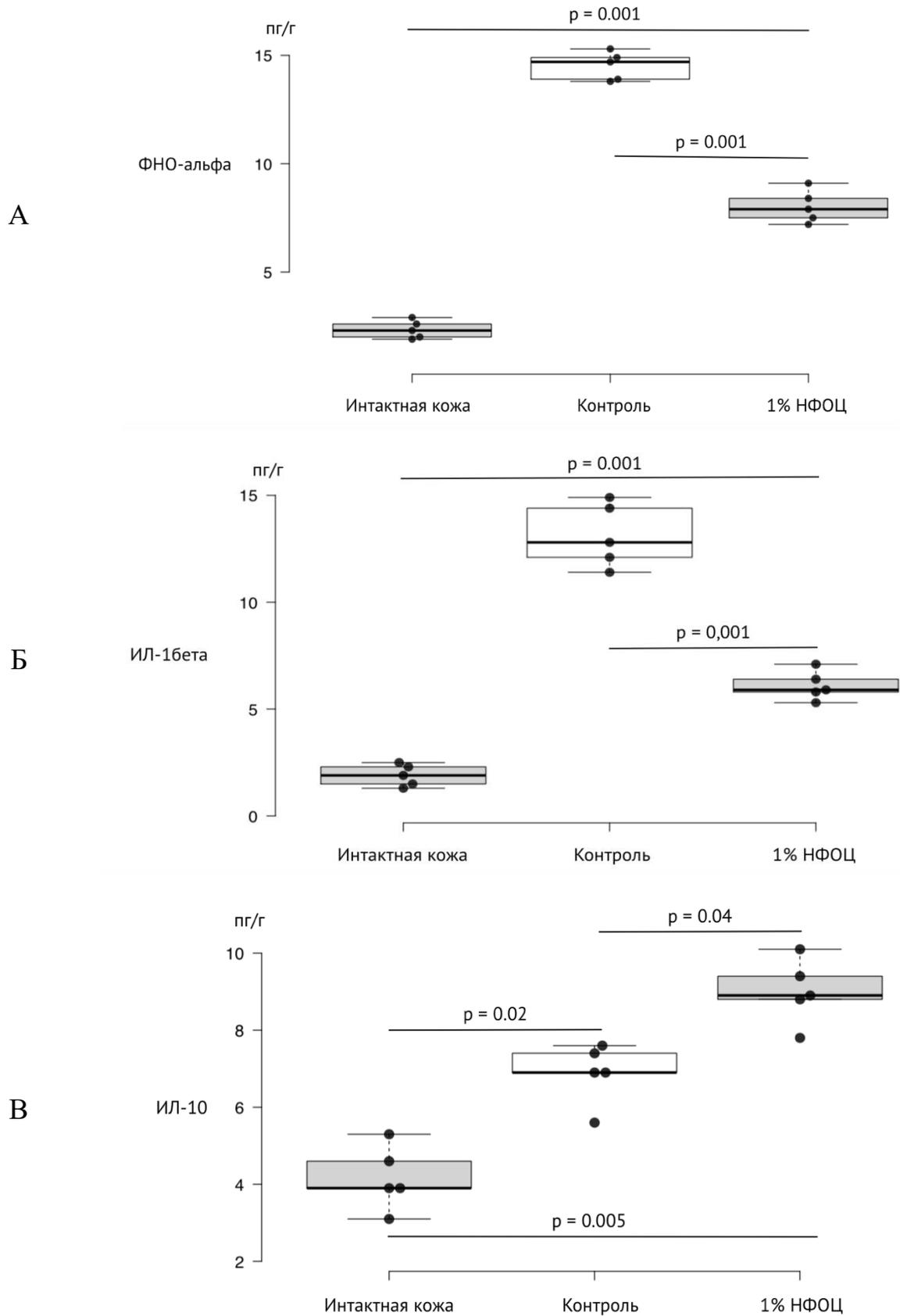


Рисунок 18 – Концентрация провоспалительных (ФНО-альфа (А), ИЛ-16ета (Б)) и противовоспалительных (ИЛ-10 (В)) цитокинов в ткани кожной раны крысы на 5 сутки после операции и локального воздействия 1% НФОЦ

На 5-е и 10-е сутки изучили тканевую активность совобонорадикальных окислительных процессов и антиоксидантный потенциал регенерирующих тканей кожной плонослойной раны лабораторных крыс с использованием признанного современным эталонным методом индуцированным железом хемилюминисценции. Результаты, выраженные в активности светооптической вспышки в единицу времени, представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Интенсивность гидроперекисных свободнорадикальных процессов (ГСП) и антиоксидантного потенциала (ААП) грануляционной ткани кожной полнослойной неосложненной раны лабораторных крыс на фоне топического воздействия 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в гидрогеле (1% НФОЦ)

Экспериментальная группа	Активность железо-индуцированной хемилюминисценции ($\times 10^3$ импульсов / с)			
	5-е сутки		10-е сутки	
	ГСП	ААП	ГСП	ААП
Интактная кожа ^A	2.7 ± 0.3	3.3 ± 0.2	3.0 ± 0.2	3.1 ± 0.3
Контроль	$9.2 \pm 0.5^*$	$0.4 \pm 0.1^*$	$5.4 \pm 0.2^{*\dagger}$	$1.5 \pm 0.5^{*\dagger}$
1% НФОЦ	$5.7 \pm 0.4^{*\#}$	$2.3 \pm 0.3^{*\#}$	$3.8 \pm 0.4^{\#\dagger}$	$4.7 \pm 0.4^{\#\dagger}$

Примечания: ^A – результаты получены в нашей экспериментальной операционной в совместном исследовании с кандидатом медицинских наук Д.В. Пахомовым; * $p < 0,05$ при сравнении с интактной кожей лабораторных животных; # $p < 0,05$ при сравнении с тканью раны экспериментальных животных с полнослойной циркулярной кожной раной лабораторных животных (одномерный дисперсионный анализ, ANOVA; критерий Тьюки); † $p < 0,05$ при сравнении с соответствующим показателем, зарегистрированным на 5-е сутки наблюдения (критерий Уилкоксона)

В эпидермисе неизменной кожи лабораторных крыс регистрировали баланс между активностью свободнорадикальных реакций и активностью защитного антиоксидантного механизма: показатель интенсивности гидроперекисного процесса равнялся $2,7 \pm 0,3$ имп. / с, антиоксидантная активность колебалась в пределах 3.2 ± 0.2 имп. / с. Формирование

экспериментальной циркулярной полностлойной раны к 5 суткам раневого процесса сопровождалось ростом активности гидроперекисных реакций до $9,2 \pm 0,5$ ($p < 0,05$ при сравнении с эпидермисом неизменной кожи) на фоне одновременного резкого подавления антиоксидантных механизмов – параметр ААП драматически снижался и составлял лишь $0,4 \pm 0,1$ ($p < 0,05$ при сравнении с эпидермисом неизменной кожи).

Локальное применение в течение 4 предшествующих измерениям суток 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в гидрогеле приводило к сдерживанию чрезмерного повышения свободнорадикальных реакций – показатель ГСП не превышал значений $5,7 \pm 0,4$ имп. / с ($p < 0,05$ при сравнении с эпидермисом неизменной кожи, а также с соответствующим показателем в контроле). При этом, в отличие от контроля, антиоксидантная защита сохранялась на значимом уровне, для балансирования и сдерживания свободнорадикальных реакций: значение ААП достигало $2,3 \pm 0,3$ имп. / с ($p < 0,05$ при сравнении с эпидермисом неизменной кожи, а также с соответствующим показателем в контроле).

Эволюция экспериментальной циркулярной полностлойной раны приводила в контроле к 10 суткам патологического процесса сопровождалось закономерным снижением активности гидроперекисных реакций до $5,4 \pm 0,2$ ($p < 0,05$ при сравнении с эпидермисом неизменной кожи, а также соответствующим показателем на 5-е сутки патологического процесса) на фоне одновременного постепенного восстановления активности антиоксидантных механизмов – параметр ААП повышался и составлял уже $1,5 \pm 0,5$ ($p < 0,05$ при сравнении с эпидермисом неизменной кожи и соответствующим показателем в контроле на 5-е сутки раневого процесса).

Продолжение топического использования еще в течение 5 последующих суток 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в гидрогеле индуцировало дальнейшее сдерживание чрезмерного повышения свободнорадикальных реакций – показатель ГСП не превышал значений $3,8 \pm 0,4$ имп. / с ($p < 0,05$ при сравнении с эпидермисом неизменной кожи,

контрольными значениями, а также с соответствующим показателем в контроле). При этом, в отличие от контроля, антиоксидантная защита не только сохранялась на значимом уровне, для балансирования и сдерживания свободнорадикальных реакций, но превышала соответствующие контрольные значения: значение ААП достигало $4,7 \pm 0,4$ имп. / с ($p < 0,05$ при сравнении с эпидермисом неизменной кожи, а также с соответствующим показателем в контроле).

Полученные результаты позволяют заключить, что местное применение 1% НФОЦ однократно в сутки модулирует баланс между свободнорадикальными и антиоксидантными механизмами, позволяет избежать чрезмерной активации липопероксидации, что, в комплексе с другими факторами, обеспечивает сдерживать течение воспалительной фазы раневого процесса и ускорять ранозаживление.

3.5 Ангиогенез в регенерирующей кожной ране и влияние на него местного применения наночастиц оксида церия

Одним из важнейших тканевых процессов, лежащих в основе регенеративного процесса в организме высших млекопитающих и, в том числе, человека, является формирование новых кровеносных сосудов – ангиогенез. Ангиогенез обеспечивает потребности растущих, размножающихся и дифференцирующихся клеток в кислороде и нутриентах, и, следовательно, детерминирует сроки, направление и масштаб регенерации.

В нашем исследовании для изучения процесса ангиогенеза использовали два метода: метод иммуногистохимического окрашивания CD34+ эндотелия вновь образованных микрососудов, и второй – инновационный – подход был связан с применением метода лазерной speckle-фотометрии для фиксации кровотока в ткани в моменте времени.

Результаты ИГХ определения экспрессии CD34+ клеток и плотности сосудов представлены на рисунке 18.

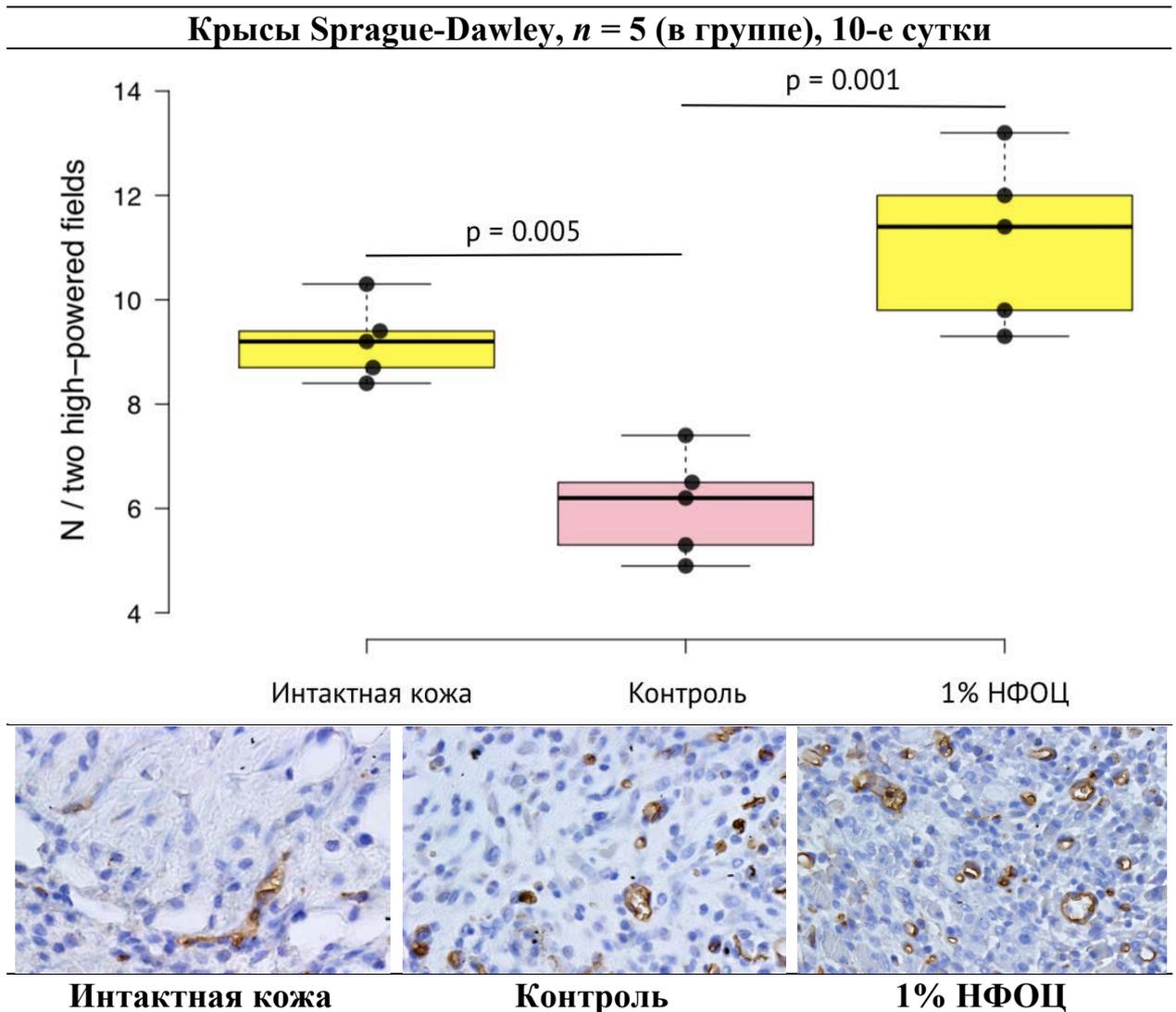


Рисунок 19 – Плотность сформированных капилляров и экспрессия CD34+ клетками эндотелия микрососудов кожи крыс Sprague-Dawley на 10-е сутки после формирования циркулярной полнослойной неосложненной кожной раны в контроле и на фоне локального использования 1% НФОЦ однократно в течение 9 дней предшествующих регистрации: плотность микрососудов в препарате представлено как $M \pm SD$, достоверность различий вычислена с использованием одномерного дисперсионного анализа, ANOVA и критерия Тьюки; окрашивание анти-CD34 кроличьими антителами, ИГХ, 400x

В интактной коже плотность микрокапилляров составляла $9,1 \pm 0,4$ на 1 cm^2 площади поверхности ткани, что также подтверждалось интенсивностью иммуногистохимической экспрессии CD34 позитивными эндотелиоцитами. Формирование кожной циркулярной неосложненной раны у крыс приводило к тому, что на 10-сутки наблюдения в регенерирующих тканях фиксировали

плотность микроциркуляторного русла на уровне $6,2 \pm 0,6$ на 1 см^2 площади поверхности ткани ($p = 0,005$ при сравнении с интактной кожей).

Топическое применение 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в гидрогеле в течение 9 суток, предшествующих анализу, приводило к росту интенсивности неоангиогенеза, что было наглядно видно по увеличению экспрессии CD34 эндотелиоцитами формирующихся кровеносных капилляров, обеспечивающих плотность микрососудов на уровне $11,3 \pm 0,5$ на 1 см^2 площади поверхности ткани ($p = 0,005$ при сравнении с контрольными животными).

В качестве неинвазивного прижизненного метода изучения уровня ангиогенеза использовали инновационную методику лазерной speckle-фотометрии. Метод основан на отражении пучка лазерного излучения движущимися эритроцитами кровеносных сосудов, расположенными на глубине до $0,1 - 0,2$ мм от поверхности, к которой приложен излучающий датчик. Поток отраженного излучения преобразуется в цветной спектр, желто-красная гамма которого соответствует кровоснабжаемым тканям, тогда как сине-голубая – тканям с обедненным или отсутствующим кровотоком. В настоящем исследовании метод использован для оценки интенсивности кровотока в моменте времени впервые.

Интерпретация результатов производилась по расчету интегрального показателя, учитывающего интенсивность и распространенность красного цвета на единицу площади раневой поверхности. Результаты измерений представлены на рисунке 20 (фотографические изображения лазерных отраженных спектров) и таблице 10 (значения интегральных показателей кровотока).

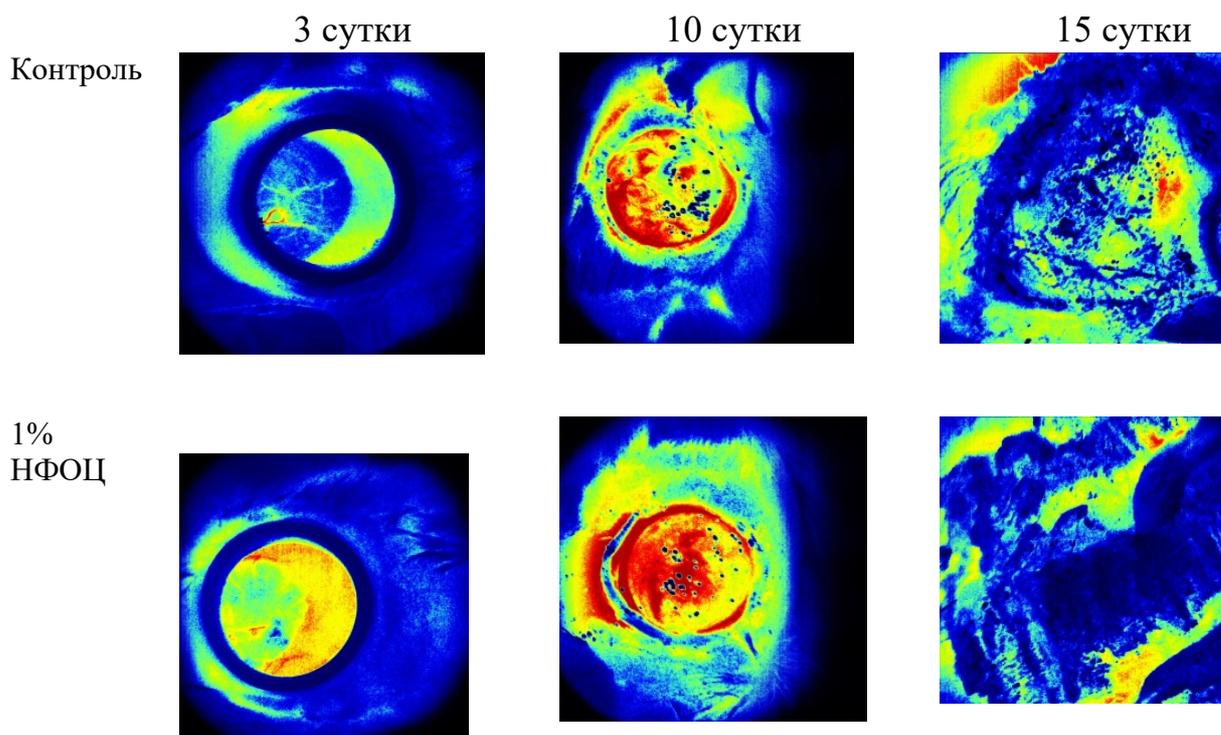


Рисунок 20 – Лазерные спектры с поверхности интактной кожи (А) и раневой поверхности на различных этапах эволюции процесса заживления: Б – животных контрольной серии опытов; В – животных, получавших в течение предшествующего измерению времени 1% коллоидный раствор наночастиц оксида церия местно в виде гидрогеля

На глубине 0,2 – 0,3 мм от поверхности интактной кожи лабораторных грызунов регистрируется слабая интенсивность кровотока, что обусловлено более глубоким залеганием кровеносных сосудов кожи животных: интегральный показатель на всем протяжении наблюдения колебался в пределах 1,2 – 1,7.

В контрольной группе животных к 5-м суткам наблюдения был зарегистрирован рост интегрального показателя до $5,1 \pm 0,3$ ($p < 0,05$ при сравнении с интактной кожей), что отражало патофизиологический процесс ангиогенеза в быстро размножающихся грануляционных тканях, выполняющих раневое ложе. К 10-м суткам в контрольной группе регистрировали максимальное значение интегрального показателя кровотока, $7,9 \pm 0,4$ ($p < 0,05$ при сравнении с интактной кожей, с исходным показателем). На 15-е сутки эксперимента, вследствие начала процесса

реэпителизации полнослойной циркулярной кожной раны, значение интегрального показателя снижалось до $2,4 \pm 0,5$ ($p < 0,05$ при сравнении с исходным показателем), что не имело достоверных отличий от интактной кожи лабораторных животных.

Таблица 10 – Интегральные показатели интенсивности регионарного кровотока по данным лазерной speckle-фотометрии интактной кожи и раневой поверхности на фоне 1% НФОЦ

Экспериментальная группа	Время наблюдения		
	5-е сутки	10-сутки	15-сутки
Интактная кожа	n = 15 $1,2 \pm 0,2$	n = 10 $1,7 \pm 0,3$	n = 5 $1,5 \pm 0,4$
Контроль	n = 15 $5,1 \pm 0,3^*$	n = 10 $7,9 \pm 0,4^{*\#}$	n = 5 $2,4 \pm 0,5^\#$
1% НФОЦ	n = 15 $8,4 \pm 0,4^{*\dagger}$	n = 10 $4,8 \pm 0,3^{*\#\dagger}$	n = 5 $1,4 \pm 0,4^\#$

Примечания: $^\# p < 0,05$ при сравнении с соответствующим показателем, зарегистрированным на 5-е сутки наблюдения (критерий Уилкоксона); $^* p < 0,05$ при сравнении с интактной кожей лабораторных животных; $^\dagger p < 0,05$ при сравнении с тканью раны экспериментальных животных с полнослойной циркулярной кожной раной лабораторных животных (одномерный дисперсионный анализ, ANOVA; критерий Тьюки)

В группе животных, получавших топическое лечение 1% коллоидным раствором наночастиц церия в виде гидрогеля, к 5-м суткам наблюдения был зарегистрирован максимальный рост интегрального показателя регионарного кровотока в моменте времени до $8,4 \pm 0,4$ ($p < 0,05$ при сравнении с интактной кожей и с животными контрольной группы), что свидетельствовало об ускорении патофизиологического процесса ангиогенеза, обеспечивающего потребности в быстро размножающихся грануляционных тканях, выстилающих дно раны. К 10-м суткам в экспериментальной группе 1% НФОЦ регистрировали снижение значения интегрального показателя кровотока до $4,8 \pm 0,3$ ($p < 0,05$ при сравнении с

интактной кожей, с исходным показателем и с соответствующим показателем в контроле). На 15-е сутки эксперимента, вследствие завершения процесса реэпителизации и заживления полнослойной циркулярной кожной раны, значение интегрального показателя снижалось до не отличающегося от интактной кожей значения $1,4 \pm 0,4$ ($p < 0,05$ при сравнении с исходным показателем).

Следовательно, метод лазерной speckle-фотометрии может с успехом быть использован для оценки регионарного поверхностного кровотока как индикатор эволюции раны и активности ангиогенеза.

3.6 Проллиферативный потенциал клеток и тканей регенерирующей кожной раны под действием топического применения наночастиц оксида церия

Фундаментальной основой восстановления целостности дефекта ткани служит формирование достаточной клеточной массы вследствие миграции в очаг поражения клеток-предшественников, их размножения, дифференцировки и созревания. Внутриклеточным маркером пролиферации и дифференцировки является цитоплазматический Ki67, при этом, указанный фактор неспецифичен и экспрессируется подавляющим большинством пролиферирующих клеток. Известно, что основная (по количеству) клеточная популяция, определяющая тканевую репарацию раны, формирующая грануляционную ткань, представлена фибробластами. Специфическим маркером, позволяющим судить об активности пролиферации фибробластов, может служить рецептор фактора роста фибробластов 3 (FGFR3) и экспрессия одноименного гена, его кодирующего.

Для решения задач настоящего исследования оценили влияние топического применения 1% НФОЦ на экспрессию Ki67 и экспрессию гена *FGFR3* в грануляционной ткани, выстилающей дно раневого ложа животных экспериментальных групп. Результаты представлены на рисунках 21 и 22.

Уровень клеточной экспрессии Ki67 неизменной кожей регистрировали в пределах $7,3 \pm 0,6\%$ позитивных клеток. Такой показатель обусловлен естественными процессами обновления популяции кожного эпидермиса. В контрольной серии опытов на 10-сутки наблюдения наблюдали рост экспрессии клеточного маркера пролиферации до $11,3 \pm 0,5\%$. Маркер экспрессировали преимущественно пролиферирующие клетки грануляционной ткани, чем и был обусловлен рост экспрессии.

В группе животных, получавших топическое лечение 1% коллоидным раствором наночастиц церия в виде гидрогеля, на 10-е сутки эволюции циркулярной кожной полнослойной раны $11,3 \pm 0,5\%$ пролиферирующих и дифференцирующихся клеток экспрессировали Ki67. И, хотя к этому сроку закрытие ложа раны уже произошло, столь высокая экспрессия была обусловлена главным образом дифференцировкой клеток.

Также на рассматриваемом сроке наблюдения обнаруживали конгруэнтные изменения экспрессии гена рецептора фактора роста фибробластов 3 типа, что свидетельствовало о стимуляции и ускорения дифференцировки специализированных клеток кожи под действием топического применения 1% НФОЦ.

Крысы Sprague-Dawley, $n = 5$ (в группе), 10-е сутки

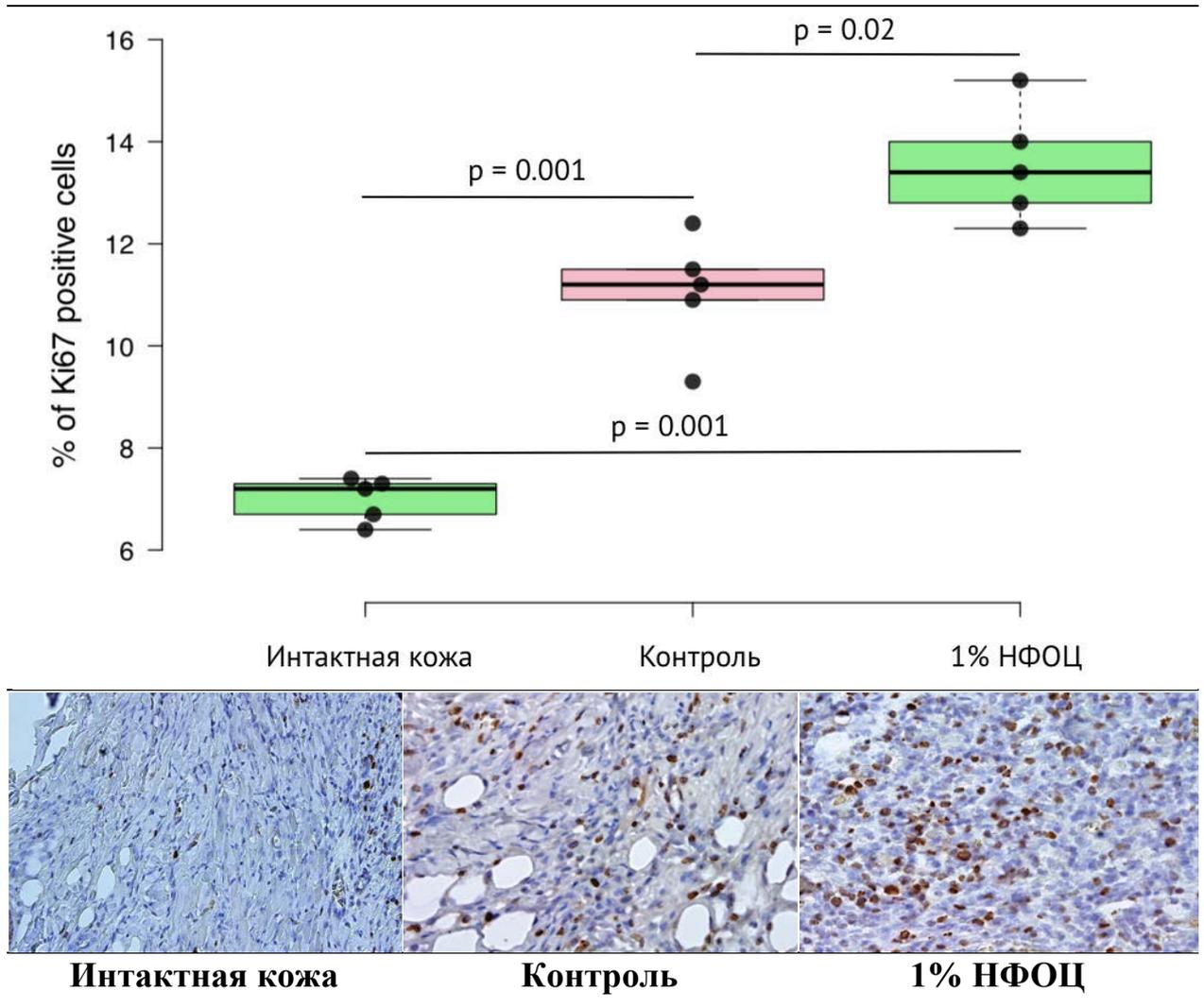


Рисунок 21 – Уровень экспрессии Ki67 клетками интактной кожи и грануляционной ткани кожной циркулярной неосложненной раны крыс Sprague-Dawley на 10-е сутки эксперимента в контроле и на фоне топического применения 1% НФОЦ; количественное определение Ki67-позитивных клеток дано как $M \pm SD$; статистическая достоверность различий определена одномерным дисперсионным анализом с последующим применением ANOVA и критерия Тьюки; микропрепараты срезов раны окрашивали моноклональными кроличьими анти-Ki67-антителами, 400x

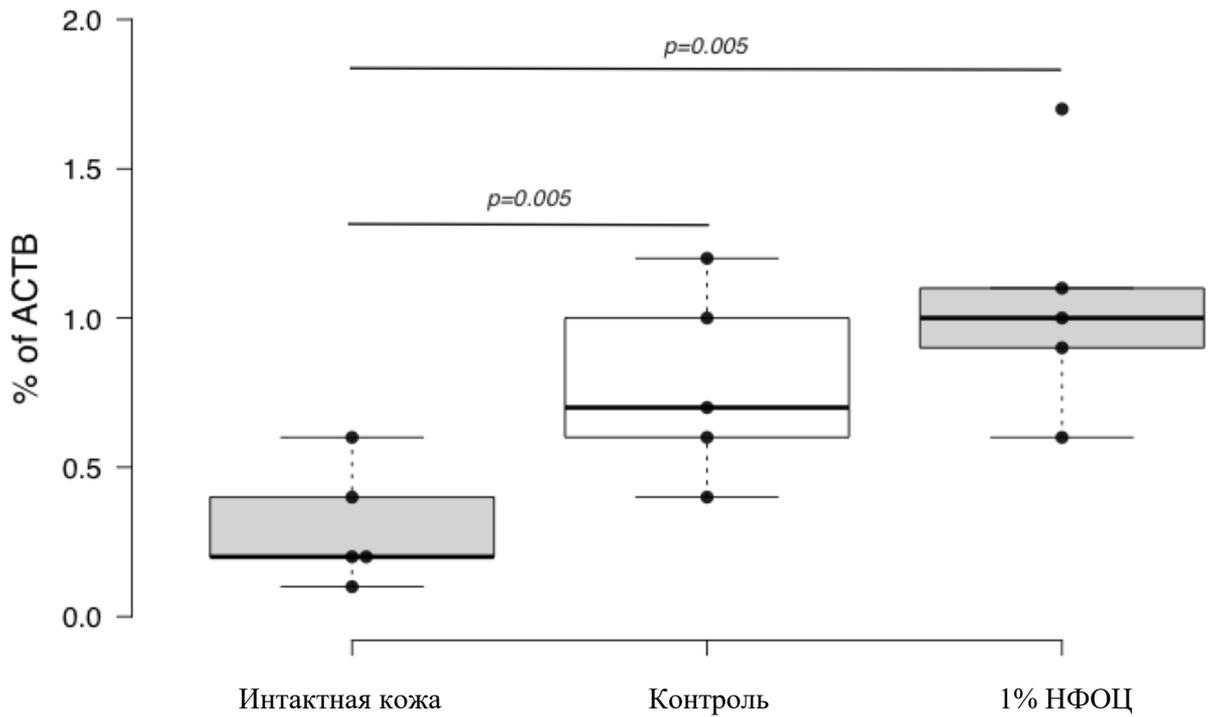


Рисунок 22 – Уровень экспрессии транскрипта гена *FGFR3*, выраженной в % к концентрации мРНК гена *ACTB*, в ткани, выполняющей раневое ложе кожного циркулярного полнослойного дефекта крыс на 10-е сутки патологического процесса в контроле и под действием локального применения 1% НФОЦ ежедневно; $M \pm SD$; статистическая значимость различий определена одномерным дисперсионным анализом с последующим использованием, ANOVA и критерия Тьюки

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ Z-ОБРАЗНОЙ ПЛАСТИКИ ДЕФЕКТА КОЖИ МИНИПИГОВ НА ФОНЕ ТОПИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЦЕРИЯ В ВИДЕ ГИДРОГЕЛЯ

Начиная со вторых суток послеоперационного периода ежедневно в утреннее время минипигам опытной группы на пластический шов наносили наноформу оксида церия в виде 1% гидрогеля. Животным контрольной группы наносили гидрогель без присутствия наночастиц оксида церия. На 10 сутки швы снимали.

В процессе оценки ранозаживления, также и на предыдущем этапе экспериментально-хирургического исследования, определяли время полного закрытия раневого дефекта, а также измеряли площадь кожного соединения в контроле и у животных, получавших местно наноформу коллоидного раствора оксида церия в смеси с N-ацетил-6-гексаноатом церия в виде 1% гидрогеля. Результаты представлены в таблице 11.

В контрольной серии опытов время полного ранозаживления составляло в среднем 16 ± 2 суток, тогда как при локальном ежесуточном нанесении наноформы коллоидного раствора оксида церия в смеси с N-ацетил-6-гексаноатом церия в форме 1% гидрогеля закрытие дефекта проходило статистически значимо быстрее и составляло 10 ± 2 суток ($p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой).

Также изменялась и площадь рубцового соединения в исходе кожно-пластического z-образного процесса с моделированием перемещаемых лоскутов по Лимбергу: в группе контрольных лабораторных минипигов она была равна 418 ± 12 мм², а на фоне локального применения наноформы 1% оксида церия в гидрогеле снижалась до 265 ± 14 мм² ($p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой).

На 20 сутки животные выводились из эксперимента под севофлурановым наркозом. Участок кожи, подкожно-жировой клетчатки, на

протяжении 8 мм от раны иссекали и после определения размеров кожного соединения помещали в стерильный охлажденный изотонический 0,9% раствор хлорида натрия для проведения измерений прочности рубцового соединения.

Таблица 11 – Быстрота полного закрытия кожно-пластического соединения минипига и площадь рубцового соединения на фоне местного нанесения 1% НФОЦ (n = 5 в каждой группе)

Группа животных	Кратность местного применения	Время полного закрытия раны, сутки (M ± SD)	Площадь кожного рубца, мм² (M ± SD)
Контроль (гидрогелевый матрикс)	1 раз в сутки	16 ± 2	418 ± 12
1% НФОЦ	1 раз в сутки	10 ± 2*	265 ± 14*

Примечание: * $p < 0,05$ достоверность различий при сравнении с контролем (одномерный дисперсионный анализ, критерий Манна-Уитни)

Измерение проводили на специально сконструированном приборе на основе динамометра Ugo Basile (Италия) путем определения силы, прилагаемой для разрыва кожного соединения. Сравнивали с силой разрыва интактного участка кожи того же животного (рисунок 22).

Измерение прочности кожи интактных животных проводили в совместных исследованиях с к.м.н. Д.В. Пахомовым [164-168]. Прочность интактной кожи самцов минипигов в среднем составляла 3628 г/см² (рисунок 22).

Прочность рубцового соединения в исходе неосложненной кожной раны в контрольной группе животных заметно снижалась в среднем на 48% и достигала значения 1234 г/см² ($p = 0,001$ при сравнении с интактной группой).

Топическое нанесение один раз в сутки в течение 19 суток 1% коллоидного оксида церия в форме наночастиц в гидрогеле сопровождалось значимым повышением прочностных характеристик рубца – сила, требовавшаяся для разрыва кожного соединения возрастала до 2157 г/см² ($p = 0,001$ при сравнении с контрольной группой), однако, не достигала значений интактной кожи ($p = 0,001$ при сравнении с интактной группой).

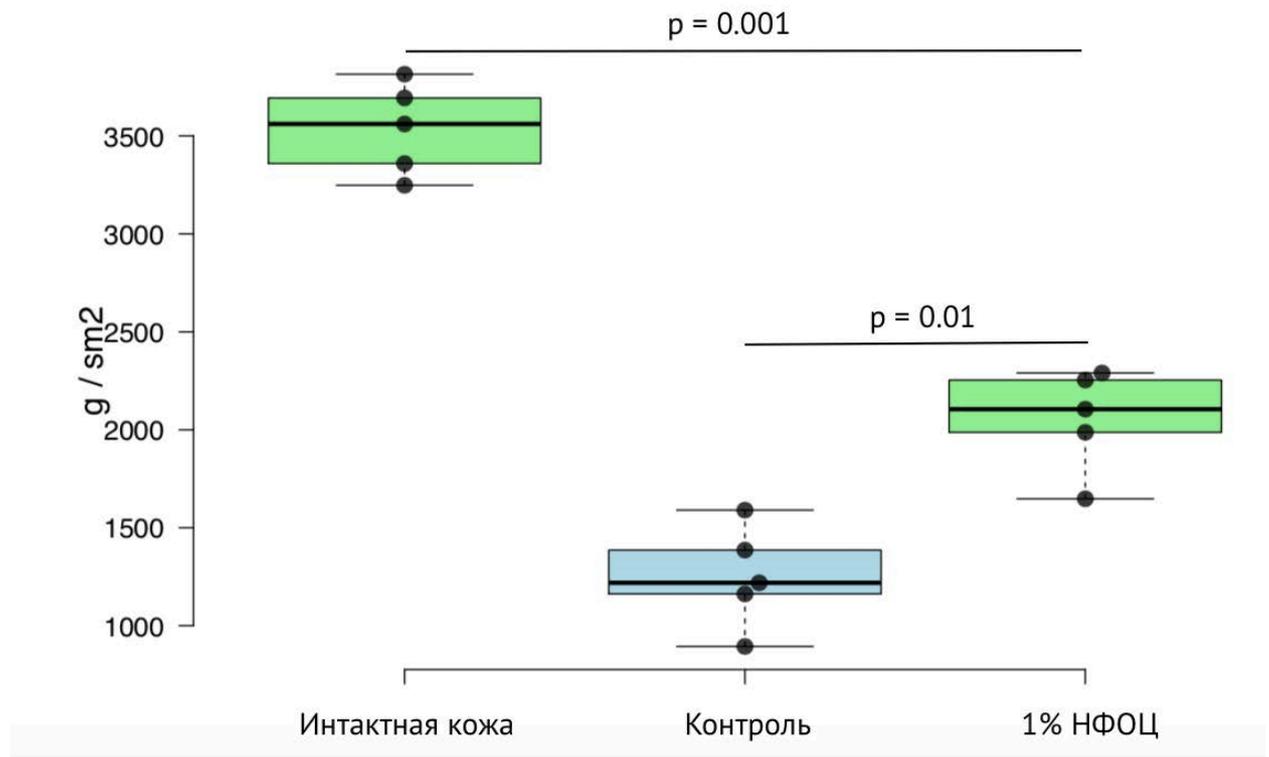


Рисунок 23 – Прочность рубцового кожно-пластического соединения в исходе Z-образной пластики неосложненной раны с планированием перемещаемых кожных лоскутов по Лимбергу минипигов (измерение проведено на 20 сутки) на фоне локального применения 1% коллоидного раствора наноформы оксида церия в виде гидрогеля: достоверность различий определяли с помощью критерия ANOVA с последующим применением критерия Тьюки после проверки нормальности распределения одномерным дисперсионным анализом

При интегральной оценке эффективности ранозаживления в исследуемых группах с использованием универсальной международной шкалы SCAR нами были получены следующие результаты, представленные в

Таблица 12 – Критерии оценки косметических характеристик рубца в исходе кожной раны в контроле на 20 сутки по шкале SCAR

Показатель	Критерии оценки	Баллы / n*
1	2	3
Распространение шрама	Нет/почти невидимый	0
	Тонкая линия	1
	Слабое распространение, заметное при ближайшем рассмотрении	2 / 1
	Умеренное распространение, очевидные рубцы	2 / 3
	Серьезное распространение	4 / 1
Эритема	Отсутствует	0
	Светло-розовый, могут присутствовать телеангиэктазии	1 / 2
	Красный, может присутствовать множество телеангиэктазий	2 / 3
	Темно-красный или фиолетовый	3
Диспигментация	Отсутствует	0
	Присутствует	1 / 5
Следы швов	Отсутствует	0
	Присутствует	1 / 5
Гипертрофия/атрофия	Отсутствует	0
	Легкая: пальпируемая, едва заметная гипертрофия или атрофия	1 / 4
	Умеренная: отчетливо видная гипертрофия или атрофия	2 / 1
	Тяжелая: выраженная гипертрофия или атрофия или келоидное образование	3

Примечание: * число животных в группе, у которых регистрировали признак

таблицах 12 и 13 и на рисунках 24 и 25.

В контрольной группе животных при оценке распространенности рубца преобладали умеренно распространенные очевидные рубцы, при этом у 1 минипига отмечалось серьезное распространение рубцовой ткани за пределы первичного повреждения, еще у одного животного рубец был слабо заметен, лишь при ближайшем рассмотрении (рисунок 23).

Рубец имел эритематозный характер с телеангиэктазиями и явлениями диспигментации и следами швов у всех грызунов, входивших в группу контроля. Также у всех животных отмечали явления гипертрофии / атрофии от умеренной до выраженной степени. Общая интегральная оценка в баллах в этой группе составила 7,5 баллов (рисунок 24).

В группе минипигов, которым ежедневно наносили гидрогель, содержащий 1% коллоидный раствор наночастиц оксида церия, косметический результат претерпевал значительные изменения в сторону сокращения итогового балла (рисунок 24).

Так, при оценке распространенности рубца последний был представлен либо тонкой линией, либо слабым распространением очевидных рубцов, при этом лишь у 1 лабораторного животного умеренно распространенные очевидные рубцы выходили за пределы первичного повреждения. Рубец либо не имел эритематозных изменений (у 3 животных), либо имел слабо-эритематозный характер с единичными телеангиэктазиями без явлений депигментации и следов швов у большей части минипигов, входивших в группу, получавшую местно наноформу коллоидного раствора оксида церия в смеси с N-ацетил-6-гексаноатом церия в виде 1% гидрогеля. Также у подавляющего большинства лабораторных животных отмечали явления гипертрофии / атрофии легкой степени. Общая интегральная оценка в баллах в этой группе составила 4,1 балла ($p < 0,05$ при сравнении с контролем) (рисунок 24).

Таблица 13 – Критерии оценки косметических характеристик рубца в исходе кожной пластики раны с планированием лоскутов по Лимбергу в группе минипигов, получавшей 1% НФОЦ, на 20 сутки по шкале SCAR

Показатель	Критерии оценки	Баллы / n*
Распространение шрама	Нет/почти невидимый	0
	Тонкая линия	1 / 2
	Слабое распространение, заметное при ближайшем рассмотрении	2 / 2
	Умеренное распространение, очевидные рубцы	3 / 1
	Серьезное распространение	4
Эритема	Отсутствует	0 / 3
	Светло-розовый, могут присутствовать телеангиэктазии	1 / 2
	Красный, может присутствовать множество телеангиэктазий	2 / 3
	Темно-красный или фиолетовый	3
Диспигментация	Отсутствует	0 / 2
	Присутствует	1 / 3
Следы швов	Отсутствует	0 / 3
	Присутствует	1 / 2
Гипертрофия/атрофия	Отсутствует	0 / 3
	Легкая: пальпируемая, едва заметная гипертрофия или атрофия	1 / 2
	Умеренная: отчетливо видная гипертрофия или атрофия	2 / 1
	Тяжелая: выраженная гипертрофия или атрофия или келоидное образование	3

Примечание: * число животных в группе, у которых регистрировали признак

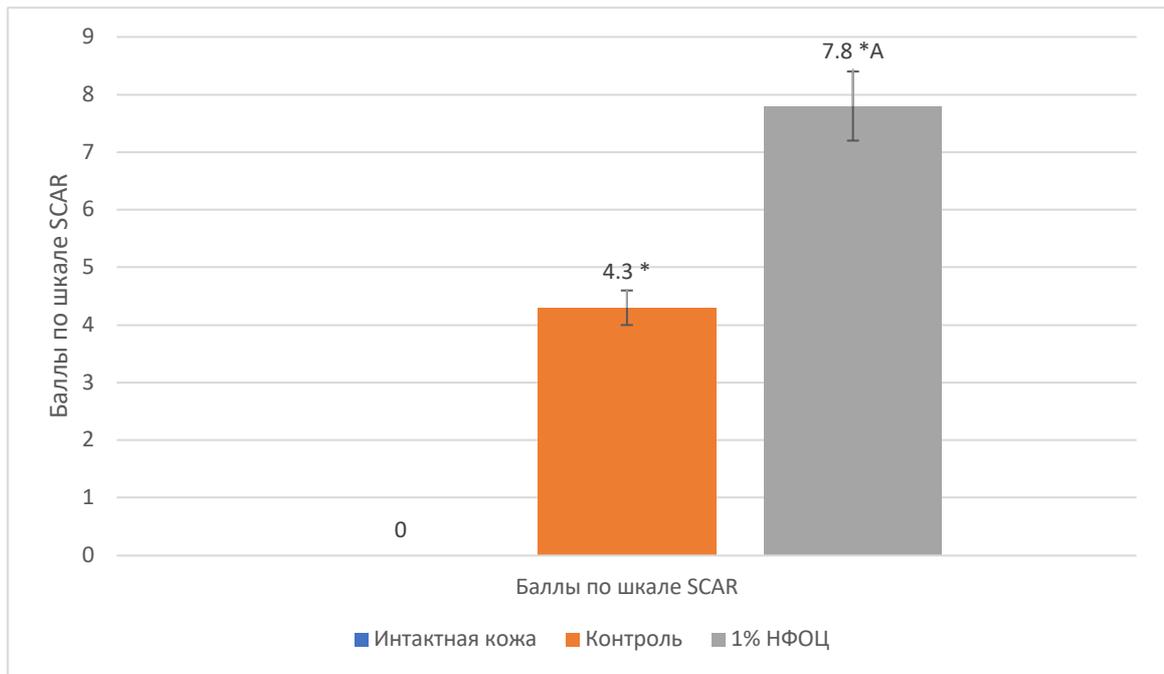


Рисунок 24 – Комплексная интегральная оценка косметического результата заживления кожной раны минипигов в исходе Z-образной пластики с планированием лоскутов по Лимбергу по международной шкале SCAR на фоне топического применения 1% НФОЦ; * $p < 0,05$ достоверность различий при сравнении с интактной кожей; ^A $p < 0,05$ достоверность различий при сравнении с контролем (одномерный дисперсионный анализ, критерий Манна-Уитни)

Следовательно, топическое использование 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в смеси с N-ацетил-6-аминогексановой кислотой в форме водорастворимого гидрогеля, ускорило заживление кожной раны в исходе Z-образной пластики с планированием перемещаемых кожных лоскутов по Лимбергу, приводило к повышению прочности рубцового соединения по сравнению с контролем, и сопровождалось благоприятными косметическими результатами в виде уменьшения площади поверхности рубца, отсутствия его депигментации, эритематозных изменений и телеангиэктазий, атрофических и гипертрофических процессов в области рубца.

ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Заживление раны – это тонко регулируемый патофизиологический процесс, который включает взаимодействие между резидентными клетками, популяциями мигрирующих в область повреждения инфильтрирующих клеточных популяций, молекулами межклеточного матрикса цито- и хемокинами. Последовательные этапы процесса ранозаживления направлены на достижение, с одной стороны, контроля над факторами внешней агрессии, эрадикации инородных тел и продуктов, и, с другой стороны, регуляции гомеостаза, направленной на обеспечение поддержания целостности тканей, обеспечение их функциональности в ответ на травматическое повреждение с последующей полной тканевой регенерацией [21, 22].

Рана – это повреждение или дезинтеграция нормальной анатомической структуры и функции ткани. Масштаб раневого кожного процесса колеблется в чрезвычайно широких пределах – от небольшого нарушения целостности эпидермиса до более глубоких поражений, достигающих дермы, или простирающихся до подкожных структур с повреждением мышц, сосудов, костей и внутренних органов [23]. В многочисленных работах было показано, что, несмотря на существенные различия в структурно-функциональной организации кожи и внутренних органов и способов поражения, процесс заживления раны характеризуется единой последовательностью связанных друг с другом событий с вовлечением различных типов клеток и межклеточных взаимодействий [24,169].

Кожный раневой процесс – это сложный и многоэтапный эволюционный процесс восстановления целостности поврежденных тканей на основе комплекса молекулярных, клеточных и тканевых взаимодействий. Вектор его развития определяется сочетанием природы, объема и глубины поражения кожи, внутренних факторов макроорганизма, и факторов внешней среды, воздействующих на кожный дефект на протяжении его закрытия. В этой связи хирургическое лечебное воздействие представляет собой один из

таких внешних факторов, направленный на оптимизацию локального раневого процесса и коррекцию негативных внешних факторов, осложняющих или затрудняющих ранозаживление.

Основной целью нашей работы явилось экспериментально-хирургическое обоснование эффективности применения гидрогеля на основе наночастиц оксида церия для лечения неосложненной кожной раны.

Как известно, помимо оперативных методов хирургического лечения ран кожи – обработки кожной раны, ее ушивания, пересадки кожных лоскутов, – в комплексе интервенций важное значение принадлежит применению биологических, химических, механических и фармакологических воздействий, направленных на восстановление естественной барьерной функции кожи с сохранением максимально удовлетворительных косметических результатов лечения.

Все это делает разработку новых и / или оптимизацию существующих подходов к хирургии кожной раны комплексной и междисциплинарной проблемой, требующей в своей методологической основе привлечения методов молекулярной биологии, биохимии, органической и физической химии, фармакологии, биомеханики и биоинженерии. Именно этот принцип был положен в построение методологического фундамента настоящего диссертационного исследования, сочетающего в себе основополагающие элементы гносеологической теории познания – сочетания единства научного замысла и поставленных цели и задач, комплексного подхода к их решению, использования необходимой и достаточной доказательной базы для каждого положения диссертации.

В целом работа включала 4 больших этапа. На первом этапе были сформулированы общая концепция работы, выдвинута и обоснована ее идея, определены цель и задачи исследования, выбрана методологическая база. Все это стало возможным после глубокого детального анализа литературных источников, определения выполнимости идеи проекта в условиях лабораторно-материальной базы научной лаборатории с экспериментальной

операционной кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Второй этап включал проведение экспериментально-хирургического исследования на крысах Sprague-Dawley. У животных воспроизводили два классических вида кожной раны – линейную кожную рану и циркулярную полнослойную кожную рану. На третьем этапе выполняли моделирование экспериментально-хирургической патологии на минипигах. У животных воспроизводили округлую полнослойную кожную рану с последующим ее закрытием кожным лоскутом.

На четвертом – аналитическом – этапе проведена сводка полученных данных в общий информационный массив, для чего использовались технологические мощности программного обеспечения формирования базы данных RedCap. Выполнена статистическая обработка результатов, сформулированы выводы и основные положения, выносимые на защиту.

Наночастицы церия были получены путем растворения наноформы оксида церия в батарее гликолей различной концентрации, последующего добавления в полученный коллоидный раствор N-ацетил-6-аминогексановой кислоты с образованием стабильной смеси оксида церия и N-ацетил-6-аминогексаноата церия, с его последующим внесением в гидрогель, состоящего из гликоль-хитозана и диглицидилового эфира полиэтиленгликоля. Для нанесения на раневую поверхность использовали наноформу оксида церия (1% НФОЦ) комнатной температуры. Указанную форму наносили на раневую поверхность животных, начиная со вторых суток после моделирования экспериментальной хирургической патологии с помощью стерильного одноразового пластикового шпателя с формированием лечебного слоя толщиной не более 1 мм. Кожную рану у лабораторных крыс и минипигов не закрывали.

Топическое использование 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в смеси с N-ацетил-6-аминогексановой кислотой в форме водорастворимого гидрогеля, ускоряло заживление линейной неосложненной кожной раны лабораторных крыс, приводило к повышению прочности рубцового соединения и сопровождалось благоприятными косметическими результатами в виде уменьшения площади поверхности рубца, отсутствия его депигментации, эритематозных изменений и телеангиэктазий, атрофических и гипертрофических процессов в области рубца [165-168].

На модели полнослойной циркулярной кожной раны у крыс топическое применение коллоидного раствора наночастиц церия вызывало ускорение полного закрытия дефекта кожи с уменьшением площади поверхности рубцового соединения. При этом, патоморфологически ранозаживление полнослойной циркулярной кожной неосложненной раны у крыс было представлено воспалительным асептическим процессом с выраженным интерстициальным отеком, гистиоцитарной и лимфоидной инфильтрацией тканей ложа раны и окружающих тканей к 5-10-м суткам после экспериментального моделирования раневого кожного дефекта, трансформирующимся в формирование фиброзной грубой рубцовой ткани к 20-м суткам наблюдения. Топическое применение гидрогеля с 1% коллоидным раствором наночастиц оксида церия ограничивало распространенность и глубину воспалительной реакции, сокращало масштаб инфильтративного процесса, способствовало ускорению созревания грануляционной ткани и начала реэпителизации.

Поскольку, как мы уже указывали в литературном обзоре, в основе формирования воспаления лежит продукция провоспалительных цитокинов и хемокинов тучными, дендритными клетками, клетками Лангерганса, макрофагами, а также активация процессов свободнорадикальной липопероксидации, представляло большой научно-практический интерес изучить цитокиновый статус и активность антиоксидантных механизмов в регенерирующей ране под действием 1% НФОЦ. Для этого на 5 сутки

наблюдения у 5 экспериментальных животных каждой серии, отобранных случайным образом и выведенных из эксперимента, острым способом забирали грануляционную ткань, в которой определяли количественное содержание провоспалительных цитокинов ФНО-альфа и ИЛ-1бета, а также противовоспалительного цитокина ИЛ-10 методом ИФА типа «сэндвич». Кроме того, на 5 сутки, а также на 10 сутки наблюдения в грануляционной ткани определяли активность свободнорадикальных реакций и уровень антиоксидантной защиты.

Мы установили, что местное использование 1% НФОЦ приводит к сдерживанию продукции провоспалительных и активации выработки противовоспалительного цитокина ИЛ-10. В то же время, полученные нами результаты изучения интенсивности гидроперекисных процессов, позволяют заключить, что местное применение 1% НФОЦ однократно в сутки модулирует баланс между свободнорадикальными и антиоксидантными механизмами, позволяет избежать чрезмерной активации липопероксидации, что, в комплексе с другими факторами, обеспечивает сдерживать течение воспалительной фазы раневого процесса и ускорять ранозаживление.

Одним из важнейших тканевых процессов, лежащих в основе регенеративного процесса в организме высших млекопитающих и, в том числе, человека, является формирование новых кровеносных сосудов – ангиогенез. Ангиогенез обеспечивает потребности растущих, размножающихся и дифференцирующихся клеток в кислороде и нутриентах, и, следовательно, детерминирует сроки, направление и масштаб регенерации.

В нашем исследовании для изучения процесса ангиогенеза использовали два метода: метод иммуногистохимического окрашивания CD36+ эндотелия вновь образованных микрососудов, и второй – инновационный – подход был связан с применением метода лазерной speckle-фотометрии для фиксации кровотока в ткани в моменте времени.

Топическое применение 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в гидрогеле в течение 9 суток, предшествующих анализу, приводило к

росту интенсивности неоангиогенеза, что было наглядно видно по увеличению экспрессии CD34 эндотелиоцитами формирующихся кровеносных капилляров, обеспечивающих плотность микрососудов на уровне $11,3 \pm 0,5$ на 1 см^2 площади поверхности ткани.

На основе данных применения метода лазерной speckle-фотометрии для фиксации кровотока в ткани в моменте времени, в группе животных, получавших топическое лечение 1% коллоидным раствором наночастиц церия в виде гидрогеля, к 5-м суткам наблюдения был зарегистрирован максимальный рост интегрального показателя регионарного кровотока в моменте времени, что свидетельствовало об ускорении патофизиологического процесса ангиогенеза, обеспечивающего потребности в быстро размножающихся грануляционных тканях, выстилающих дно раны. На 15-е сутки эксперимента, вследствие завершения процесса реэпителизации и заживления полнослойной циркулярной кожной раны, значение интегрального показателя снижалось до не отличающегося от интактной кожей значения. Проведенный эксперимент позволил сделать вывод о том, что, метод лазерной speckle-фотометрии может с успехом быть использован для оценки регионарного поверхностного кровотока как индикатор эволюции раны и активности ангиогенеза.

Фундаментальной основой восстановления целостности дефекта ткани служит формирование достаточной клеточной массы вследствие миграции в очаг поражения клеток-предшественников, их размножения, дифференцировки и созревания. Внутриклеточным маркером пролиферации и дифференцировки является цитоплазматический Ki67, при этом, указанный фактор неспецифичен и экспрессируется подавляющим большинством пролиферирующих клеток. Известно, что основная (по количеству) клеточная популяция, определяющая тканевую репарацию раны, формирующая грануляционную ткань, представлена фибробластами. Специфическим маркером, позволяющим судить об активности

пролиферации фибробластов, может служить рецептор фактора роста фибробластов 3 (FGFR3) и экспрессия одноименного гена, его кодирующего.

В группе животных, получавших топическое лечение 1% коллоидным раствором наночастиц церия в виде гидрогеля, на 10-е сутки эволюции циркулярной кожной полнослойной раны $11,3 \pm 0,5\%$ пролиферирующих и дифференцирующихся клеток экспрессировали Ki67. И, хотя к этому сроку закрытие ложа раны уже произошло, столь высокая экспрессия была обусловлена главным образом дифференцировкой клеток. Также на рассматриваемом сроке наблюдения обнаруживали конгруэнтные изменения экспрессии гена рецептора фактора роста фибробластов 3 типа, что свидетельствовало о стимуляции и ускорения дифференцировки специализированных клеток кожи под действием топического применения 1% НФОЦ.

На финальном экспериментальном этапе нашего исследования изучили влияние местного применения 1% коллоидного раствора наночастиц церия в виде гидрогеля на исход кожно-пластического Z-образного закрытия округлой кожной раны с планированием кожных лоскутов по Лимбергу.

Топическое использование 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в смеси с N-ацетил-6-аминогексановой кислотой в форме водорастворимого гидрогеля, ускоряло заживление кожной раны в исходе Z-образной пластики с планированием перемещаемых кожных лоскутов по Лимбергу, приводило к повышению прочности рубцового соединения по сравнению с контролем, и сопровождалось благоприятными косметическими результатами в виде уменьшения площади поверхности рубца, отсутствия его депигментации, эритематозных изменений и телеангиэктазий, атрофических и гипертрофических процессов в области рубца.

5.1 Итоги выполнения диссертационного исследования

Проведение экспериментально-хирургического исследования, основанного на воспроизведении трех моделей ранозаживления – заживления линейной раны у крыс, заживление циркулярной полнослойной неосложненной раны у крыс и кожная Z-образная пластика округлого дефекта кожи с планированием перемещаемых кожных лоскутов по Лимбергу у минипигов, позволило установить лечебные возможности 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в форме водорастворимого гидрогеля при его курсовом топическом использовании на область раневого дефекта и формирующегося рубцового соединения.

Было установлено, что местное применение 1% НФОЦ сопровождается ускорением формирования кожного соединения линейного дефекта, заживления циркулярного полнослойного дефекта кожи у грызунов, при этом сокращение сроков заживления обусловлено ограничением масштаба воспалительного процесса, более ранней васкуляризацией формирующихся грануляций, активацией пролиферации и дифференцировки фибробластов, выполняющих раневое ложе. Клиническими результатами изученной экспериментально-хирургической технологии, кроме того, служат снижением площади рубцового соединения, повышение при сравнении с контролем его косметических свойств при повышении прочностных характеристик формирующегося рубца. Исследование инновационного местного средства в эксперименте на крупных животных приводило к однонаправленным с грызунами оптимизации косметических и механических свойств рубца в исходе кожной пластики.

Важным итогом работы может служить и то, что нами была продемонстрирована возможность метода лазерной speckle-фотометрии для оценки ангиогенеза в открытой кожной ране.

5.2 Перспективы дальнейшего развития темы диссертационного исследования

Полученные при выполнении диссертационной работы научно-практические результаты открывают широкие перспективы для их дальнейшего использования, а также продолжения исследовательского поиска. С практической точки зрения несомненный интерес может представлять проведение работ по получению оптимальной лекарственной формы наночастиц коллоидного раствора церия для топического применения в области повреждения кожи, в том числе, использование иных рецептур гидрогелей, в частности, способных к пленкообразованию. Также большое практическое значение может иметь использование 1% НФОЦ в составе разнообразных перевязочных средств, применяющихся в хирургии ран.

С научной точки зрения было бы интересно изучение эффективности и безопасности наночастиц коллоидного раствора церия при осложненных кожных ранах – инфицированных и диабетических, а также исследование данного топического средства для улучшения косметических результатов различных кожно-пластических подходов в пластической и косметической хирургии.

ВЫВОДЫ

1. Топическое применение 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в смеси с N-ацетил-6-аминогексановой кислотой в форме водорастворимого гидрогеля ускоряет заживление линейной кожной раны у крыс, приводит к повышению в среднем на 31,4% при сравнении с контролем прочности рубцового соединения и сопровождается благоприятными косметическими результатами в виде уменьшения площади поверхности рубца, отсутствия его депигментации, эритематозных изменений и телеангиэктазий, атрофических и гипертрофических процессов в области соединения.

2. Ежедневное воздействие наночастиц оксида церия на неосложненную циркулярную полнослойную кожную рану крыс сопровождается сокращением сроков полного закрытия раны, уменьшением площади поверхности рубца. В основе клинического эффекта лежит ограничение амплитуды местной воспалительной реакции в виде сокращения объема и времени тканевой инфильтрации, ускорения формирования и дифференцировки грануляционной ткани и синтеза межклеточного матрикса на основе коллагеновых волокон.

3. Локальное противовоспалительное действие 1% коллоидного раствора наночастиц оксида церия в форме гидрогеля обусловлено ингибированием продукции провоспалительных цитокинов ИЛ-1бета и ФНО-альфа с одновременной стимуляцией синтеза противовоспалительного ИЛ-10 в раневом ложе, а также ограничением локальных свободнорадикальных реакций на фоне поддержания антиоксидантного резерва тканей.

4. Местное воздействие наночастиц оксида церия приводит к активации неоангиогенеза: при сравнении с контролем повышается плотность CD34-позитивных эндотелиоцитов в свежих грануляциях. ИГХ-подтвержденный рост капилляров соответствует результатам оценки

кровоснабжения тканей в моменте времени методом лазерной speckle-фотометрии.

5. Тепическое воздействие наночастицами оксида церия на область Z-образной кожной пластики округлого дефекта кожи минипигов с планированием лоскутов по Лимбергу повышает прочность рубцового соединения и сопровождается однонаправленным (при сопоставлении с результатами, полученными на крысах) косметическими результатами.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные результаты о ранозаживляющем действии 1% коллоидного раствора оксида церия в форме гидрогеля могут быть использованы при проведении последующих исследований инновационной хирургической технологии и ее трансляции в реальную клиническую практику.

2. При топическом применении 1% коллоидного раствора оксида церия в форме гидрогеля его следует наносить равномерным слоем толщиной до 1 мм на открытую раневую поверхность однократно в сутки.

3. Метод лазерной speckle-фотометрии может быть использован для оценки интенсивности кровотока и динамики ангиогенеза на поверхности неэпителизированных свежих кожных раневых дефектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuehn, B.M. Chronic Wound Care Guidelines Issued / B.M. Kuehn // *JAMA*. – 2007. – Vol. 297. – P. 938.
2. Nano-drug delivery systems in wound treatment and skin regeneration / W. Wang, K.-J. Lu, C.-H. Yu et al. // *J. Nano bio technol.* – 2019. – Vol. 17. – P. 1-15.
3. Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing / M.A.M. Jahromi, P.S. Zangabad, S.M.M. Basri et al. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2018. – Vol. 123. – P. 33-64.
4. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts / H. Sorg, D.J. Tilkorn, S. Hager et al. // *Eur. Surg. Res.* – 2017. – Vol. 58. – P. 81-94.
5. Wound Healing / P.H. Wang, B.S. Huang, H.C. Horng et al. // *J. Chin. Med. Assoc.* – 2018. – Vol. 81. – P. 94-101.
6. Dhivya, S. Wound Dressings—A Review / S. Dhivya, V.V. Padma, E. Santhini // *BioMedicine*. – 2015. – Vol. 5. – P. 24-28.
7. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review / J.S. Boateng, K.H. Matthews, H.N.E. Stevens, G.M. Eccleston // *J. Pharm. Sci.* – 2008. – Vol. 97. – P. 2892-2923.
8. Holly, N.W. Wound Healing: Cellular Mechanisms and Pathological Outcomes / N.W. Holly, J.H. Matthew // *Open Biol.* – 2020. – Vol. 10. – P. 200-223.
9. Ramalingam, S. Plant-Based Natural Products for Wound Healing: A Critical Review / S. Ramalingam, M.J.N. Chandrasekar, M.J. Nanjan // *Curr. Drug Res. Rev.* – 2022. – Vol. 14. – P. 37-60.
10. Wound dressings functionalized with silver nanoparticles: Promises and pitfalls / K. Kalantari, E. Mostafavi, A.M. Afifi et al. // *Nanoscale*. – 2020. – Vol. 12. – P. 2268-2291.

11. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes / E.T. Wang, R. Sandberg, S. Luo et al. // *Nature*. – 2008. – Vol. 456. – P. 470-476.
12. Stoica, A.E. for Wound Dressings: An Up-to-Date Overview / A.E. Stoica, C. Chircov, A.M. Grumezescu // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – P. 26-99.
13. Allen, T.M. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications / T.M. Allen, P.R. Cullis // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2013. – Vol. 65. – P. 36-48.
14. In vitro antimicrobial and in vivo wound healing effect of actinobacterially synthesised nanoparticles of silver, gold and their alloy / T. Shanmugasundaram, M. Radhakrishnan, V. Gopikrishnan et al. // *RSC Adv.* – 2017. – Vol. 7. – P. 51729-51743.
15. Beshpalova, Y. Surface modification and antimicrobial properties of cellulose nanocrystals / Y. Beshpalova, D. Kwon, N. Vasanthan et al. // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2017. – Vol. 134. – P. 44789.
16. Mesoporous Organosilica Nanoparticles Containing Superacid and Click Functionalities Leading to Cooperativity in Biocidal Coatings / J. Gehring, D. Schleheck, B. Trepka, S. Polarz // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. – 2014. – Vol. 7. – P. 1021-1029.
17. Dispersion of TiO₂ nanoparticles improves burn wound healing and tissue regeneration through specific interaction with blood serum proteins / G.A. Seisenbaeva, K. Fromell, V.V. Vinogradov et al. // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 1-11.
18. Nam, G.; Rangasamy, S.; Purushothaman, B.; Song, J.M. The Application of Bactericidal Silver Nanoparticles in Wound Treatment. *Nanomater. Nanotechnol.* 2015, 5, 23.
19. Пахомов, Д.В. Фармакологические подходы к активации регенерации мягких тканей при сахарном диабете: дисс. ... канд. мед. наук: 3.3.6. / Дмитрий Владимирович Пахомов. – Саранск, 2022. – 146 с.
20. Wound repair and regeneration / G.C. Gurtner, S. Werner, Y. Barrandon, M.T. Longaker // *Nature*. – 2008. – Vol. 453. – P. 314-321.

21. Reinke, J.M. Wound repair and regeneration / J. M. Reinke, H. Sorg // *European Surgical Research*. – 2012. – Vol. 49. – P. 35-43.
22. Vannella, K.M. Mechanisms of organ injury and repair by macrophages / K. M. Vannella, T. A. Wynn // *Annual Review of Physiology*. – 2017. – Vol. 79. – P. 593-617.
23. Richardson, R.J. Parallels between vertebrate cardiac and cutaneous wound healing and regeneration / R.J. Richardson // *Npj Regenerative Medicine*. – 2018. – Vol. 3. – P. 21.
24. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection / S. L. Percival, C. Emanuel, K. F. Cutting, D. W. Williams // *International Wound Journal*. – 2012. – Vol. 9. – P. 14-32.
25. Byrd, A.L. The human skin microbiome / A. L. Byrd, Y. Belkaid, J. A. Segre // *Nature Reviews Microbiology*. – 2018. – Vol. 16. – P. 143-155.
26. Pistone, D. A journey on the skin microbiome: pitfalls and opportunities / D. Pistone, G. Meroni, S. Panellietal // *International Journal of Molecular Sciences*. – Vol. 22. – P. 9846.
27. Wound healing: a cellular perspective / M. Rodrigues, N. Kosaric, C. A. Bonham, G. C. Gurtner // *Physiological Reviews*. – 2019. – Vol. 99. – P. 665-706.
28. Strbo, N. Innate and adaptive immune responses in wound epithelialization / N. Strbo, N. Yin, O. Stojadinovic // *Advances in Wound Care*. – 2014. – Vol. 3. – P. 492-501.
29. Abdallah, F. Skin immune landscape: inside and outside the organism / F. Abdallah, L. Mijouin, C. Pichon // *Mediators of Inflammation*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 17.
30. Cytokines: the diverse contribution of keratinocytes to immune responses in skin / Y. Jiang, L. C. Tsoi, A. C. Billi et al. // *JCI insight*. – 2012. – Vol. 5. – P. e142067.

31. Agrawal, A. Role of dendritic cells in Inflammation and loss of tolerance in the elderly / A. Agrawal, S. Agrawal, and S. Gupta // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 896.
32. Mast cells as sources of cytokines, chemokines and growth factors / K. Mukai, M. Tsai, H. Saito, S. J. Galli // *Immunological Reviews*. – 2018. – Vol. 282. – P. 121-150.
33. Silva, E.Z.M. Mastcellfunction: a new vision of an old cell / E.Z.M. Silva, M.C. Jamur, C. Oliver // *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. – 2014. – Vol. 62. – P. 698-738.
34. Differential regulation of pro- inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice / G. Hübner, M. Brauchle, H. Smola et al. // *Cytokine*. – 1996. – Vol. 8. – P. 548-556.
35. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities / Nathan C. // *Nature Reviews Immunology*. – 2006. – Vol. 6. – P. 173-182.
36. Meszaros, A. J. Macrophage phagocytosis of wound neutrophils / A. J. Meszaros, J. S. Reichner, J. E. Albina // *Journal of Leukocyte Biology*. – 1999. – Vol. 65. – P. 35-42.
37. Falanga, V. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors / V. Falanga // *The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology*. – 1993. – Vol. 19. – P. 711-714.
38. Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing / M. Hesketh, K.B. Sahin, Z.E. West, R.Z. Murray // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18. – P. 1545.
39. Liippo, J. Natural killer cells in wound healing / J. Liippo, M. Toriseva, V.-M. Kähäri // in *Natural Killer Cells*. – 2010. – Vol. 39. – P. 519-525.
40. NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1 / C. Semino, G. Angelini, A. Poggi, A. Rubartelli // *Blood*. – 2005. – Vol. 106. – P. 609- 616.

41. Functions of natural killer cells / E. Vivier, E. Tomasello, M. Baratin et al. // *Nature Immunology*. – 2008. – Vol. 9. – P. 503-510.
42. CD1d-restricted iNKT cells, the “Swiss-Army knife” of the immune system / J. L. Matsuda, T. Mallevaey, J. Scott-Browne, L. Gapin // *Current Opinion in Immunology*. – 2008. – Vol. 20. – P. 358-368.
43. IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13 / P. G. Fallon, H. E. Jolin, P. Smith et al. // *Immunity*. – 2002. – Vol. 17. – P. 7-17.
44. Morton, L.M. Wound healing and treating wounds: Chronic wound care and management / L. M. Morton, T. J. Phillips // *Journal of the American Academy of Dermatology*. – 2016. – Vol. 74. – P. 589-605.
45. Cañedo-Dorantes, L. Skin acute wound healing: a comprehensive review / L. Cañedo-Dorantes, M. Cañedo-Ayala // *International Journal of Inflammation*. – 2019. – Vol. 2. – P. 15.
46. Mayet, N. A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems / N. Mayet, Y.E. Choonara, P. Kumaretal // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2014. – Vol. 103. – P. 2211-2230.
47. Martin, P. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly / P. Martin S. J. Leibovich // *Trends in Cell Biology*. – 2005. – Vol. 15. – P. 599-607.
48. Golebiewska, E.M. Platelet secretion: from haemostasis to wound healing and beyond / E. M. Golebiewska, A. W. Poole // *Blood Reviews*. – 2015. – Vol. 29. – P. 153-162.
49. Friedl, P. Integrins, cell matrix interactions and cell migration strategies: fundamental differences in leukocytes and tumor cells / P. Friedl, E.-B. Bröcker, K. S. Zänker // *Cell Adhesion and Communication*. – 1998. – Vol. 6. – P. 225-236.
50. Accelerated wound healing phenotype in interleukin 12/23 deficient mice / M.A. Matias, J.M. Saunus, S. Ivanovski et al. // *Journal of Inflammation*. – 2011. – Vol. 6. – P. 39.

51. Wilkinson, H.N. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes / H. N. Wilkinson M. J. Hardman // *Open Biology*. – 2020. – Vol. 10. – P 200-223.
52. Klingberg, F. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis: the myofi- broblast matrix / F. Klingberg, B. Hinz, E. S. White // *The Journal of Pathology*. – 2013. – Vol. 229. – P. 298-309.
53. Tracy, L.E. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound / L.E. Tracy, R.A. Minasian, E.J. Caterson // *Advances in Wound Care (New Rochelle)*. – 2016. – Vol. 5. – P. 119-136.
54. Li, J. Pathophysiology of acute wound healing / J. Li, J. Chen, R. Kirsner // *Clinics in Dermatology*. – 2007. – Vol. 25. – P. 9-18.
55. Caley, M.P. Metalloproteinases and wound healing / M. P. Caley, V. L. C. Martins, E. A. O’Toole // *Advances in Wound Care*. – 2014. – Vol. 4. – P. 225-234.
56. Kono, H. How dying cells alert the immune system to danger / H. Kono, K. L. Rock // *Nature Reviews Immunology*. – 2008. – Vol. 8. – P. 279-289.
57. Wilgus, T.A. Alerting the body to tissue injury: the role of alarmins and DAMPs in cutaneous wound healing / T. A. Wilgus // *Current pathobiology reports*. – 2018. – Vol. 6. – P. 55-60.
58. Ellis, S. Immunology of wound healing / S. Ellis, E. J. Lin, D. Tartar // *Current dermatology reports*. – 2018. – Vol. 7. – P. 350-358.
59. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS- modulating technologies for augmentation of the healing process: reactive oxygen species and wound healing / C. Dunnill, T. Patton, J. Brennan et al. // *International Wound Journal*. – 2017. – Vol. 14. – P. 89-96.
60. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish / P. Niethammer, C. Grabher, A.T. Look, T.J. Mitchison // *Nature*. – 2009. – Vol. 459. – P. 996-999.

61. The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: a review / M.J. Portou, D. Baker, D. Abraham, J. Tsui // *Vascular Pharmacology*, vol. 71, pp. 31–36, 2015.
62. L. Chen and L. A. DiPietro, “Toll-like receptor function in acute wounds,” *Advances in Wound Care*, vol. 6, no. 10, pp. 344–355, 2017.
63. Impaired wound healing / N. B. Menke, K. R. Ward, T. M. Witten et al. // *Clinics in Dermatology*. – 2007. – Vol. 25. – P. 19-25.
64. Skin immune sentinels in health and disease / F.O. Nestle, P. DiMeglio, J.-Z. Qin, B.J. Nickoloff // *Nature Reviews Immunology*. – 2009. – Vol. 9. – P. 679-691.
65. Kollisch, G. Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes / G. Kollisch, B.N. Kalali, V. Voelcker et al. // *Immunology*. – 2005. – Vol. 114. – P. 531-541.
66. Piipponen, M. The immune functions of keratinocytes in skin wound healing / M. Piipponen, D. Li, N.X. Landén // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – P. 87-90.
67. Yeaman, M.R. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance / M.R. Yeaman N.Y. Yount // *Pharmacological Reviews*. – 2003. – Vol. 55. – P. 27-55.
68. Synthetic antimicrobial and LPS-neutralising peptides suppress inflammatory and immune responses in skin cells and promote keratinocyte migration / A. Pfalzgraff, L. Heinbockel, Q. Su et al. // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 31577.
69. Gera, S. Antimicrobial peptides – unleashing their therapeutic potential using nanotechnology / S. Gera, E. Kankuri, K. Kogermann // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2021. – Vol. 232.
70. A small peptide with potential ability to promote wound healing / J. Tang, H. Liu, C. Gao et al. // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. – P. e92082.

71. Antiviral and immunomodulatory properties of antimicrobial peptides produced by human keratinocytes / C. Chessa, C. Bodet, C. Jousselin, et al. // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1155.
72. Keratins and the keratinocyte activation cycle / I. M. Freedberg, M. Tomic-Canic, M. Komine, M. Blumenberg // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2001. – Vol. 116. – P. 633-640.
73. Keratin 16 regulates innate immunity in response to epidermal barrier breach / J.C. Lessard, S. Pina-Paz, J.D. Rotty et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – Vol. 110. – P. 19537-19542.
74. Zhang, X. Keratin 6, 16 and 17—critical barrier alarmin molecules in skin wounds and psoriasis / X. Zhang, M. Yin, L. Zhang // *Cell*. – 2019. – Vol. 8. – P. 807.
75. Development of a novel keratin dressing which accelerates full-thickness skin wound healing in diabetic mice: In vitro and in vivo studies / M. Konop, J. Czuwara, E. Kłodzińska et al. // *Journal of Biomaterials Applications*. – 2018. – Vol. 33. – P. 527-540.
76. Langerhans cells – dendritic cells of the epidermis / N. Romani, S. Holzmann, C.H. Tripp et al. // *APMIS*. – 2003. – Vol. 111. – P. 725-740.
77. External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers / A. Kubo, K. Nagao, M. Yokouchi et al. // *Journal of Experimental Medicine*. – 2009. – Vol. 206. – P. 2937-2946.
78. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin / A. Tang, M. Amagai, L. G. Granger et al. // *Nature*. – 1993. – Vol. 361. – P. 82-85.
79. Ratzinger, G. Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine Skin / G. Ratzinger, P. Stoitzner, S. Ebner et al. // *The Journal of Immunology*. – 2002. – Vol. 168. – P. 4361-4371.

80. CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration of cutaneous dendritic cells / K. Kabashima, N. Shiraishi, K. Sugita et al. // *The American Journal of Pathology*. – 2007. – Vol. 171. – P. 1249-1257.
81. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions / L. Ohl, M. Mohaupt, N. Czeloth et al. // *Immunity*. – 2004. – Vol. 21. – P. 279-288.
82. Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells / J. Seneschal, R. A. Clark, A. Gehad et al. // *Immunity*. – 2012. – Vol. 36. – P. 873-884.
83. West, H.C. Redefining the role of Langerhans cells as immune regulators within the skin / H.C. West, C.L. Bennett // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 8. – P. 1941.
84. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity / O. Joffre, M.A. Nolte, R. Spörri, C.R.E. Sousa // *Immunological Reviews*. – 2009. – Vol. 227. – P. 234-247.
85. Galkowska, H. Expression of natural antimicrobial peptide beta-defensin-2 and Langerhans cell accumulation in epidermis from human non-healing leg ulcers / H. Galkowska, W. L. Olszewski, U. Wojewodzka // *Folia Histochemica et Cyto-biologica*. – 2005. – Vol. 43. – P. 133-136.
86. Increased number of Langerhans cells in the epidermis of diabetic foot ulcers correlates with healing outcome / O. Stojadinovic, N. Yin, J. Lehmann et al. // *Immunologic Research*. – 2013. – Vol. 57. – P. 222-228.
87. Balan, S. Dendritic cell subsets and locations / S. Balan, M. Saxena, N. Bhardwaj // *International Review of Cell and Molecular Biology*. – 2019. – Vol. 348. – P. 1-68.
88. Dendritic cell antigen presentation drives simultaneous cytokine production by effector and regulatory T cells in inflamed skin / J.B. McLachlan, D.M. Catron, J.J. Moon, M.K. Jenkins // *Immunity*. – 2009. – Vol. 30. – P. 277-288.

89. Dendritic cell–epithelium interplay is a determinant factor for corneal epithelial wound repair / N. Gao, J. Yin, G. S. Yoon, et al. // *The American Journal of Pathology*. – 2011. – Vol. 179. – P. 2243-2253.
90. Burn injury / M.G. Jeschke, M.E. vanBaar, M.A. Choudhry et al. // *Nature Reviews. Disease Primers*. – 2020. – Vol. 6. – P. 11.
91. Vinish, M. Dendritic cells modulate burn wound healing by enhancing early proliferation / M. Vinish, W. Cui, E. Stafford et al. // *Wound Repair and Regeneration*. – 2016. – Vol. 24. – P. 6-13.
92. Lipozencić, J. Identification of Langerhans cells in dermatology / J. Lipozencić, S. Ljubojević // *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*. – 2004. – Vol. 55. – P. 167-174.
93. Rajesh, A. The role of Langerhans cells in pathologies of the skin / A. Rajesh, L. Wise, M. Hibma // *Immunology and Cell Biology*. – 2019. – Vol. 97. – P. 700-713.
94. Grabbe, J. The mast cell / J. Grabbe, N. Haas, B. M. Czarnetzki // *Hautarzt*. – 1994. – Vol. 45. – P. 55-63.
95. Trautmann, A. Mast cell involvement in normal human skin wound healing: expression of monocyte chemoattractant protein-1 is correlated with recruitment of mast cells which synthesize interleukin-4 in vivo / A. Trautmann, A. Toksoy, E. Engelhardt // *The Journal of Pathology*. – 2000. – Vol. 190. – P. 100-106.
96. Oskeritzian, C.A. Mast cells and wound healing / C.A. Oskeritzian // *Advances in Wound Care*. – 2012. – Vol. 1. – P. 23-28.
97. Ng, M.F. The role of mast cells in wound healing / C.A. Oskeritzian // *International Wound Journal*. – 2010. – Vol. 7. – P. 55-61.
98. Komi, D.E.A. A review of the contribution of mast cells in wound healing: involved molecular and cellular mechanisms / D.E.A. Komi, K. Khomtchouk, P.L. Santa Maria // *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. – 2020. – Vol. 58. – P. 298-312.

99. ElAyadi, A. Current approaches targeting the wound healing phases to attenuate fibrosis and scarring / A. ElAyadi, J.W. Jay, A. Prasai // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – P. 1105.
100. Hebda, P.A. Mast cell and myofibroblast in wound healing / P. A. Hebda, M. A. Collins, M. D. Tharp // *Dermatologic Clinics*. – 1993. – Vol. 11. – P. 685-696.
101. Reber, L.L. New models for analyzing mast cell functions in vivo / L.L. Reber, T. Marichal, S.J. Galli // *Trends in Immunology*. – 2012. – Vol. 33. – P. 613-625.
102. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice / K. Weller, K. Foitzik, R. Paus et al. // *The FASEB Journal*. – 2006. – Vol. 20. – P. 2366-2368.
103. Mast cell cathelicidin antimicrobial peptide prevents invasive group A streptococcus infection of the skin / A.D. Nardo, K. Yamasaki, R.A. Dorschner et al. // *Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 180. – P. 7565-7573.
104. Abraham, S.N. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens / S.N. Abraham, A.L.S. John // *Nature Reviews Immunology*. – 2010. – Vol. 10. – P. 440-452.
105. Komi, D.E.A. Significance of mast cell formed extracellular traps in microbial defense / D.E.A. Komi, W.M. Kuebler // *Clinical reviews in allergy & immunology*. – 2022. – Vol. 62. – P. 160-179.
106. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann et al. // *Science*. – 2004. – Vol. 303. – P. 1532-1535.
107. The emerging roles of neutrophil extracellular traps in wound healing / S. Zhu, Y. Yu, Y. Ren et al. // *Cell Death & Disease*. – 2021. – Vol. 12. – P. 984.
108. Extracellular traps and macrophages: new roles for the versatile phagocyte / D.M. Boe, B.J. Curtis, M.M. Chen et al. // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2015. – Vol. 97. – P. 1023-1035.

109. Therapeutic targeting of neutrophil extracellular traps improves primary and second- ary intention wound healing in mice / A. Heuer, C. Stiel, J. Elrod et al. // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12.
110. Mast cells are critical for controlling the bacterial burden and the healing of infected wounds / C. Zimmermann, D. Troeltzsch, V. A. Giménez-Rivera et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2019. – Vol. 116. – P. 20500-20504.
111. Mast cells in diabetes and diabetic wound healing / J. Dong, L. Chen, Y. Zhang et al. // *Advances in Therapy*. – 2020. – Vol. 37. – P. 4519-4537.
112. Ud-Din, S. Mast cells in skin scarring: a review of animal and human research / S. Ud-Din, T.A. Wilgus, A. Bayat // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11.
113. Abe, M. Effect of mast cell- derived mediators and mast cell-related neutral proteases on human dermal fibroblast proliferation and type I collagen production / M. Abe, M. Kurosawa, Y. Miyachi // *Journal of allergy and clinical immunology*. – 2000. – Vol. 106. – P. S78–S84.
114. Mast cell chymase promotes hypertrophic scar fibroblast proliferation and collagen syn- thesis by activating TGF- β 1/Smads signaling pathway / H. Chen, Y. Xu, G. Yang et al. // *Experimental And Therapeutic Medicine*. – 2017. – Vol. 14. – P. 4438–4442.
115. Shaker, S.A. Cell Talk / S.A. Shaker, N.N. Ayuob, N.H. Hajrah // *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. – 2011. – Vol. 19. – P. 153-159.
116. Murine model of wound healing / L. Dunn, H.C.G. Prosser, J.T.M. Tan // *Journal of Visualized Experiments*. – 2013. – Vol. 75.
117. Lindblad, W.J. Considerations for selecting the correct ani- mal model for dermal wound-healing studies / W. J. Lindblad // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. – 2008. – Vol. 19. – P. 1087-1096.

118. Evidence that mast cells are not required for healing of splinted cutaneous excisional wounds in mice / A.C. Nauta, M. Grova, D.T. Montoro et al. // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8.
119. Blockade of mast cell activation reduces cutaneous scar formation / L. Chen, M.E. Schrementi, M.J. Ranzer, et al. // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9.
120. Gallant-Behm, C.L. The mast cell stabilizer ketotifen prevents development of excessive skin wound contraction and fibrosis in red Duroc pigs / C.L. Gallant-Behm, K.A. Hildebrand, D.A. Hart // *Wound Repair and Regeneration.* – 2008. – Vol. 16. – P. 226-233.
121. Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing / M.A.M. Jahromi, P.S. Zangabad, S.M.M. Basri et al. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2018. – Vol. 123. – P. 33-64.
122. Chitosan/Copaiba oleoresin films for wound dressing application / H.S. Debone, P.S. Lopes, P. Severino et al. // *Int. J. Pharm.* – 2019. – Vol. 555. – P. 146-152.
123. New Nanotechnologies for the Treatment and Repair of Skin Burns Infections / E.B. Souto, A.F. Ribeiro, M.I. Ferreira et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21. – P. 393.
124. Nanoparticle-based local antimicrobial drug delivery / W. Gao, Y. Chen, Y. Zhang et al. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2018. – Vol. 127. – P. 46-57.
125. Lipsky, B.A. Topical Antimicrobial Therapy for Treating Chronic Wounds / B.A. Lipsky, C. Hoey // *Clin. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 49. – P. 1541-1549.
126. Plant protein-based hydrophobic fine and ultrafine carrier particles in drug delivery systems / H. Malekzad, H. Mirshekari, P.S. Zangabad et al. // *Crit. Rev. Biotechnol.* – 2018. – Vol. 38. – P. 47-67.
127. Piacenza, E. Stability of biogenic metal(loid) nanomaterials related to the colloidal stabilization theory of chemical nanostructures / E. Piacenza, A. Presentato, R.J. Turner et al. // *Crit. Rev. Biotechnol.* – 2018. – Vol. 38. – P. 1137-1156.

128. Wound-healing properties of copper nanoparticles as a function of physicochemical parameters / A.A. Rakhmetova, T.P. Alekseeva, O.A. Bogoslovskaya et al. // *Nanotechnol. Russ.* – 2010. – Vol. 5. – P. 271-276.
129. Design of Nanoparticle-Based Carriers for Targeted Drug Delivery / X. Yu, I. Trase, M. Ren et al. // *J. Nanomater.* – 2016. – P. 1-15.
130. Zhao, M.-X. The Biological Applications of Inorganic Nanoparticle Drug Carriers / M.-X. Zhao, E.-Z. Zeng, B.-J. Zhu // *ChemNanoMat.* – 2015. – Vol. 1. – P. 82-91.
131. Advances in structural design of lipid-based nanoparticle carriers for delivery of macromolecular drugs, phytochemicals and anti-tumor agents / A. Angelova, V.M. Garamus, B. Angelov et al. // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2017. – Vol. 249. – P. 331-345.
132. Selvarajan, V. Silica Nanoparticles—A Versatile Tool for the Treatment of Bacterial Infections / V. Selvarajan, S. Obuobi, P.L.R. Ee // *Front. Chem.* – 2020. – Vol. 8. – P. 602.
133. Core-shell nanostructures: Perspectives towards drug delivery applications / R. Kumar, K. Mondal, P.K. Panda et al. // *J. Mater. Chem.* – 2020. – Vol. 8. – P. 8992-9027.
134. Balaure, P.C. Recent Advances in Surface Nanoengineering for Biofilm Prevention and Control. Part I: Molecular Basis of Biofilm Recalcitrance / P.C. Balaure, A.M. Grumezescu // *Passive Anti-Biofouling Nanocoatings. Nanomaterials.* – 2020. – Vol. 10. – P. 1230.
135. Balaure, P.C. Recent Advances in Surface Nanoengineering for Biofilm Prevention and Control. Part II: Active, Combined Active and Passive, and Smart Bacteria-Responsive Antibiofilm Nanocoatings / P.C. Balaure, A.M. Grumezescu // *Nanomaterials.* – 2020. – Vol. 10. – P. 1527.
136. Kumar, R. Sonochemical synthesis of carbon dots, mechanism, effect of parameters, and catalytic, energy, biomedical and tissue engineering applications / R. Kumar, V.B. Kumar, A. Gedanken // *Ultrason Sonochem.* – 2020. – Vol. 64. – P. 105009.

137. Low-drug resistance carbon quantum dots decorated injectable self-healing hydrogel with potent antibiofilm property and cutaneous wound healing / P. Li, S. Liu, X. Yang et al. // *Chem. Eng. J.* – 2021. – Vol. 126. – P. 387.
138. Nanomaterials as Enhanced Antimicrobial Agent/Activity-Enhancer for Transdermal Applications: A Review. In *Antimicrobial Nanoarchitectonics* / S.N. Kale, R. Kitture, S. Ghosh et al. // Elsevier BV: Amsterdam, The Netherlands. – 2017. – P. 279-321.
139. Kitture, R. Hybrid Nanostructures for In Vivo Imaging / R. Kitture, S. Ghosh // In *Hybrid Nanostructures for Cancer Theranostics*; Elsevier BV: Amsterdam, The Netherlands. – 2019. – P. 173-208.
140. Isoniazid-loaded chitosan/carbon nanotubes microspheres promote secondary wound healing of bone tuberculosis / G. Chen, Y. Wu, D. Yu et al. // *J. Biomater. Appl.* – 2018. – Vol. 33. – P. 989-996.
141. Kittana, N. Enhancement of wound healing / N. Kittana, M. Assali, H. Abu-Rass //
142. By single-wall/multi-wall carbon nanotubes complexed with chitosan. *Int. J. Nanomed.* – 2018. – Vol. 13. – P. 7195-7206.
143. Nanocomposites of Poly (Vinyl Alcohol)/Functionalized-Multiwall Carbon Nanotubes Conjugated With Glucose Oxidase for Potential Application as Scaffolds in Skin Wound Healing / J.C.C. Santos, A.A.P. Mansur, V.S.T. Ciminelli, H.S. Mansur // *Int. J. Polym. Mater.* – 2014. – Vol. 63. – P. 185-196.
144. Hydrogels in Regenerative Medicine / B.V. Slaughter, S.S. Khurshid, O.Z. Fisher et al. // *Adv. Mater.* – 2009. – Vol. 21. – P. 3307-3329.
145. Ravanbakhsh, H. Carbon nanotubes promote cell migration in hydrogels / H. Ravanbakhsh, G. Bao, L. Mongeau // *Sci. Rep.* – 2020. – Vol. 10. – P. 2543.
146. A Comprehensive Review / A.D. Ghuge, A.R. Shirode, V.J. Kadam // *Curr. Drug Targets.* – 2017. – Vol. 18. – P. 724-733.
147. Ghosh, S. Metallic Biomaterial for Bone Support and Replacement. In *Fundamental Biomaterials: Metals*; Balakrishnan, P., Sreekala, M.S., Thomas, S.,

Eds / S. Ghosh, S. Sanghavi, P. Sancheti // Woodhead Publishing: Cambridge, UK; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. – 2018. – Vol. 2. – P. 139-165.

148. A Novel Wound Dressing Based on Ag/Graphene Polymer Hydrogel: Effectively Kill Bacteria and Accelerate Wound Healing / Z. Fan, B. Liu, J. Wanget al. // *Adv. Funct. Mater.* – 2014. – Vol. 24. – P. 3933-3943.

149. Graphene Oxide Incorporated Acellular Dermal Composite Scaffold Enables Efficient Local Delivery of Mesenchymal Stem Cells for Accelerating Diabetic Wound Healing / J. Fu, Y. Zhang, J. Chu et al. // *ACS Biomater. Sci. Eng.* – 2019. – Vol. 5. – P. 4054-4066.

150. Reduced Graphene Oxide Incorporated GelMA Hydrogel Promotes Angiogenesis For Wound Healing Applications / S.R.U. Rehman, R. Augustine, A.A. Zahid et al. // *Int. J. Nanomed.* – 2019. – Vol. 14. – P. 9603-9617.

151. Mussel-Inspired Electroactive and Antioxidative Scaffolds with Incorporation of Polydopamine-Reduced Graphene Oxide for Enhancing Skin Wound Healing / P. Tang, H. Lu, L. Pengfei et al. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2019. – Vol. 11. – P. 7703-7714.

152. Harrison, J.J. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms / J.J. Harrison, H. Ceri, R.J. Turner // *Nat. Rev. Genet.* – 2007. – Vol. 5. – P. 928-938.

153. Quester, K. Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles / K. Quester, M. Avalos-Borja, E. Castro-Longoria // *Micron.* – 2013. – Vol. 54-55. – P. 1-27.

154. Applications of biosynthesized metallic nanoparticles–A review / A. Schröfel, G. Kratošová, I. Šafarčík et al. // *Acta Biomater.* – 2014. – Vol. 10. – P. 4023-4042.

155. Zhao, L. Influence of silver-hydroxyapatite nanocomposite coating on biofilm formation of joint prosthesis and its mechanism / L. Zhao, M.A. Ashraf // *West Indian Med. J.* – 2015. – Vol. 64. – P. 506.

156. Biogenic selenium and tellurium nanoparticles synthesized by environmental microbial isolates efficaciously inhibit bacterial planktonic cultures

and biofilms / E. Zonaro, S. Lampis, E.S. Turner et al. // *Front. Microbiol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 584.

157. Chatzimitakos, T. Qualitative Alterations of Bacterial Metabolome after Exposure to Metal Nanoparticles with Bactericidal Properties: A Comprehensive Workflow Based on ¹H NMR, UHPLC-HRMS, and Metabolic Databases / T. Chatzimitakos, C.D. Stalikas // *J. Proteome Res.* – 2016. – Vol. 15. – P. 3322-3330.

158. Wang, L. The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future / L. Wang, C. Hu, L. Shao // *Int. J. Nanomed.* – 2017. – Vol. 12. – P. 1227.

159. Antimicrobial activity of biogenically produced spherical Se-nanomaterials embedded in organic material against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains on hydroxyapatite-coated surfaces / E. Piacenza, A. Presentato, E. Zonaro et al. // *Microb. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 10. – P. 804-818.

160. Incorporation of ZnO nanoparticles into heparinised polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels for wound dressing application / M.T. Khorasani, A. Joorabloo, A. Moghaddam et al. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – Vol. 114. – P. 1203-1215.

161. Carbone, L. Pain in laboratory animals: The ethical and regulatory imperatives / L. Carbone // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6. – e21578.

162. Langford, D.J. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse / D.J. Langford, A.L. Bailey, M.L. Chanda et al. // *Nat Methods.* – 2010. – Vol. 7. – P. 447-449.

163. Dose-dependent effect of plasma-chemical NO-containing gas flow on wound healing / A.B. Shekhter, A.V. Pekshev, A.B. Vagapov et al. // *An experimental study. Clin Plasma Med.* – 2020. – P. 19-20.

164. Cerium-Containing N-Acetyl-6-Aminohexanoic Acid Formulation Accelerates Wound Reparation in Diabetic Animals / E. Blinova, D. Pakhomov, D. Shimanovsky et al. // *Biomolecules.* – 2021. – Vol. 11. – P. 834.

165. Влияние топического применения наночастиц оксида церия на регенерацию тканей в эксперименте / Галиченко К.А., Сухов А.В., Тимошкин С.П., Алхататнех Б.А.С., Миронов М.М., Елдырева М.В., Сорокваша И.В., Блинова Е.В. // Медико-фармацевтический журнал Пульс. 2023. Т. 25. № 5. С. 96-100.

166. Изучение процессов заживления послеоперационной раны при z-образной пластике кожи в эксперименте на фоне применения церийсодержащего соединения n-ацетил-6-аминогексановой кислоты /Галиченко К.А., Блинова Е.В., Симакина Е.А., Сухов А.В., Шимановский Д.Н., Гилевская Ю.С., Скачилова С.Я., Тимошкин С.П., Кытько О.В., Сорокваша И.Н., Богоявленская Т.А. // Оперативная хирургия и клиническая анатомия (Пироговский научный журнал). 2022. Т. 6. № 3. С. 5-11

167. Спрей для лечения инфицированных и неинфицированных ран при сахарном диабете I типа / Скачилова С.Я., Ермакова Г.А., Блинова Е.В., и др. // Патент на изобретение 2790837 С2, 28.02.2023. Заявка № 2021115803 от 02.06.2021

168. Изучение ранозаживляющей активности церий-содержащего соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты при сахарном диабете 2 типа / Блинова Е.В., Сухов А.В., Сорокваша И.Н., Шимановский Д.Н., Галиченко К.А., Скачилова С.Я. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2022. Т. 21. № 2. С. 75-76.

169. Adib, A Cutaneous wound healing: A review about innate immune response and current therapeutic applications / A.Adib, A.Bensussan, L.Michel // Mediators of Inflammation. – 2021. – Vol.2022. – P.1-16