

## ПРИМЕНЕНИЕ ФИБРОБЛАСТОВ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ РАН У ЖИВОТНЫХ

\*Руколь В.М., \*Андреева Е.Г., \*\*Николаевич Л.Н., \*\*Костюк Н.И., \*\*Стрельчяня И.И., \*\*Барсукова М.В.

\*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,  
г. Витебск, Республика Беларусь.

\*\*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»,  
г. Минск, Республика Беларусь

*В настоящее время, несмотря на применяемые терапевтические препараты, проблема заживления ран остается актуальной. В обзоре рассмотрены возможные механизмы участия субпопуляций фибробластов, которые играют разные роли в восстановлении тканей. Приведены данные отечественной и зарубежной литературы о гетерогенности фибробластов и их физиологической функции при локализации в различных слоях кожи в норме и при патологии. Остается малоизученным полный механизм участия фибробластов при заживлении ран, а также возможности фибробластов стимулировать заживление раны при их введении в ложе раневого очага. **Ключевые слова:** папиллярные фибробласты, ретикулярные фибробласты, фибробласты дермо-подкожного соединения, клоногенные фибробласты.*

## PARTICIPATION OF FIBROBLASTS IN REGENERATIVE THERAPY FOR WOUND HEALING

\*Rukol V.M., \*Andreeva E.D., \*\*Nikolaevich L.N., \*\*Kostyuk N.I., \*\*Strelchenya I.I., \*\*Barsukova M.V.

\*Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

\*\*Institute of Experimental Veterinary Medicine named after A.I. S.N. Vyshel'skogo, Minsk, Republic of Belarus

*At present, despite the unsatisfactory therapeutic effects, the problem of wound healing remains relevant. The review discusses the mechanisms of involvement of fibroblast subpopulations that play different roles in tissue repair, leading to different outcomes of repair, such as normal scarring in physiological tissue repair and fibrosis or ulceration in pathological tissue repair. The data of domestic and foreign literature on the heterogeneity of fibroblasts and their physiological function in localization in different layers of the skin in normal and pathological conditions are presented. The full mechanism of participation of fibroblasts in wound healing remains poorly understood, as well as the ability of fibroblasts to stimulate wound healing when they are introduced into the bed of the wound focus. **Keywords:** papillary fibroblasts, tissue repair, reticular fibroblasts, fibroblasts of the dermo-subcutaneous junction, clonogenic fibroblasts.*

**Введение.** Заживление ран без рубцов до сих пор остается труднодостижимой целью. Способность раны к заживлению зависит от многих условий (вида раны, локализации, возраста, воздействия внешних факторов и т. д.). Некоторые раны хорошо заживают и почти не оставляют шрамов, но некоторые - имеют плохой прогноз и вызывают гипертрофические рубцы или келоиды, которые влияют на функциональную активность или эстетику соответствующих частей тела. Поверхностные повреждения, которые не достигают нижележащей дермы, никогда не приводят к образованию келоидов или гипертрофических рубцов, а это означает, что восстановление тканей после глубоких повреждений дермы отличается от такового после поверхностных повреждений. Исследования показали, что при разрушении области эпидермиса и поверхностной части нижележащей дермы новый эпидермис будет формироваться из волосяных фолликулов с существующими потовыми и сальными железами [1, 2]. Однако, при поражении всей толщи дермы эпителизация ткани может быть достигнута только за счет роста на периферии эпидермиса или за счет использования аутоотрансплантатов.

Установлено, что рубцы образуются только при повреждении дермы и подкожных тканей [3]. Поскольку дерма в основном состоит из фибробластов, наше внимание сосредоточено на этих клетках. Долгое время считалось, что фибробласты имеют простую клеточную морфологию. В настоящее время продемонстрировано, что фибробласты на самом деле представляют собой морфологически и функционально гетерогенную клеточную популяцию [4]. Установление гетерогенности фибробластов в ряде тканей с использованием новых методов представляет собой значительный шаг вперед в области изучения фибробластов.

Общеизвестно, что кожа является самым большим органом в теле и состоит из трех слоев, а именно эпидермиса, дермы и гиподермы, которые выполняют несколько основных функций, включая защиту, терморегуляцию, секрецию, экскрецию, ощущение и абсорбцию [5]. Кожа помогает поддерживать гомеостаз, а здоровая кожа может отражать общее самочувствие организма [6].

Эпидермис является самым верхним слоем кожи и действует как физический барьер, предотвращая потерю воды из организма и останавливая попадание в организм инородных веществ [7]. Он состоит из четырех или пяти слоев эпителиальных клеток, в зависимости от его расположения на теле. Эпидермис в основном состоит из трех типов клеток, а именно кератиноцитов (которые составляют большинство клеток эпидермиса), меланоцитов и клеток Лангерганса [8]. В последние годы в базальном слое эпидермиса были обнаружены клетки Меркеля, но их точная функция до сих пор не ясна.

Дерма расположена между эпидермисом и подкожной клетчаткой и состоит из множества стромальных клеток, отделена от эпидермиса базальной зоной и имеет тесный контакт с остальными слоями. Дерма состоит из двух слоев соединительной ткани, которые составляют взаимосвязанную сетку из эластиновых и коллагеновых волокон, продуцируемых фибробластами. Дерма обеспечивает структуру, прочность и гибкость кожи и содержит другие структуры, такие как кровеносные капилляры, сальные и потовые железы, нервные окончания и волосные фолликулы. Резидентным типом клеток дермы являются дермальные фибробласты, которые продуцируют внеклеточный матрикс (ВКМ) и способствуют инициации и циклированию волосных фолликулов [1].

Гиподерма, также называемая подкожным слоем или поверхностной фасцией, представляет собой слой непосредственно под дермой, служащий для соединения кожи с подлежащей фиброзной тканью костей и мышц. Подкожный слой в основном состоит из адипоцитов, нервов и кровеносных сосудов. Адипоциты организованы в дольки, которые разделены структурами, называемыми перегородками. Перегородки содержат нервы, более крупные кровеносные сосуды, фиброзную ткань и фибробласты. Таким образом, гиподерма может функционировать как способ хранения жира и обеспечивать изоляцию и амортизацию покровов.

Вышеуказанные три слоя составляют самый большой защитный барьер для тела организма и обеспечивают защиту от механических воздействий, давления, перепадов температуры, микроорганизмов, радиации и химических веществ.

Обнаружено, что папиллярные фибробласты имеют тонкую морфологию, двустворчатую или трехстворчатую форму и тесно расположены в верхних слоях дермы. Они в основном распределены примерно на 300–400 мкм в субэпидермальном сосочковом слое дермы, причем верхняя граница тесно связана с базальной мембраной эпидермиса, а нижняя граница представляет собой сосудистую сеть сосочкового слоя дермы. Ретикулярные фибробласты имеют звездообразную форму и негетерогенную морфологию распространения, расположены рыхло с большими промежутками. Они расположены в глубоких слоях дермы и обычно находятся на глубине 700 мкм от поверхности кожи и ниже, чтобы избежать смешения папиллярного и ретикулярного материала. Напротив, фибробласты дермально-подкожного соединения более гетерогенны, с неравномерной морфологией, варьирующей от маленьких трехстворчатых до более крупных клеток звездчатой формы с видимыми трабекулярными сетями.

Кроме того, фибробласты можно различать по их профилю поверхностных маркеров. Например, проанализировали специфическую экспрессию генов папиллярных и ретикулярных фибробластов в коже человека. С одной стороны, обнаружили, что нетрин-1, подопланин и атипичный хемокиновый рецептор 4 в высокой степени экспрессируются в папиллярных фибробластах. Авторы предположили, что эти клетки экспрессируют гены, которые в основном усиливают кожный иммунитет, реакцию хозяина и путь активации комплемента. С другой стороны, высокая экспрессия трансглутаминазы 2, кальпонина 1, кадгерина 2 и белка матрикса gla в ретикулярных фибробластах указывает на то, что данные клетки экспрессируют гены, участвующие в динамике цитоскелета и подвижности клеток. Гетерогенность фибробластов способствует различным функциям субпопуляций при заживлении ран, включая отложение и организацию внеклеточного матрикса, секрецию факторов роста и цитокинов, а также иммуномодуляцию. Повреждение тканей разрушает кровеносные сосуды и вызывает экстравазацию компонентов крови. Первой реакцией организма является сужение поврежденных сосудов и активация тромбоцитов, что не только способствует образованию гемостатической пробки, но и приводит к секреции ряда медиаторов заживления ран, таких как фактор роста тромбоцитов (PDGF) и бета-трансформирующий фактор роста (TGF- $\beta$ ), который инициирует воспалительную реакцию. Эти факторы роста являются важными клеточными медиаторами для последующих фаз заживления ран. TGF- $\beta$  является центральным цитокином, вызывающим переход фибробластов в миофибробласты, и основной задачей активированных миофибробластов является восстановление утраченного или поврежденного ВКМ [4]. Обнаружено, что TGF- $\beta$ 1 может индуцировать дифференцировку папиллярных фибробластов в ретикулярные фибробласты в монослойной культуре, что в определенной степени указывает на то, что фибробласты, трансформировавшиеся в миофибробласты, скорее всего, являются ретикулярными [5]. PDGF является наиболее активно высвобождаемым фактором, стимулирует миграцию фибробластов в рану [6]. Исследования показали, что ретикулярные фибробласты проявляют большую чувствительность к PDGF, чем папиллярные, что указывает на то, что ретикулярные фибробласты являются первым типом фибробластов, который мигрирует в рану. Кроме того, при миграции ретикулярных фибробластов может секретироваться большое количество коллагена и внутриклеточного матрикса на ранней стадии заживления ран [2].

По окончании фазы воспаления следует фаза пролиферации. Во время этой фазы процессы заживления синхронизируются, включая формирование грануляционной ткани, реэпителизацию, неоваскуляризацию и иммуномодуляцию. Грануляционная ткань в основном состоит из активированных фибробластов и новых капилляров с воспалительной клеточной инфильтрацией [8]. Эта ткань может не только поглощать и заменять различные инактивированные ткани для заполнения ран, но также может играть роль в защите ран от инфекции. Наконец, на последующей фазе ремоделирования ткани грануляционная ткань превращается в рубцовую ткань, что позволяет заживать

рану, отмечая ее созревание [2]. Активированные фибробласты обычно представляют собой миофибробласты, которые признаны основным компонентом грануляционной ткани [3]. Первоначальное восстановление дермы связано с ретикулярными фибробластами и фибробластами дермально-подкожного соединения, участвующими в «первой волне» регенерации дермы, а именно в фазе гемостаза и воспаления ретикулярные фибробласты наиболее быстро мигрируют в рану, в то время как отмечено отсутствие папиллярных фибробластов в фазе формирования грануляционной ткани. Учитывая, что фибробласты представляют собой функционально гетерогенную клеточную популяцию, вполне возможно, что только определенные субпопуляции фибробластов могут дифференцироваться в миофибробласты во время заживления ран. Ретикулярные и фибробласты дермально-подкожного соединения являются основными клеточными элементами, участвующими в восстановлении дермы после индукции в миофибробласты, а папиллярные фибробласты не участвуют в восстановлении дермы. Они завершают стадию ремоделирования дермы при восстановлении тканей, мигрируют к месту раны и секретируют большое количество коллагена и ВКМ на ранней стадии заживления ран.

В большинстве клинических случаев закрытие ран считается конечной точкой заживления ран, но раны могут продолжать подвергаться ремоделированию или созреванию тканей в течение нескольких месяцев или даже лет. Этот последний этап заживления раны в конечном итоге определяет, произойдет ли рубцевание или повторится рана. Примерно на второй неделе репарации в генетических исследованиях на мышах показано, что фибробласты приобретают миофибробластный фенотип, характеризующийся отложением внеклеточного матрикса с последующим образованием грануляционной ткани. По мере ремоделирования раны созревание грануляционной ткани сопровождается атрофией сосудов и реорганизацией коллагена. Лизис коллагена III происходит одновременно с синтезом коллагена I, за которым следует реорганизация внеклеточного матрикса и окончательное преобразование грануляционной ткани в рубцовую. Клетки заживающего глубокого слоя дермы имеют фенотип, напоминающий миофибробласты.

Заживление – сложный и динамичный процесс, и рубцы, не влияющие ни на функцию, ни на внешний вид, можно рассматривать как завершающую стадию восстановления тканей. Однако существование патологической репарации тканей вызывает озабоченность ученых во всем мире. Патологическое восстановление тканей обычно относится к двум типам заживления ран: чрезмерному заживлению и недостаточному заживлению. Как клетки соединительной ткани фибробласты отвечают за отложение коллагена, что делает их основными производителями и организаторами ВКМ и необходимыми для восстановления поврежденных тканей. Однако, слишком большое отложение коллагена в месте раны вызывает потерю нормальной анатомической структуры и нарушение функции с последующим фиброзом. Напротив, отложение недостаточного количества коллагена приводит к нарушению заживления ран.

В большинстве случаев кожные раны человека заживают репаративным путем, который получил название «репаративное заживление ран» [2]. Этот тип заживления оставляет рубцы без восстановления придатков кожи, и одним из наиболее показательных примеров является рубцевание, возникающее у сильно обожженных людей. Однако существует также тип заживления, не оставляющий рубцов и имеющий полный комплект функциональных кожных придатков, который называется «регенеративное заживление ран» или «безрубцовое заживление ран» [5]. Было показано, что эмбриональные фибробласты человека способны восстанавливать кожные раны без образования рубцов [3].

Ранее методом клонирования фибробластов выявлено, что эмбриональные фибробласты человека характеризуются клональной гетерогенностью и формируют шесть типов клонов с различной пролиферативной активностью. Веретенновидные фибробласты характеризуются высоким потенциалом деления и формируют многоклеточные клоны в условиях *in vitro*. Возможно, клоногенные веретенновидные фибробласты, формирующие многоклеточные колонии в условиях *in vitro*, могут быть избранной популяцией клеток, стимулирующей заживление ран при введении в ложе раневого очага и использоваться в терапевтических целях.

К сожалению, механизм регенеративного заживления ран до конца не изучен, и в настоящее время достижение безрубцового заживления затруднено. Однако углубленное исследование гетерогенности фибробластов может дать надежду на безрубцовое заживление раневых дефектов.

Целью наших исследований явилось, на основании литературных данных, разработать технологию получения фибробластов, оказывающих эффективное и безопасное действие при лечении животных с различными хирургическими болезнями.

**Материалы и методы исследований.** Работа была выполнена в отделе культур клеток и питательных сред РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Материалом для выделения фибробластов служила кожно-мышечная ткань эмбриона коровы. В стерильных условиях (ламинарном шкафу) из эмбриона коровы извлекали кожно-мышечную ткань и помещали в стерильные чашки Петри. Далее измельчали на кусочки размером около 3 мм<sup>3</sup>, которые двукратно отмывали раствором Хенкса с антибиотиками. Подготовленные образцы переносили в стерильную колбу с 2,5 % раствора трипсина (Gibco, Великобритания) в соотношении 1:3. Помещали в

шейкер инкубатор (Environmental Shaker-Incubator ES-20 (BioSan) и перемешивали на скорости 100 об./мин. при температуре 37 °C ( $\pm 0,1$ ) в течение 30-40 минут. После инкубации супернатант переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали собранные на этапе клетки в течение 15-20 мин. при 1000 об./мин. Надосадочную жидкость удаляли, а конечный осадок ресуспендировали в небольшом количестве питательной среды, содержащей 30 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭСТ). Полученную суспензию клеток окрашивали 0,5 % раствором трипанового синего. Количество жизнеспособных клеток подсчитывали в камере Горяева (по Дьяконову). Рассевали в культуральные флаконы с посевной концентрацией 600 тыс. клеток в мл ростовой среды (среда 199). Клетки культивировали в термостате (ShellLab, США) при температуре 37 °C ( $\pm 0,1$ ). Замену ростовой питательной среды осуществляли каждые 2-4 дня в зависимости от снижения рН. Фибробласты культивировали до монослоя с конfluenceностью 95-100 % в течение 7-9 суток. Проводили ежедневный визуальный контроль под инвертированным микроскопом  $\times 100$  (Nikon TS 100, Япония).

**Результаты исследований.** Долгое время считалось, что фибробласты представляют собой окончательно дифференцированные веретенообразные клетки и представляют один тип клеток. Однако с тех пор эта точка зрения была опровергнута. Одним из примеров является дерма. Дерму можно разделить на две разные части: поверхностный сосочковый слой и глубокий ретикулярный слой. Состав и структура слоев дермы значительно различаются по внеклеточному матриксу (ВКМ), который представляет систему белков и полисахаридов, осуществляющих поддержание структурной целостности органа или ткани. В то же время компоненты межклеточного матрикса помимо своей «классической» функции осуществляют регуляцию многих важных процессов, включая участие в передаче сигнала, регуляцию деления и дифференцировки клеток, что делает молекулы межклеточного матрикса перспективным объектом для терапии многих заболеваний. Было обнаружено, что фибробласты из папиллярной и ретикулярной областей дермы взрослого человека обладают различной пролиферативной способностью, но сохраняют сходные морфологические особенности. Недавно исследователи обратили внимание на место соединения дермы и подкожной клетчатки и обнаружили, что фибробласты дермо-гиподермального соединения имеют заметные функциональные отличия от дермальных фибробластов. Фибробласты в дерме кожи были разделены на папиллярные, ретикулярные и фибробласты дермально-подкожного соединения, а также проанализированы сходства и различия между этими тремя типами фибробластов с целью определения причин их дифференцированного восстановления тканей.

Выделенные кожно-мышечные фибробласты обладали способностью адгезироваться к поверхности культурального флакона, демонстрировали типичную фибробластоподобную форму. Среди свежемозолированных клеток наблюдали низкий уровень клеточной гибели. Фибробласты обладали высоким потенциалом пролиферации и стабильностью. Формировали высококонфлюэнтный клеточный монослой (95-100 %) в условиях посевной концентрации при посевной дозе 600 000 в мл среды на 5-7 сутки культивирования. Доля жизнеспособных клеток составила 97 %.

Клетки имели веретенообразную мультиполярную форму, на 2-4 сутки хорошо распластаны на культуральной поверхности. По мере культивирования в конфлюэнтном слое клетки биполярны и менее распластаны (7-9 сутки). Образовывали характерные параллельные решетки и завитки. Ядро фибробластов овальной формы с содержанием 2-3 ядрышек. Грануляция и вакуолизация вокруг ядра отсутствует. В культуральной среде единичные клетки во взвешенном состоянии имели шаровидную форму.

Популяции полученных фибробластов обладали высокой пролиферативной активностью и при клонировании образовывали многоклеточные колонии (50-60 клеток).

**Заключение.** Проведенный анализ литературных источников показал, что изучение механизмов заживления ран позволяет глубже понять потенциал гетерогенных субпопуляций фибробластов в восстановлении кожи. Каждая субпопуляция фибробластов имеет свои уникальные физиологические характеристики и участвует в микроокружении кожи. Участие комплекса субпопуляций фибробластов в заживлении ран и их сходство с миофибробластами позволяют полагать, что они играют ключевую роль в репаративном заживлении ран.

**Литература.** 1. Комплексное лечение коров при язвах Рустегольца с применением мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани / В. М. Руколь [и др.] // Ученые записки учреждения образования «Витебская орден «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». – 2021. – Т. 57, вып. 1. – С. 53–56. 2. Квитко, О.В. Сравнительный анализ эпигенетической структуры популяций фибробластов человека и мыши / О. В. Квитко, Л. Н. Жукова, Л. Н. Николаевич // Доклады Академии наук БССР. – 1991. – Том. 35, № 11. – С. 1031–1033. 3. Фибробласты: Гетерогенные клетки с потенциалом в регенеративной терапии для заживления ран без рубцов / М. Л. Зу [и др.] // Границы клеточной биологии и биологии развития. – 2021. – Т. 9. – С. 1-9. 4. Соррелл, Дж. М. Гетерогенность фибробластов: глубже кожи / Дж. М. Соррелл, А. И. Каплан // Cell Science. – 2004. – Т. 117. – С. 667-675. 5. Вудли, Д. Т. Отдельные фибробласты в папиллярной и ретикулярной дерме: значение для заживления ран / Д. Т. Вудли // Клиника дерматологии. – 2017. – Т. 35. – С. 95-100. 6. Запуск травмой массовой миграции клеток фибробластов фасции, приводящую к образованию рубцов с помощью N-кадгерина / Д. Цзян [et.al] // Nature Communications. – 2020. – Т. 11. – С. 5653. 7. Связь гетерогенности фибробластов с изменчивостью в перепрограммировании и заживлении ран. / С. Махмуди [и др.] // Природа. – 2019. – Т. 574. – С. 553-558. 8. Взаимосвязь между функцией кожи и барьерными свойствами / А. К. Дабровска [и др.] // Skin Research and Technology. – 2018. – № 24. – С. 165-174.

Поступила в редакцию 13.09.2022.