

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Северный государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

*На правах рукописи*

Шутский Никита Алексеевич

**МЕХАНИЗМЫ РЕМОДУЛЯЦИИ МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА  
ДЕРМЫ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ОСТРОГО  
ОТМОРОЖЕНИЯ ПРИ НАРУШЕНИИ ГЛЮКОЗОТОЛЕРАНТНОСТИ**

3.3.3. Патологическая физиология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

*Сергей Леонидович Кашутин,*

*доктор медицинских наук, доцент*

Архангельск – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	5
Глава 1 – Обзор литературных источников .....	12
1.1 – Структурно-функциональные характеристики дермы.....	12
1.1.1 – Общее строение дермы .....	12
1.1.2 – Дермальные фибробласты .....	13
1.1.3 – Коллаген как основной белок межклеточного матрикса дермы	16
1.1.4 – Виды и действие коллагеназ.....	20
1.2 – Холодовые повреждения кожи .....	22
1.2.1 – Особенности отморожения кожи.....	22
1.2.2 – Морфологические изменения при холодовых повреждениях ....	23
1.2.3 – Сialовые кислоты – маркер деградации межклеточного вещества дермы.....	25
1.3 – Механизм регенерации дермы при нарушении толерантности к глюкозе.....	26
1.3.1 – Нарушение толерантности к глюкозе.....	26
1.3.2 – Особенности регенерации дермы при нарушении толерантности к глюкозе.....	27
1.3.3 – Регуляция процесса регенерации.....	28
1.3.4 – Инсулиноподобный фактор роста .....	30
Глава 2 – Объект и методы исследования .....	33
2.1 – Объект исследования .....	33
2.2 – Методы исследования.....	34
2.2.1 – Моделирование нарушения толерантности к глюкозе.....	34
2.2.2 – Моделирование острого отморожения.....	36
2.2.3 – Техника взятия биоматериала панч-биопсией .....	36
2.2.4 – Определение количественного содержания коллагена дермы ...	37

2.2.5 – Выделение коллагеновых волокон дермы .....	38
2.2.6 – Электронно-сканирующая микроскопия .....	39
2.2.7 – Гистологическое исследование кожи .....	40
2.2.8 – Методика окрашивания срезов гематоксилин-эозином .....	42
2.2.9 – Методика окрашивания срезов по методу Ван-Гизона .....	43
2.2.10 – Определение инсулиноподобного фактора роста в сыворотке крови.....	45
2.2.11 – Определение сиаловых кислот в сыворотке крови.....	46
2.2.12 – Методы статистического анализа .....	46
Список работ, опубликованных по материалам, изложенным в 2 главе ..	47
Глава 3 – Интенсивность деградации и синтеза межклеточного матрикса дермы у крыс после локального холодового воздействия.....	48
3.1 – Динамика заживления раневой поверхности после острого отморожения.....	48
3.2 – Содержание коллагена и толщина коллагеновых волокон дермы у крыс после острого отморожения .....	49
3.3 – Содержание сиаловых кислот в сыворотке крови у крыс после острого отморожения.....	52
3.4 – Гистологическое исследование кожи крыс после острого отморожения.....	54
3.5 – Клеточный состав дермы у крыс после острого отморожения .....	61
3.6 – Содержание инсулиноподобного фактора роста в сыворотке крови крыс после острого отморожения .....	62
3.7 – Резюме .....	65
Список работ, опубликованных по материалам, изложенным в 3 главе ..	66
Глава 4 – Интенсивность деградации и синтеза межклеточного матрикса дермы после острого отморожения у крыс на фоне нарушения толерантности к глюкозе .....	68

4.1 – Динамика заживления раневой поверхности после острого отморожения у крыс на фоне нарушения толерантности к глюкозе .....	68
4.2 – Содержание коллагена дермы у крыс после острого отморожения на фоне нарушения толерантности к глюкозе .....	69
4.3 – Сравнение содержания коллагена и толщины коллагеновых волокон дермы у крыс после острого отморожения .....	72
4.4 – Содержание сиаловых кислот в сыворотке крови у крыс после острого отморожения на фоне нарушения толерантности к глюкозе .....	72
4.5 – Сравнение значений содержания сиаловых кислот в сыворотке крови у крыс после острого отморожения .....	74
4.6 – Гистологическое исследование кожи после острого отморожения у крыс на фоне нарушения толерантности к глюкозе .....	75
4.7 – Клеточный состав дермы после острого отморожения у крыс на фоне нарушения толерантности к глюкозе .....	76
4.8 – Сравнение значений клеточного состава дермы у крыс после острого отморожения .....	78
4.9 – Содержание инсулиноподобного фактора роста в сыворотке крови после острого отморожения у крыс на фоне нарушения толерантности к глюкозе .....	81
4.10 – Сравнение значений инсулиноподобного фактора роста в сыворотке крови после острого отморожения .....	83
4.11 – Резюме .....	84
Список работ, опубликованных по материалам, изложенным в 4 главе ..	86
Заключение .....	88
Выводы .....	100
Практические рекомендации .....	102
Список сокращений .....	103
Список использованной литературы.....	104

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Необходимость изучения процессов регенерации тканей в постхолодовой период обусловлены освоением Арктической зоны, для которой свойственны абсолютно дискомфортные климатические условия [18, 21]. Под покровом льдов Арктики сосредоточены до 20% нефтяных и более 50% газовых отечественных запасов, а также месторождения различных полезных ископаемых и редких металлов (золота, угля, хрома, марганца и др.). Освоение Арктической зоны определено в стратегии развития Арктической зоны Российской Федерации и обеспечения национальной безопасности на период до 2035 года [17, 85, 108]. В тоже время, сезонный характер холодового повреждения, число случаев отморожений (20% от всех случаев термических травм), сложность лечения с большой продолжительностью временной нетрудоспособности, высокий риск инвалидизации, особенно в молодом трудоспособном возрасте, определяют экономическую составляющую холодового повреждения как социальной проблемы [13, 33, 54, 57, 59, 60, 72, 83].

Механизмы регенерации тканей после холодового воздействия разных степеней освещены достаточно подробно с учетом не только изменений по суткам, но и по часам, с указанием гистологических и иммуногистохимических изменений в эпидермисе и дерме, в первую очередь, с описанием качественных изменений клеточного состава дермы и ее межклеточного матрикса, представляющего собой волокнистые структуры (коллаген и эластин), а также межклеточного вещества [14, 34, 77, 82, 85, 87].

В то же время гистологические и иммуногистохимические методы не позволяют количественно оценить интенсивность деградации, равно как и синтеза коллагена, что обуславливает необходимость разработки методов, позволяющих количественно определить степень изменения данных процессов [38, 55]. С другой стороны, оценить интенсивность изменений межклеточного вещества возможно,

определяя концентрацию сиаловых кислот. Известно, что сиаловые кислоты – ациальные производные нейраминовой кислоты, являющейся одним из компонентов межклеточного вещества соединительной ткани, в том числе дермы. В процессе деградации межклеточного матрикса дермы уровень сиаловых кислот в сыворотке крови повышается, что позволяет оценить интенсивность деградации межклеточного вещества [22, 55, 114].

Отягчающим фактором восстановительного периода после различного рода повреждений нередко могут являться последствия отклонений на основе инсулинорезистентности и компенсаторной гиперинсулинемии, при которых возникает вероятность развития нарушений микроциркуляции и энергетического обмена [102].

Наблюдения показывают, что метаболические отклонения в виде нарушения толерантности к глюкозе (НТГ) широко распространяются во всем мире, и Арктическая зона не стала исключением [39, 41, 102]. С учетом частоты регистрации случаев нарушения глюкозотолерантности в северных широтах, изучение механизмов ремодуляции межклеточного матрикса дермы, сопряженных с их наличием, представляет не только теоретический, но и практический интерес [7, 41, 97, 119]. Также важным является определение уровня секреции и влияния на регенеративные процессы в условиях нарушенной толерантности клеток к глюкозе инсулиноподобного фактора роста (IGF-1), который является стимулятором пролиферации и дифференциации клеток и заживления тканей, а также выполняет инсулиноподобную функцию по улучшению потребления глюкозы клетками [93].

Все перечисленное определяет актуальность, перспективность и практическую значимость анализа влияния нарушения толерантности к глюкозе на интенсивность деградации и синтеза межклеточного матрикса дермы, что, в свою очередь, влияет на длительность и качество восстановления кожных покровов после локального холодового воздействия.

**Степень разработанности темы.** Изучение патологических процессов термических поражений, в частности, холодовых воздействий, получили широкое распространение в связи с частой регистрацией таких случаев [17, 25, 54, 59, 60, 62,

73]. Вопросам патологии локальных холодовых воздействий кожи посвящено большое количество публикаций ведущих научных журналов по дерматологии и травматологии. Представленные в них рекомендации зарегистрированы отечественными и зарубежными исследователями. В публикациях этих авторов изложены основы тактики лечения отморожений [10, 17, 27, 66, 88, 94, 119]. Несмотря на некоторые успехи, достигнутые в исследовании патогенеза холодовых повреждений, многие вопросы остаются открытыми.

В исследовании регенерационных процессов важным является изучение влияния отягчающих факторов, хронических заболеваний и патологических состояний, к которым можно отнести нарушение толерантности к глюкозе [7, 41, 78, 84, 99, 102]. Однако вопрос о том, какое влияние оказывает такое отклонение на ремодуляцию дермы, остается малоизученным.

**Цель исследования** – проанализировать механизмы ремодуляции межклеточного матрикса дермы на экспериментальной модели острого отморожения при нарушении глюкозотолерантности.

В соответствии с поставленной целью исследования были сформулированы следующие **задачи**:

1. Сравнить продолжительность ремодуляции в зоне повреждения после локального острого отморожения у крыс с нарушением и без нарушения толерантности к глюкозе.

2. Исследовать содержание коллагена дермы после локального острого отморожения у крыс с нарушением глюкозотолерантности.

3. Определить динамику толщины коллагеновых волокон дермы после локального острого отморожения у крыс с индуцированным нарушением толерантности к глюкозе.

4. Установить динамику концентрации сиаловых кислот в сыворотке крови после острого локального отморожения у крыс с нарушением глюкозотолерантности.

5. Проанализировать локализацию клеток дермы после острого локального отморожения у крыс на фоне нарушения толерантности к глюкозе.

б. Исследовать концентрацию инсулиноподобного фактора роста (IGF-1) в сыворотке крови в ходе регенераторного процесса после острого локального отморожения у крыс на фоне нарушения толерантности к глюкозе.

**Научная новизна и теоретическая значимость работы.** Впервые установлены количественные критерии деградации и синтеза межклеточного матрикса дермы в ходе ремодуляции после локального острого отморожения на фоне нарушения толерантности к глюкозе. Впервые выявлено, что снижение содержания коллагена межклеточного матрикса дермы, регистрируемое на 3 сутки после острого локального отморожения, сменяется синтезом и формированием его уже на 7 сутки, независимо от наличия или отсутствия нарушений толерантности к глюкозе. Выявлено, что интенсивный синтез коллагена на фоне нарушения толерантности к глюкозе происходит на 7-14 сутки ремодуляции кожи, что по продолжительности короче, чем в условиях отсутствия такого нарушения (3-7 сутки и 14-21 сутки). Показано, что при отклонении толерантности к глюкозе время формирования толщины коллагеновых волокон ограничено интервалом с 3 по 14 сутки (против интервала с 3 по 21 сутки в группе без нарушения толерантности к глюкозе).

Впервые установлено, что ремодуляция дермы в условиях нарушения толерантности к глюкозе связана с более поздней концентрацией клеток на границе сетчатой дермы и гиподермы. Процесс восстановления дермы после локального острого отморожения сопряжен с увеличением концентрации инсулиноподобного фактора роста (IGF-1).

Научная новизна подтверждается патентами Российской Федерации на изобретения: «Способ определения количества коллагена в ткани» № 2689337 от 2 июля 2018 г., «Способ выделения коллагеновых волокон дермы» № 2764514 от 23 декабря 2020 г.

**Практическая значимость работы.** Определены количественные критерии синтеза и деградации межклеточного матрикса дермы на экспериментальной модели острого отморожения при нарушении толерантности клеток к глюкозе.

В условиях нарушения толерантности к глюкозе снижение содержания коллагена в дерме (менее 60 %) и увеличение концентрации сиаловых кислот в сыворотке крови (более 276 усл. ед.) может служить биомаркером активности процессов деградации межклеточного матрикса дермы.

Практическая значимость исследования заключается в разработке методологии количественного определения коллагена (патент РФ № 2689337).

Успешно разработана и апробирована методика выделения коллагеновых волокон дермы (патент РФ № 2764514), которая может быть использована для анализа структуры изолированных коллагеновых волокон.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Содержание коллагена дермы и толщина коллагеновых волокон до острого отморожения не зависят от наличия или отсутствия нарушения толерантности к глюкозе, в отличие от концентрации сиаловых кислот и IGF-1 в сыворотке крови.

2. После локального острого отморожения синтез и формирование коллагена дермы происходит с низкой интенсивностью на фоне нарушения толерантности к глюкозе.

3. Процесс ремодуляции межклеточного матрикса дермы после острого отморожения происходит на фоне увеличения концентрации IGF-1 в сыворотке крови.

**Степень достоверности результатов проведенных исследований.** Достоверность и обоснованность результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным объемом экспериментального материала и использованием современных методик, опубликованных в научных изданиях. Допущенные предположения, утверждения и выводы, сформулированные в диссертации, подтверждены данными в виде таблиц и рисунков.

**Личный вклад диссертанта.** Автором совместно с научным руководителем сформулированы цель, задачи, основные положения, выносимые на защиту, выводы по работе. Воспроизведение экспериментальных моделей метаболических отклонений в виде нарушения толерантности к глюкозе и острого отморожения, разработка способов определения количества коллагена в ткани и выделения

коллагеновых волокон дермы, гистологические исследования, определение концентраций инсулиноподобного фактора роста-1 и сиаловых кислот в сыворотке крови, анализ и обобщение результатов исследования, подготовка материалов для публикаций в научных изданиях и для получения двух патентов, апробация результатов исследования, написание и оформление рукописи диссертации осуществлены лично автором.

**Апробация диссертации.** Основные результаты работы были представлены в виде тезисов и докладов на следующих научных конференциях: научно-практическая конференция, посвященная памяти академика Н.А. Агаджаняна «Научное наследие, современные аспекты физиологии» (г. Архангельск, 2023); VIII междисциплинарный медицинский форум «Актуальные вопросы врачебной практики. Беломорские зори» (г. Архангельск, 2023); LI Ломоносовские чтения. Итоговая научная сессия «Фундаментальные и прикладные аспекты сбережения здоровья человека в Арктике», приуроченная к 300-летию Российской академии наук (г. Архангельск, 2023); LI Ломоносовские чтения. Итоговая научная сессия «Медицина в Арктике: экологические, фундаментальные и прикладные аспекты», посвящённая 90-летию СГМУ (Архангельск, 2022); IV междисциплинарный медицинский форум «Актуальные вопросы врачебной практики. Беломорские зори» (Архангельск, 2019); V Общероссийский форум «Медицина в Арктике: экологические, фундаментальные и прикладные аспекты» (Архангельск, 2019); XLVII Ломоносовские чтения «Проблемы гистологии, цитологии, эмбриологии и анатомии». Фундаментальные аспекты морфологии и цитологии (Архангельск, 2018); XLVI Ломоносовские чтения «Проблемы гистологии, цитологии, эмбриологии и анатомии». Фундаментальные аспекты морфологии и цитологии (Архангельск, 2017).

**Внедрение результатов исследования в практику.** Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс на лечебном факультете и факультете медико-профилактического дела и медицинской биохимии (акт внедрения от 14.03.2023); в научный процесс Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО СГМУ (г. Архангельск) Минздрава

России (2 акта внедрения от 15.03.2023); в рабочие программы по дисциплине «Дерматовенерология» в раздел «Общая дерматология» (выписка из протокола заседания кафедры кожных и венерических болезней № 5 от 02.11.2023) ФГБОУ ВО СГМУ (г. Архангельск) Минздрава России); результаты исследования используются в разделе программы «Физиология человека и животных» при прохождении учебной и производственной практики студентов и аспирантов на базе лаборатории физиологии иммунокомпетентных клеток ФГБУН Федерального исследовательского центра комплексного изучения Арктики им. акад. Н.П. Лаверова УрО РАН (акт внедрения от 16.03.2023).

**Публикации.** По результатам диссертационной работы опубликовано 11 статей, из них 3 статьи – в журналах, включенных в Перечень ВАК (для публикации результатов диссертационных исследований по специальности 3.3.3. Патологическая физиология) и/или индексируемых в МБД Scopus, WoS и RSCI, получено 2 патента РФ.

**Структура и объём работы.** Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введение, обзор литературных источников, объект и методы исследования, 2 главы результатов собственных исследований, заключение, выводы, список литературы (119 источников). Работа изложена на 117 страницах текста, содержит 21 рисунок и 12 таблиц.

## ГЛАВА 1 – ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

### 1.1 – Структурно-функциональные характеристики дермы

#### 1.1.1 – Общее строение дермы

Кожа – это особый наружный орган тела, выполняющий функции защиты организма, обмена веществ, терморегуляции и др. Она состоит из трёх плотно прикреплённых друг к другу слоев: наружный – эпидермис, средний – дерма и внутренний – гиподерма (подкожная жировая клетчатка). Также в состав кожи входят ее производные, к которым относят кожные железы (сальные и потовые), ногти и волосы [3, 68, 89, 98].

Самым крупным слоем кожи является дерма, развивающаяся из гиподермы. Основу дермы составляет соединительная ткань, которая представлена в виде рыхлых волокнистых структур – эластических волокон, которые присутствуют в данном слое, придают коже прочность, упругость, эластичность, и коллагеновых волокон, являющихся основными компонентами дермы [8]. Примерная толщина дермального слоя варьируется от 0,5 до 5,0 мм. В ней выделяют два слоя, имеющие условную границу, – это сосочковый и сетчатый слои. Сосочковый слой представлен рыхлой волокнистой соединительной тканью, имеет многочисленные сосочки, которые выступают в эпидермис. Этот слой дермы богат кровеносными сосудами, нервными сплетениями, отростками нервных волокон, лимфатическими сосудами. Также здесь присутствуют болевые, тактильные, тепловые и холодные рецепторы. Сетчатый слой расположен под сосочковым и образован плотной неоформленной соединительной тканью, в которой имеется много производных кожи [15, 22, 35, 47].

В дерме нет четкого структурированного и направленного процесса клеточной дифференцировки, как в эпидермисе, однако в ней прослеживается четкая структурная организация элементов в зависимости от глубины их залегания.

И клетки, и межклеточный матрикс (МКМ) дермы подвергаются постоянному обновлению и ремоделированию [103].

### **1.1.2 – Дermalные фибробласты**

Особая роль в процессах формирования соединительной ткани отводится компонентам межклеточного матрикса. Коллаген – один из основных компонентов МКМ, который принимает участие в регуляции различных процессов, протекающих и в норме, и при различных патологических состояниях. В связи с этим, выбор адекватной и достоверной методики для оценки содержания данного компонента МКМ в процессе восстановления соединительной ткани при различных повреждениях остается актуальным [8, 11, 47, 50, 115].

Основным продуцентом белков межклеточного матрикса являются дермальные фибробласты, которые формируют структурную трехмерную сеть дермы [74, 92]. Структура МКМ оказывает значительное влияние на функции фибробластов. Согласно опубликованному исследованию [96], физические свойства коллагеновых волокон оказывают непосредственное влияние на функциональную активность дермальных фибробластов. В частности, фрагментация коллагенового матрикса приводит к нарушению целостности коллагеновой сети МКМ, что сопровождается нарушением фокальных контактов между коллагеновым матриксом и фибробластами, что, в свою очередь, лишает фибробласты возможности находиться в растянутом состоянии, которое является обязательным условием для их метаболической активности, роста и функционирования.

Вполне очевидно, что влияние на рост и развитие соединительной ткани может быть одним из тех решений, способных повысить эффективность лечения локальных отморожений. Опираясь на данное предположение, возникает интерес к изучению механизмов, направленных на замещение дефектов собственными тканями.

Фибробласты *in vivo* характеризуются пластичностью и разнообразием форм и могут иметь овальную, полигональную, веретеновидную форму или форму

отростка в зависимости от своего функционального состояния. В эмбриогенезе фибробласты происходят из стволовых клеток костного мозга [24, 110]. Клетки фибробластического дифферона синтезируют все основные компоненты МКМ в дерме: фибриллярные белки, протеогликаны, гликозаминогликаны. Также доказано, что эти клетки играют ключевую роль в непрерывном процессе ремоделирования межклеточного матрикса [76].

Фибробласты в различных слоях дермы отличаются по морфологическим и функциональным свойствам. От глубины их залегания в дерме зависит не только количество синтезируемого ими коллагена, но и соотношение типов этого коллагена, а также синтез коллагеназы: фибробласты более глубоких слоев дермы производят меньшее ее количество [110].

Фибробласты дермы являются особым звеном в биологии кожи. Они играют значительную роль в поддержании гомеостаза МКМ и физиологического состояния всех слоёв кожи. Продуцируя ростовые факторы, тем самым косвенно воздействуя на эпителиальные клетки через базальную мембрану, фибробласты участвуют в регуляции морфогенеза эпидермиса. Синтезируя проангиогенные факторы роста, они способствуют образованию и стабилизации сосудов, поддерживая трофику всех слоев кожи, включая гиподерму. Вырабатывая коллагены IV и VII типов, гликопротеины и ламинин, участвуют в организации базальной мембраны. По мнению ведущих ученых, фибробласты в дерме играют ключевую роль в физиологии кожи и благодаря своим уникальным свойствам представляют собой основу этой самой обширной ткани организма [23, 110].

Во второй половине прошлого века Хрущов Н. Г. показал существование двух типов фибробластов [80]. Короткоживущие фибробласты, которые входят в самый многочисленный тип, характеризуются интенсивной пролиферацией и играют ключевую роль в регенеративных процессах. Второй тип – это долгоживущие фибробласты. По сравнению с первым типом, у них наблюдается меньший уровень синтетических процессов. Через несколько лет Серовым В. В. и Шехтером А. Б. была предложена другая классификация, согласно которой дифференцированные фибробласты подразделяются на клетки с умеренным

синтезом коллагена и клетки, для которых характерен интенсивный процесс коллагенеза и которые преобладают в процессах регенерации [65].

В настоящее время считается, что в коже содержится три субпопуляции фибробластов [37, 48], которые имеют собственные локализации. Вклад, который они вносят в процессы структурных перестроек кожи, сложно переоценить.

Согласно данному предположению, одной субпопуляцией являются папиллярные дермальные фибробласты, которые локализуются в поверхностных слоях дермы. Они синтезируют основные компоненты волокнистой соединительной ткани: коллагеновые и эластические белки, протео- и гликозаминогликаны, а также ферменты, которые принимают непосредственное участие в катаболических реакциях. Поскольку поверхностные слои дермы содержат клетки воспалительного ряда, папиллярные фибробласты синтезируют биологически активные вещества, приводящие к активации и стимуляции этих клеток. Важным моментом является то, что функциональное назначение поверхностного слоя дермы заключается в трофическом обеспечении эпидермиса, сопротивлении кожи растяжению, восприятию внешних сигналов и формировании начальных этапов реакции на них, реализация которых происходит за счет физиологических процессов папиллярных фибробластов [48, 76]

Второй субпопуляцией являются ретикулярные фибробласты, располагающиеся преимущественно в глубоких слоях дермы. Такие фибробласты характеризуются отличительным функциональным назначением, а именно, они синтезируют фибриллярные компоненты, характерные для плотной волокнистой неоформленной соединительной ткани, эластин, протеогликианы. Данная субпопуляция включает в основном дифференцированные фибробласты и фиброциты, для которых преобладающей функцией является обеспечение гомеостаза кожи [100].

К третьей субпопуляции относят фибробласты, ассоциированные с волосяными фолликулами, функциональная роль которых в настоящее время является предметом обсуждения [36].

В области регенеративной медицины и тканевой инженерии дермальные фибробласты использовались для создания кожных заменителей и других биоматериалов [23]. Кроме того, они могут быть репрограммированы в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, что представляет возможности для создания различных типов клеток для тканевой инженерии и клеточной терапии [76].

### **1.1.3 – Коллаген как основной белок межклеточного матрикса дермы**

Коллаген – это белок, представленный в виде сложной структуры, относится к группе гликопротеинов. Он имеет четвертичную структуру и молекулярную массу около 300 кДа. Спираль коллагена состоит из трех цепей и образует фибриллярную структуру [58]. Этот белок нерастворим в воде, в слабых растворах кислот и щелочей и в солевых растворах, что объясняется особенностями первичной структуры коллагена. Гидрофобные аминокислоты в данном белке составляют около 70% [30, 92].

Коллаген составляет до 90% от сухого веса МКМ, участвует в регуляции различных процессов, протекающих в норме и при возникновении различных патологических состояний [8, 11, 50, 68, 115].

Установлено, что коллаген образуется в процесс коллагенеза, включающий в себя ряд этапов, в которых участвуют различные клетки и молекулы [29, 30, 35, 50, 55, 92, 117]:

1) транскрипция и трансляция гена коллагена: процесс начинается с гена коллагена в ДНК. Когда этот ген активирован, процесс транскрипции производит мРНК, которая содержит последовательность для создания коллагена. Затем, в процессе трансляции, эта последовательность используется клетками для создания прекурсора коллагена, известного как проколлаген;

2) посттрансляционная модификация: проколлаген подвергается ряду химических изменений, известных как посттрансляционная модификация. Эти изменения включают гидроксигирование и гликозилирование некоторых

аминокислот, что помогает стабилизировать коллагеновую молекулу и подготовить её к секреции из клетки;

3) секреция проколлагена: проколлаген затем транспортируется из клетки и секретруется во внеклеточное пространство;

4) преобразование проколлагена в тропоколлаген: после секреции проколлагена происходит еще одно изменение. Конкретные ферменты, известные как проколлаген-пептидазы, отсекают концы молекулы проколлагена, преобразуя ее в тропоколлаген;

5) образование коллагеновых волокон: молекулы тропоколлагена собираются вместе, образуя коллагеновые волокна. Этот процесс поддерживается другими молекулами, такими как фибриллин;

6) кросс-связывание коллагеновых волокон, в котором коллагеновые волокна стабилизируются через процесс. На этом этапе ферменты (лизил-оксидазы), образуют химические связи между отдельными молекулами тропоколлагена внутри волокон. Это обеспечивает дополнительную прочность и устойчивость коллагеновым волокнам;

7) деградация коллагена – жизненный цикл коллагена завершается его деградацией. Это происходит по мере старения коллагеновых волокон, и в результате воздействия различных факторов, таких как ультрафиолетовое излучение и воспаление. Ферменты, известные как коллагеназы, разрушают коллагеновые волокна, и они заменяются новыми;

8) регуляция процесса коллагенеза: процесс коллагенеза тесно регулируется различными молекулами, включая гормоны, факторы роста и цитокины. Например, витамин С необходим для активности ферментов, участвующих в гидроксировании проколлагена, а трансформирующий фактор роста-бета (TGF- $\beta$ ) стимулирует клетки к производству коллагена.

Коллагенез – сложный и многогранный процесс, который важен для поддержания здоровья многих тканей в теле. Он также имеет клиническое значение, поскольку нарушения в коллагенезе могут привести к ряду заболеваний, включая артрит, остеопороз, и некоторые формы рака. Поэтому изучение

механизмов коллагенеза и его регуляции является важным направлением в биомедицинских исследованиях [55, 92, 117].

В настоящее время коллаген представлен несколькими классами, широко распространенными по всему организму. Фибриллярный коллаген – это основной класс, который находится в дерме кожи, костях, связках, сухожилиях, стекловидном теле, кровеносных сосудах, тонком кишечнике. В состав базальной мембраны, роговицы, хрящей и костях входит такой класс, как стереообразующий коллаген. Якорные фибриллы коллагена распространены в дерме кожи и мочевом пузыре [55].

Впервые биологическая визуализация коллагена была осуществлена Freund et al. в 1986 году при анализе сухожилий хвоста крыс; пространственное разрешение в том эксперименте составило порядка 50 мкм [95]. Спустя несколько лет Campagnola с коллегами реализовали практический подход к визуализации коллагена биоткани с более высоким пространственным разрешением (порядка 1 мкм) и быстрым сбором данных [117].

В коллагене аминокислоты по длине полипептидной цепи расположены группами (триадами), которые схожи друг с другом по строению, состоящими из трех аминокислот. Каждая третья аминокислота в первичной структуре коллагена – это глицин:  $(\text{гли-X-Y})_n$ , где X – любая аминокислота или оксипролин, Y – любая аминокислота или оксипролин или оксизин.

Полипептидная цепь представлена многократно повторяющимися аминокислотными группами [67]. Во вторичной структуре шаг одного витка спирали составляют только 3 аминокислоты, а не 3,6 аминокислоты на 1 виток, как это наблюдается у других белков. Это объясняется тем, что в молекуле коллагена примерно 1/3 аминокислотных остатков приходится на глицин. Благодаря этой особенности и определяются следующие структуры коллагена. Молекула коллагена, построенная из трех цепей, представляет собой тройную спираль. Каждая цепь состоит из 1000 остатков аминокислот. Все цепи являются параллельными и имеют следующую укладку в пространстве: радикалы гидрофобных аминокислот расположены снаружи. Также, группой ученых было

установлено, что существуют несколько типов коллагена, которые различаются генетически и структурно [50].

В дерме коллаген выполняет несколько важных функций [86]:

- а) механическая – рост соединительной ткани по коллагеновому каркасу;
- б) питательная – обогащение тканей аминокислотами, за счет автолизиса;
- в) защитная – активация фагоцитоза, стимуляция агрегации тромбоцитов, биологический дренаж;
- г) каталитическая – ускорение процесса синтеза белков;
- д) репаративная – стимуляция роста собственной соединительной ткани.

В частности, коллаген выполняет ряд функций по регуляции межклеточных коммуникаций, адгезии, миграции, пролиферации, дифференцировки различных клеток [11, 50, 115].

В настоящее время обнаружено более 20 генетических разновидностей коллагена [30, 55, 67]. В коже человека более тонкие волокна коллагена III типа оплетают волокна I типа и ориентируют их в пространстве. Коллаген III типа преобладает в фетальной и постнатальной коже, его содержание увеличивается на первых стадиях репаративных процессов после повреждения кожи [96]. Коллаген I типа синтезируется на более поздних стадиях заживления ран и становится доминирующим в рубцовой ткани. Коллаген V типа объединен в фибриллах с коллагеном I и III типов и участвует в регуляции диаметра фибрилл, а также в образовании базальных мембран и стенки кровеносных сосудов. Коллаген VI типа распространен на всем протяжении дермы, связан с фибриллами и, предположительно, участвует в организации межклеточного вещества дермы. Коллаген IV типа встречается в базальной мембране, сосудах и придатках кожи [86]. Коллаген VII типа формирует якорные фибриллы в дермо-эпидермальной пластине и связан с фибриллами сосочкового слоя дермы. Коллагены I, II, III и V типов являются фибриллярными, поскольку способны формировать филаменты и фибриллы. Остальные коллагены этой способностью не обладают и являются аморфными [55]. Аминокислотный состав цепей специфичен, поскольку в них преобладают такие аминокислоты, как глицин, пролин, гидроксипролин,

гидроксизин и лизин [55, 92]. Коллагеновые волокна подвергаются постоянному обновлению. В разрушении коллагеновых волокон в условиях физиологической нормы участвуют фибробласты, которые имеют для этого необходимый набор ферментов. При этом происходит как внеклеточное расщепление этих волокон, так и внутриклеточный коллагенолиз [67].

#### **1.1.4 – Виды и действие коллагеназ**

Как известно, природный коллаген не разрушается обычными пептидгидролазами. Однако ранее был обнаружен специфический фермент – коллагеназа, который является основным и практически единственным ферментом, способным гидролизовать коллаген в нативном виде. Этот фермент может селективно расщеплять пептидные связи на определённых участках коллагена. На данный момент выделяют 2 вида коллагеназ [44].

К первому виду относят тканевую коллагеназу, присутствующую во многих тканях и органах. В нормальных условиях она продуцируется клетками соединительной ткани – фибробластами и макрофагами. Тканевая коллагеназа является металлозависимым биокатализатором, содержащим ионы цинка в своем активном центре. Главная задача этой коллагеназы состоит в ремоделировании межклеточного матрикса. Гидролазная активность фермента зависит от преобладания активаторов и ингибиторов в МКМ. К основным активаторам, которые играют важную роль, относят плазмин и катепсин В. Тканевая коллагеназа характеризуется высокой специфичностью. Она гидролизует связи тройной спирали коллагена в определённом месте, расположенном на 1/4 расстояния от С-конца, между остатками глицина и лейцина (или изолейцина) [29, 81].

Впервые тканевая коллагеназа, вместе со своей коллагенолитической активностью, была обнаружена в хвостовом плавнике головастика в период метаморфоза, когда в течение нескольких дней происходит реорганизация коллагена в ткани в огромном количестве. Определение гидролазной активности в хвостовом плавнике, который подвергался метаморфозу, осуществляли путём культивирования на среде, состав которой был представлен исключительно

коллагеновыми волокнами. Через некоторое время на этой плотной среде образовались совершенно прозрачные зоны. Это доказывало высокую активность коллагеназы. Также представленная активность может проявляться в тканях у млекопитающих, в которых происходит быстрое преобразование коллагена, например, после родов [81].

Ко второму виду относится бактериальная коллагеназа, которая продуцируется некоторыми видами микроорганизмов. Ярким примером является штамм *Clostridium histolyticum* – возбудитель газовой гангрены. Клетки штамма выделяют коллагеназы, которые разрушают пептидную цепь коллагена более чем в 200 местах. В данном случае фермент гидролизует пептидную связь -(Х-Гли-Про-У)- между звеньями Х и Гли. Результатом такого процесса является лизис соединительнотканых барьеров в организме, что позволяет микроорганизму проникать глубже и способствовать возникновению и развитию газовой гангрены. Данный вид бактерий не подвержен действию синтезируемого фермента поскольку не содержит в своем составе коллагена [44].

На рынке в РФ бактериальную коллагеназу выпускают в лиофилизированном виде, который представлен в виде мелкокристаллического порошка бурого цвета.

Основное применение коллаген-разрушающих ферментов – использование в качестве диссоциирующего агента при лабораторных исследованиях. Для обработки разных тканей используют разные типы бактериальных коллагеназ [29]. Основываясь на этом факте, возникает возможность определения количества коллагена в коллагенсодержащем образце путём его гидролиза специфическим ферментом.

Основными ингибиторами являются хелатирующие агенты (цистеин, о-фенантролин) и  $\alpha$ -маркоглобулин (крупный гликопротеин плазмы). Важным условием при работе с препаратом является обязательное соблюдение асептических условий [45, 81].

В физиологических условиях происходит постоянное ремоделирование дермы, в т. ч. межклеточного матрикса. В этом процессе важную роль играют клетки фиброциты и тканевые коллагеназы. Однако в настоящее время

недостаточно изучено их участие в механизмах регенерации при различных патологических процессах, в частности, холодовых повреждениях.

## **1.2 – Холодовые повреждения кожи**

### **1.2.1 – Особенности отморожения кожи**

Холодовое повреждение (отморожение) – это патологическое состояние тканей, которое появляется на ограниченном участке тела под воздействием низких температур внешней среды, а также является одним из важнейших медико-социальных проблем, как в военное, так и в мирное время, при стихийных бедствиях, авариях, катастрофах [14, 59, 101, 112]. Тяжесть осложнений и частота случаев инвалидности трудоспособного контингента общества придают данной проблеме не только медико-социальную, но и экономическую направленность, что особое значение приобретает в условиях освоения Арктики [53, 66, 101, 109, 112].

Изучение процессов восстановления тканей после термических воздействий, как ожогов, так и обморожений, является одним из актуальных направлений регенеративной медицины [13, 43, 61, 72].

Общепринято разделять отморожения на 4 степени в зависимости от глубины поражения. При поверхностных отморожениях признаков некроза не наблюдается (I степень), или определяется гибель сосочково-эпителиального слоев кожи (II степень). Граница некроза может проходить в глубоких слоях дермы и на уровне гиподермы (подкожной жировой клетчатки) (III степень), если отморожения носят более глубокий характер. При IV степени происходит некроз, который захватывает все ткани пораженного участка, включая костную [46, 51].

Морфологические изменения в тканях происходят непосредственно в период согревания и зависят от глубины и длительности охлаждения. В самых легких случаях, при отморожении I степени, наблюдается: синюшность и отек пораженного участка кожи. Гистологическое исследование выявляет разрыхление соединительнотканых структур кожи серозной жидкостью, полнокровие сосудов, и лизис ядер кератиноцитов поверхностных слоев эпидермиса. В дальнейшем поврежденные клетки высыхают и слущиваются. Морфологические признаки

отморожения исчезают в течение недели. Отморожение II степени характеризуется более выраженной экссудацией с образованием во внутриэпидермальных пузырьках, которые содержат прозрачную жидкость. Состав дна пузырька представлен сосочковым слоем дермы с частично погибшим базальным слоем эпидермиса. Результатом заживления является полное восстановление кожи. При отморожении III степени отмечается некроз эпидермиса, дермы и подкожной клетчатки. Участки поражения после отторжения тканей, подвергнутых некрозу, заживают с образованием рубца [13].

Также считается, что локальное холодное воздействие стимулирует гидролазную активность ферментов и вызывает снижение концентраций специфических компонентов соединительной ткани кожи, в том числе и коллагена [10, 13].

### **1.2.2 – Морфологические изменения при холодных повреждениях**

Известно, что на 7 сутки после локального холодного повреждения в зоне поражения появляются небольшие очаговые скопления фибробластов [15, 27, 82, 88, 94]. Но данные, подтверждающие, что эти фибробласты функционально активны, отсутствуют, равно, как и данные об их преимущественной локализации.

Ранее было предположено, что во время глубоких холодных повреждений происходит клеточно-опосредованная воспалительная реакция, приводящая к прогрессирующей ишемии и некрозу тканей, аналогично реакции, наблюдаемой после ишемическо-реперфузионного повреждения. Такое повреждение описывают как парадоксальное обострение клеточной дисфункции и гибели после восстановления кровотока в ранее ишемизированных тканях [56].

Известно, что при глубоком холодном повреждении видимые гистологические изменения во всех слоях дермы появляются через 20 мин. В протоплазме клеток эпидермиса появляются вакуоли, в других случаях изменения к этому сроку состоят в потере протоплазмы способности к окрашиванию [43, 56]. Также в это время развивается воспаление, сопровождающееся привлечением нейтрофильных лейкоцитов. Спустя 3 ч в зоне, расположенной под дермой,

отмечается выраженный сплошной слой фибрина. Также спустя 3 ч наблюдается отек всех слоев кожи с лейкоцитарной инфильтрацией. В период от 2 до 4 дней после холодовой травмы усиливаются явления регенерации и воспалительного отграничения некроза, сопровождающийся клеточным инфильтратом, состоящим из фибробластов и иммунных клеток, а именно, Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов (плазмоцитов). На 5-7-й день происходят процессы демаркации. Отслоившийся и омертвевший эпидермис, хорошо выраженный к 5-му дню в виде пузырей, к 7-му дню постепенно претерпевает дальнейшие изменения. Пузыри лопаются или сморщиваются, отек уменьшается, начинаются высыхание и мумификация периферических участков кожи и появление фибробластов и лимфоцитов. При поражении росткового слоя кожи происходит замещение омертвевшего участка рубцовой тканью, и регенерация производных элементов кожи не наступает. Клеточный состав в зоне повреждения представлен преимущественно лимфоцитами, гистиоцитами, плазматическими клетками и особенно фибробластами. К 11 суткам в зоне периферии очага поражения наблюдаются молодая соединительная ткань с признаками отека, богатая сосудами и клетками (фибробластами и фиброцитами). Больше всего претерпевают изменения кожные дериваты: сальные, потовые железы, эпителий волосяных влагалищ. К 17 суткам происходит эпителизация раневой поверхности с незначительной лейкоцитарной инфильтрацией, а также формирование грануляционной ткани, представленной в виде тонкого слоя коллагеновых и эластических волокон, между которыми обнаруживаются очаговые скопления фибробластов [14, 17].

В своем недавнем исследовании Валентюкевич А.Л. с соавторами в 2021 году установили, что к 27 суткам регенеративные процессы заканчиваются полной эпителизацией сформированного рубца, в котором уже полностью отсутствовала клеточная инфильтрация за исключением элементов фибробластического ряда [14].

Несмотря на значительные успехи в изучении патологии локальных холодовых воздействий, данные об интенсивности синтеза и формирования

дермального коллагена в регенеративном процессе, а также о преимущественной локализации клеточных структур, отсутствуют.

### **1.2.3 – Сиаловые кислоты – маркер деградации межучного вещества дермы**

Известно, что одним из компонентов межучного вещества соединительной ткани, окружающее волокнистые структуры, являются сиаловые кислоты (СК) – ациальные производные нейраминовой кислоты. В процессе деградации межучного вещества уровень сиаловых кислот в сыворотке крови повышается, что позволяет оценить интенсивность деградации межучного вещества [114].

Сиаловые кислоты – это семейство моносахаридов, которые часто являются терминальными компонентами гликоконъюгатов, включая гликопротеины и гликолипиды. Они имеют важную функцию в многочисленных биологических и патологических процессах и являются объектом исследования в биохимии и молекулярной биологии [64].

Сиаловые кислоты в сыворотке крови играют несколько ключевых ролей:

1) иммунная регуляция: сиаловые кислоты могут модулировать иммунные ответы путем взаимодействия с рецепторами, такими как сиглеки (сиаловая кислота связывающие лектины иммуноглобулинового типа). Это может привести к модуляции активации и функции иммунных клеток, включая лимфоциты, нейтрофилы и макрофаги;

2) регуляция апоптоза: СК могут влиять на процесс апоптоза. Например, некоторые сиаловые кислоты могут индуцировать апоптоз у определенных типов раковых клеток;

3) роль в образовании и функции эндотелия: сиаловые кислоты играют важную роль в функционировании эндотелия, что может влиять на процессы, такие как вазодилатация, вазоконстрикция, воспаление и тромбообразование;

4) взаимодействие с патогенами: многие вирусы и бактерии используют сиаловые кислоты в качестве рецепторов для входа в клетки. Например, вирус

гриппа связывается с сиаловыми кислотами на поверхности клеток дыхательного тракта [64, 114].

Измерение уровней сиаловых кислот в сыворотке крови может быть полезным для клинической диагностики и мониторинга некоторых состояний, включая воспаление, инфекции, рак и аутоиммунные заболевания [4, 32]. Однако, тот факт, что сиаловые кислоты могут быть связаны с множеством различных гликоконъюгатов и могут иметь различные структуры, затрудняет их прямое измерение. По этой причине исследования продолжают для разработки более точных и специфичных методов для измерения и интерпретации уровней сиаловых кислот в сыворотке крови.

### **1.3 – Механизм регенерации дермы при нарушении толерантности к глюкозе**

#### **1.3.1 – Нарушение толерантности к глюкозе**

Глюкоза является одним из самых распространенных углеводов, который содержится в продуктах либо в первозданном виде, либо в форме ди- и полимеров (например, сахароза, крахмал). Такие полимеры разрушаются под действием специфических ферментов пищеварительного тракта, высвобождая глюкозу. Ей, как универсальным энергетическим ресурсом, пользуются абсолютно все органы и ткани, одним для этого нужен инсулин (клеткам печени, миоцитам и жировым клеткам), другие (клетки мозга и почек) пользуются сахаром крови свободно, в любой ситуации имея к нему доступ.

После потребления глюкозосодержащих соединений, когда глюкоза массово поступает в кровоток, поджелудочная железа выделяет инсулин, который направляет сахар в инсулинозависимые ткани, где создается запас глюкозы. В случае недостатка инсулина или нарушенной толерантности к нему тканей этот процесс нарушается, и глюкоза циркулирует в крови, повреждая сосуды, эритроциты и нервные клетки. По интенсивности нарушения углеводного обмена могут варьировать: от нарушения толерантности к глюкозе (НТГ) до сахарного диабета 1 или 2 типа [31].

Нарушение толерантности к глюкозе (НТГ) – неспособность регуляторных систем организм приводить уровень глюкозы крови в норму за определенное время за счет усвоения ее органами и тканями. Данное состояние еще не является клиническим диагнозом, но может рассматриваться как предиабет, очень опасное состояние, легко трансформирующееся в сахарный диабет. При НТГ организм справляется с сахаром крови натощак, а вот с нагрузкой пищей – нет, то есть после поступления сахаров из кишечника в плазму крови регуляторные механизмы оказываются недостаточными [9, 12, 41, 78, 97, 102].

В настоящее время общемировая распространенность НТГ среди лиц в возрасте от 20 до 79 лет составила 6,7% (4,5-12,1%), по прогнозам, к 2040 г. данная цифра увеличится до 7,8% (5,2-14,9%) [6]. Проведенное в Российской Федерации исследование NATION с использованием анкетирования и скринингового определения HbA1c выявило распространенность предиабета в 19,2% случаев (20 млн) в возрастной группе 20–70 лет у активного населения. Как сахарный диабет 2 типа, так и предиабет ассоциировались с увеличением массы тела и возрастом обследуемых лиц. Примечательно, что гендерные различия в распространенности нарушений углеводного обмена отсутствуют [7, 19, 99].

В последние десятилетия ученые и клиницисты начали рассматривать различные метаболические нарушения и/или заболевания, ассоциированные с ожирением, в комплексе и высказывать предположения об общности этих состояний [69].

### **1.3.2 – Особенности регенерации дермы при нарушении толерантности к глюкозе**

Течение регенерации различного рода повреждений при нарушениях толерантности к глюкозе сопровождается энергодефицитом клеток и тканей, что замедляет восстановительные процессы. Данный факт обуславливает необходимость применения средств и методов из арсенала восстановительной медицины на основе преимущественного использования немедикаментозных лечебных факторов, которые обладают выраженным саногенетическим

потенциалом и способны оказывать корригирующее влияние на уровень инсулин-рецепторного взаимодействия и устранение энергодифицита тканей [26].

При широкой географии нарушений толерантности к глюкозе механизм регенерации дермы после локального холодового повреждения в настоящее время остается малоизученным.

Необходимым шагом для выявления влияния нарушений углеводного обмена на процесс регенерации после локального холодового воздействия является определение механизма регуляции регенерации дермы и медиаторов воспаления.

### **1.3.3 – Регуляция процесса регенерации**

Повреждения дермы в первой фазе характеризуются воспалением в эпицентре воздействия, а также динамичным комплексом изменений в организме в целом.

Воспаление – это биологический ответ организма на повреждение ткани или вторжение патогенов. Согласно работе Абрамовича С.Г. (2021) [1], воспаление включает в себя несколько характерных компонентов механизма развития:

- 1) альтерацию;
- 2) сосудистые реакции и изменения крово- и лимфообращения;
- 3) экссудацию жидкой фракции и выход форменных элементов крови;
- 4) пролиферацию клеточных элементов тканей.

В ходе воспалительного процесса высвобождаются различные медиаторы и модуляторы воспаления. Медиаторы воспаления – это группа биохимических веществ, которые играют ключевую роль в инициировании и регулировании воспалительного процесса. Они включают в себя широкий спектр молекул, таких как цитокины, химокины, биоактивные амины, а также продукты арахидоновой кислоты [75].

Цитокины – это молекулы, которые вырабатываются и секретируются в ответ на воспаление. Они включают интерлейкины (например, IL-1, IL-6), факторы некроза опухолей (TNF- $\alpha$ ), и интерфероны. Эти вещества могут стимулировать или

подавлять воспаление, и их профиль выработки и высвобождения определяет характер воспалительного ответа [104].

Химокины – это малые белки, которые играют важную роль в химотаксисе, или привлечении, иммунных клеток (например, лейкоцитов) к месту воспаления.

Биоактивные амины (гистамин и серотонин – это биоактивные амины, которые играют важную роль в воспалительном процессе. Они вызывают расширение кровеносных сосудов и увеличивают их проницаемость, что способствует проникновению иммунных клеток и воспалительных медиаторов на место воспаления.

Продукты арахидоновой кислоты, такие как простагландины и лейкотриены, синтезируются из арахидоновой кислоты при помощи ферментов циклооксигеназы и липоксигеназы соответственно. Они играют ключевую роль в регуляции воспалительного ответа, включая болевую чувствительность, вазодилатацию, и химотаксис [1, 62].

Медиаторы воспаления взаимодействуют друг с другом в сложной сети взаимодействий, которые регулируют воспалительный ответ. Понимание этих процессов имеет ключевое значение для разработки новых подходов к лечению воспалительных заболеваний [113].

Следующей фазой регенерации дермы является пролиферативная фаза, в которой важную роль играет межклеточный матрикс при ангиогенезе (создание нового капиллярного слоя). Гипоксия, обусловленная как повышенным потреблением тканями кислорода, так и его уменьшенным поступлением, есть ведущий стимул ангиогенеза. Регуляция ангиогенеза происходит при участии как активирующих, так и ингибирующих ангиогенных факторов. Васкулоэндотелиальный фактор роста (VEGF) является высокоспецифичным для эндотелиальных клеток модулятором, который представляет собой гепаринсвязывающий белок с молекулярной массой 34-42 кДа. Кроме VEGF ангиогенезу способствуют фактор роста фибробластов, тромбоцитарный фактор роста, белки семейства TGF- $\beta$ , мембранный белок анкирин и другие факторы.

Непосредственно после травмы уровни этих проангиогенных факторов увеличиваются, достигая наибольших значений [52, 79, 118].

Заключительной фазой регенеративного процесса является – эпителизация. Под этим термином понимают процесс миграции кератиноцитов. При нормальном течении раневого процесса уменьшается количество сосудистых коллатералей и снижается количество фибробластов. Коллаген подвергается постоянному обновлению. В процессе эпителизации устанавливается равновесие между процессом образования и деградации коллагеновых волокон. Сразу после формирования рубца происходят синтез и формирование эластических волокон, приводящие к перестройке рубца [39].

Одну из ключевых ролей в регенеративном процессе выполняет инсулиноподобный фактор роста (IGF-1), оказывая митогенный эффект. Он действует через аутокринные или паракринные механизмы, связываясь со специфическими клеточными рецепторами. Установлено, что под его действием в зоне повреждения на ранних стадиях регенерации в клетках снижается генная экспрессия маркеров воспаления, а также повышается пролиферативная активность остеогенных и хондрогенных клеток-предшественников [20].

### **1.3.4 – Инсулиноподобный фактор роста**

Факторы роста – чрезвычайно неоднородная группа биологически активных веществ, представляющих собой полипептиды, способные стимулировать или ингибировать пролиферацию клеток. Взаимодействия множества ростовых факторов с множеством клеток сложны [16, 107, 118].

Инсулиноподобный фактор роста (IGF-1) – гормон, сходный по молекулярной структуре с инсулином, который играет важную роль в росте и развитии органов и систем всего организма. IGF-1 состоит из 70 аминокислот в одной цепи с тремя внутримолекулярными дисульфидными мостиками. IGF-1 имеет молекулярную массу 7,649 Да [38, 107].

IGF-1 играет важную роль в регуляции клеточного роста, пролиферации и дифференциации, и он вовлечен во многие другие биологические процессы. IGF-1

производится во многих типах тканей, включая печень, почки и мозг. В печени его синтез регулируется гормоном роста, который вырабатывается в гипофизе. Оттуда IGF-1 может быть высвобожден в кровоток и действовать как эндокринный гормон, воздействуя на другие клетки в разных частях организма [118].

В своем действии IGF-1 связывается с конкретным рецептором на поверхности клеток, известным как рецептор IGF-1 (IGF-1R). Этот рецептор – тирозинкиназа, которая, когда активируется IGF-1, запускает каскад внутриклеточных сигналов, которые могут включать активацию множества сигнальных путей, таких как путь активации фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и путь сигналов и активаторов транскрипции (STAT3) [93].

IGF-1 имеет ключевую роль в регуляции роста и развития организма. У детей низкий уровень IGF-1 может привести к задержке роста, в то время как избыточное производство IGF-1 может вызвать ускоренный рост и акромегалию [106].

В последние десятилетия становится все более очевидной роль IGF-1 в многих заболеваниях. Например, уровни IGF-1 могут быть повышены при некоторых формах рака, и могут способствовать пролиферации и выживанию раковых клеток. С другой стороны, недостаток IGF-1 может быть связан с сердечно-сосудистыми заболеваниями и нейродегенеративными заболеваниями [111].

Однако, важно отметить, что роль IGF-1 в этих состояниях является предметом активного исследования, и многие вопросы остаются открытыми [20, 49, 111].

Метаболические эффекты IGF-1 имеют далеко идущие последствия и могут координировать белковый, углеводный и жировой обмены в различных типах клеток. Регуляция метаболических эффектов IGF-1 на ткани-мишени также координируется с другими гормонами, такими как гормон роста и инсулин [105].

Таким образом, учитывая функциональную активность инсулиноподобного фактора, представляет, как теоретический, так и практический интерес изучение участия IGF-1 на фоне нарушения толерантности к глюкозе в ходе регенераторного процесса. Как известно, в ходе регенерации, связанной с митотической

активностью и дифференцировкой клеток, требуется пластический и энергетический материал, в качестве одного из которых выступает глюкоза. Можно предполагать, что на фоне нарушения глюкозотолерантности, связанного с действием инсулина, в ходе регенераторного процесса развивается компенсаторный механизм с возможным участием IGF-1.

## ГЛАВА 2 – ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 – Объект исследования

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям этического комитета ФГБОУ ВО СГМУ (г. Архангельск) Минздрава России (протокол № 05/06-18 от 28.06.2018).

Диссертационное исследование было проведено на 163 самцах и самках беспородных крыс, в том числе 100 крыс было без нарушений углеводного обмена и с массой тела 180-200 грамм, и 43 особи с выявленным нарушением толерантности к глюкозе и с массой тела свыше 450 грамм; у 20 крыс глюкозотолерантные нарушения не проявились, и они не участвовали в последующем эксперименте (рисунк 1). Все животные, участвующие в моделировании острого локального отморожения, были в возрасте 4 месяцев.



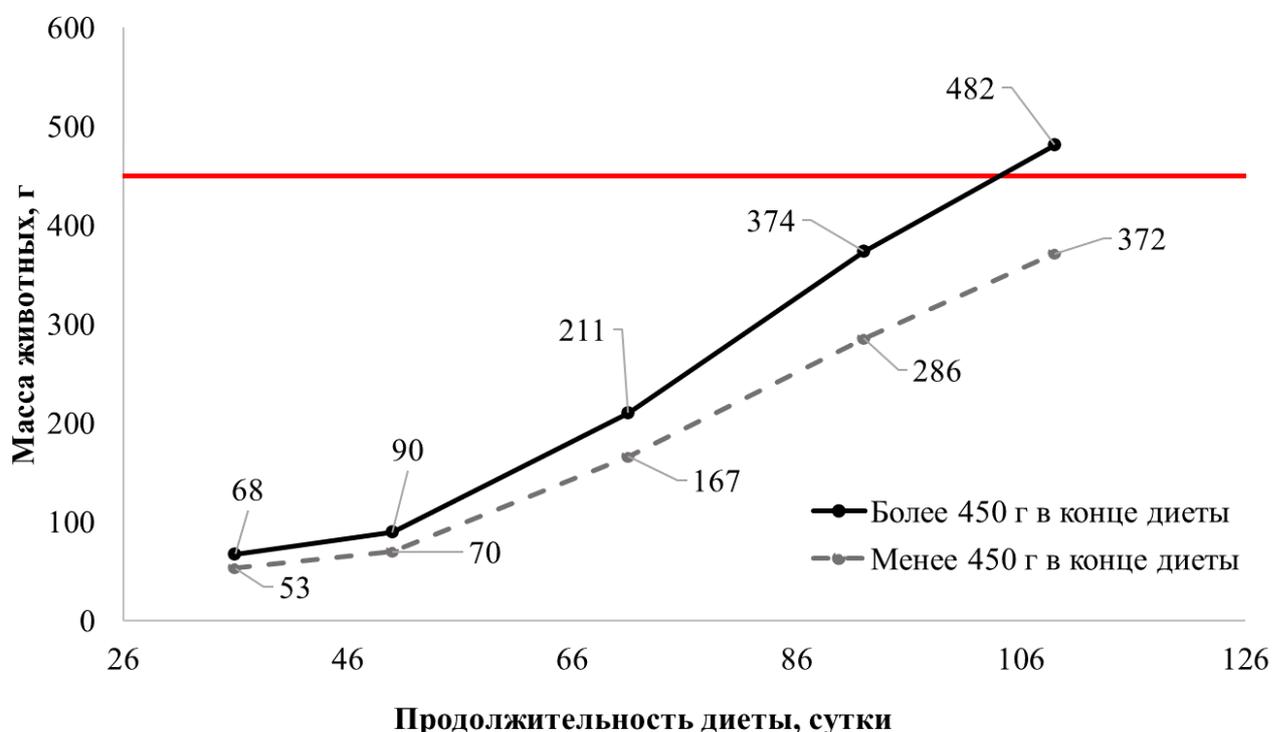
Рисунок 1 – Дизайн диссертационного исследования

## 2.2 – Методы исследования

### 2.2.1 – Моделирование нарушения толерантности к глюкозе

Индукцию нарушения толерантности к глюкозе у крыс проводили с помощью диеты, предложенной группой исследователей [116]. Начиная с возраста 26 дней, крысят в количестве 63 особи вместо воды поили 30%-ным раствором сахарозы. В рацион также добавляли насыщенные жиры (масло 82,5% – жирности) из расчета 4 г масла/крысу/день. Через месяц после начала диеты повышали суточное количество масла до 5 г, еще через месяц – до 6 г. Прибавку в весе оценивали на 36, 50, 71, 92 сутки эксперимента. На 109 сутки проводили финальное взвешивание с целью выявления соответствия критерию по весу (450 и более грамм).

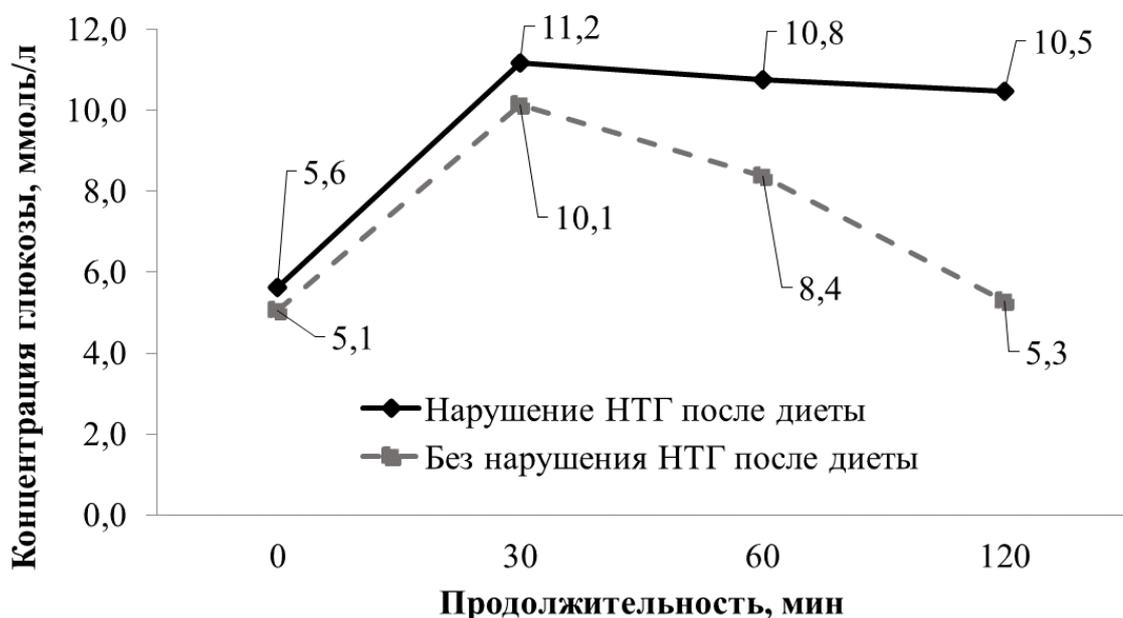
Большая часть крыс, а именно, 51 особь (или 81%) набрала вес 450 или более грамм до начала проведения теста нарушения толерантности к глюкозе. У 12 крыс (или 19%) вес не соответствовал необходимому критерию, и они были исключены из эксперимента (рисунк 2).



**Рисунок 2 – Динамика прибавки веса крыс при применении высокоуглеводной диеты с насыщенными жирами**

За неделю до окончания диеты устанавливали развитие нарушения толерантности к глюкозе с помощью глюкозотолерантного теста (ГТТ).

Накануне вечером крыс не кормили, давали только воду. Утром, непосредственно перед проведением теста, определяли концентрацию глюкозы в крови из хвостовой вены крыс с помощью тест-полосок One Touch Ultra (Johnson & Johnson, США) трижды при условии сходимости результатов. После чего внутривенно вводили раствор глюкозы из расчета 2 г/кг. Концентрацию глюкозы в крови из хвостовой вены крыс определяли через 30 мин, 60 мин, 90 мин и 120 мин трижды при условии, что значения были одинаковыми. По окончании проведения теста нарушение толерантности к глюкозе фиксировали у 43 крыс. У оставшихся 8 особей концентрация глюкозы на 120 минуте не превышала 7 ммоль/л, вследствие чего эти 8 животных были выведены из эксперимента (рисунок 3).



**Рисунок 3 – Динамика концентрации глюкозы в крови в ходе глюкозотолерантного теста**

*Примечание:* НТГ – нарушение толерантности к глюкозе

Таким образом, на основании двух критериев: повышенной массы тела животных (более 450 г) и нарушения толерантности к глюкозе была сформирована группа крыс в количестве 43 особей.

### **2.2.2 – Моделирование острого отморожения**

Воспроизведение экспериментальной модели острого отморожения проводили на беспородных самцах и самках крыс, содержащихся в одинаковых условиях, на стандартном пищевом режиме. После наступления наркотического сна воспроизводили контактное отморожение с помощью металлической гирьки диаметром 2,5 см, которую предварительно охлаждали в жидком азоте, а потом прикладывали к депилированной коже спины крысы на 3 мин. согласно методу [25]. В результате такого воздействия у экспериментальных животных развивалось контактное отморожение 3-й степени. В последующем обработка раневой поверхности включала ежедневную обработку 0,01% водным раствором хлоргексидина. Вывод из эксперимента проводили путем передозировки средства для наркоза на 3, 7, 14 и 21 сутки.

Животные, у которых моделировали только острое отморожение, сформировали первую группу (n = 80). Животные с повышенной массой тела и нарушенной толерантностью к глюкозе сформировали вторую группу (n = 43), которым аналогичным образом воспроизводили модель острого локального отморожения. В качестве контрольной группы (n = 20) были использованы интактные беспородные крысы, содержащиеся на стандартном пищевом режиме.

### **2.2.3 – Техника взятия биоматериала панч-биопсией**

Панч-биопсия – это метод взятия патологического материала, преимущественно, кожи с помощью специального трубчатого скальпеля – панча. Этот метод позволяет получить цилиндрический образец ткани заданного диаметра (в настоящей работе использовали панч-скальпель  $\varnothing = 5$  мм).

Панч направляли перпендикулярно поверхности кожи при взятии материала, растягивая кожу по сторонам. При этом на панч необходимо было слегка надавить сверху вниз и вращать его по и против часовой стрелки. После этого биоптат извлекали из полости скальпеля с помощью иглы.

#### **2.2.4 – Определение количественного содержания коллагена дермы**

Забор кожи на анализ количественного содержания коллагена производился посредством панч-скальпеля. Полученный материал переносили в заранее взвешенную градуированную пробирку Eppendorf вместимостью 1,5 мл и замораживали при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Затем кусочек ткани лиофильно высушили в лиофильной сушилке при температуре  $-46^{\circ}\text{C}$  и высоком вакууме, измельчили путём нарезания микротомным лезвием на фрагменты минимальной толщины, поместили полученные фрагменты в новую градуированную пробирку Eppendorf с известной массой вместимостью 1,5 мл. Залили фрагменты 15% водным раствором гидроксида натрия объемом 1 мл и оставили на 24 часа при температуре  $18-20^{\circ}\text{C}$ , после чего удалили из пробирки раствор щелочи и растворенных веществ путём аспирации дозатором и налили к образцу дистиллированную воду при температуре  $18-20^{\circ}\text{C}$  в объёме 1 мл. Гомогенизировали материал путём ресуспензирования при помощи дозатора, выполняя многократную последовательную аспирацию содержимого пробирки дозатором и обратного впрыскивания в пробирку из дозатора материала в течение 2-3 минут, центрифугировали гомогенизированный материал в течение 5 минут при 13400 оборотах в минуту. После центрифугирования аспирировали дозатором надосадочную жидкость из пробирки таким образом, чтобы осадок на дне пробирки находился в объёме жидкости, не превышающем 0,5 мл, добавляли дистиллированную воду до объёма 1 мл и повторно гомогенизировали материал способом, описанным выше. Процедуру, включающую гомогенизацию путём ресуспензирования дозатором, центрифугирование, аспирацию надосадочной жидкости и добавление воды до объёма 1 мл повторяли до достижения нейтрального уровня pH надосадочной жидкости. Контроль кислотности проводили с помощью универсальной индикаторной бумаги (ЭКРОС, Россия). После достижения целевого уровня pH надосадочную жидкость аспирировали дозатором таким образом, чтобы количество осадка в пробирке не превышало 0,3 мл. Полученный материал замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$ , лиофильно высушивали в лиофильной сушилке и взвешивали на аналитических весах, определяя массу

материала  $m_1$ . Затем полученный безводный осадок разводили в 900 мкл 0,1 М ацетатным буферным раствором и добавляли 100 мкл раствора коллагеназы (очищенный продукт жизнедеятельности *Clostridium histolyticum*, I тип, лиофилизированный). Затем пробирку с содержимым устанавливали в шейкер-инкубатор при температуре 37°C и перемешивали в течение 2 часов. После этого пробирку снимали, центрифугировали при 13400 оборотов в минуту в течение 5 минут, аспирировали дозатором надосадочную жидкость, добавляли дистиллированную воду до объема 1 мл, гомогенизировали полученный материал путём многократной аспирации содержимого пробирки дозатором и обратного впрыскивания в пробирку. Процедуру, включающую гомогенизацию путём ресуспензирования дозатором, центрифугирование, аспирацию надосадочной жидкости и добавление воды до объема 1 мл повторяли 3 раза. После этого материал замораживали при -80°C, лиофильно высушивали и взвешивали, определяя массу материала  $m_2$ . По разнице масс  $m_1$  и  $m_2$  определяли массу коллагена, содержавшегося в исследуемой ткани. Процентное содержание коллагена в ткани определяли отношением определенной массы коллагена к массе образца ткани [71]. Блок-схема процесса представлена на *рисунке 4*.



**Рисунок 4 – Блок-схема количественного определения коллагена в ткани**

### **2.2.5 – Выделение коллагеновых волокон дермы**

Нами разработан метод выделения коллагеновых волокон [70]. Фиксированный в гистологическом забуференном 10%-ном нейтральном формалине кусочек кожи, полученный путем панч-биопсии, без предварительной заморозки нарезают микротомным ножом на мелкие фрагменты толщиной не более

3 мм, помещали полученные фрагменты в центрифужную градуированную пробирку. Заливали фрагменты 1 мл 50% водного раствора гидроксида калия на 15 часов, после чего удаляли из пробирки раствор щелочи путем аспирации пипеткой Пастера и наливали дистиллированную воду при температуре 18-20°C в объеме 5 мл. Гомогенизировали материал при помощи струи воды из пипетки Пастера объемом 2 мл в течение 2-3 минут, доводили объем воды в пробирке до 10 мл и центрифугировали в течение 5 минут при 1500 оборотах в минуту. После центрифугирования аспирировали воду из пробирки таким образом, чтобы осадок на дне пробирки находился в объеме жидкости, не превышающем 0,5 мл, измеряли рН при помощи универсальной индикаторной бумаги, добавляли дистиллированную воду до объема 5 мл и повторно гомогенизировали материал способом, описанным выше. Цикл гомогенизации и центрифугирования повторяли до достижения нейтрального уровня рН надосадочной жидкости, но не менее пяти раз. После достижения целевого уровня рН суспендировали полученный материал путем многократного пассажа содержимого пробирки пипеткой Пастера. Полученную суспензию переносили в градуированную пробирку Eppendorf вместимостью 1,5 мл, замораживали при -80°C и лиофильно высушивали. После полного высушивания лиофилизат переносили на двухсторонний скотч для дальнейшего исследования в электронно-сканирующем микроскопе.

### **2.2.6 – Электронно-сканирующая микроскопия**

Изображения образцов получали с использованием SEM Sigma VP Zeiss (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Для увеличения контрастности и качества изображения образцов на расщепленную поверхность было нанесено золото-палладиевое покрытие толщиной 5 нм в соотношении 80:20. Для этой обработки использовали распылитель Q150T ES (Quorum Technologies Ltd, Великобритания). У образцов измеряли толщину коллагеновых волокон с помощью программного обеспечения SmartTiff (Carl Zeiss, Германия). Толщину коллагеновых волокон определяли с помощью программного обеспечения SmartTiff (Carl Zeiss SMT Ltd, Германия).

## **2.2.7 – Гистологическое исследование кожи**

### **2.2.7.1 – Фиксация материала**

Первым этапом в обработке кусочков, вырезанных для микроскопического исследования, являлась фиксация, имеющая цель закрепления тканевых и клеточных структур в том состоянии, в каком они находились в момент погружения кусочков в фиксирующую жидкость, и предохранение их от разрушения. Гистологическое исследование кожи проводили после фиксации препарата в 10%-ном растворе формалина [35].

### **2.2.7.2 – Обезвоживание**

Следующим после фиксации моментом в обработке материала являлось обезвоживание в спиртах восходящей концентрации.

Проводка кусочков через спирты (4 порции, начиная с 60% и до абсолютного) совершалась в широкогорлых банках вместимостью 200 мл с притертыми пробками. Пребывание кусочков в спиртах составляло по 24 часа в каждой порции спирта при повышенной температуре (37°C в термостате) [35, 58].

### **2.2.7.3 - Заливка в парафин**

#### **1. Подготовка парафина.**

В работе применяли гранулированную парафиновую среду Histomix на основе высокоочищенного парафина и специально подобранных пластифицирующих добавок (BioVitrum, Россия). Для нагревания и охлаждения парафина использовали фарфоровую посуду (чашки). Точка плавления парафиновой среды – 52-54°C.

#### **2. Методика заливки в парафин.**

Фиксированные кусочки после обезвоживания в спиртах переносили сначала в смесь абсолютного спирта пополам с хлороформом на 12 часов, а затем и в чистых хлороформ на то же время. Работу вели в банках вместимостью 100 мл.

Хлороформ хорошо смешивается со спиртами и в то же время растворяет парафин, поэтому он необходим как промежуточная среда между обезвоживанием

и собственно заключением. Объекты, обработанные хлороформом, в дальнейшем легко пропитываются парафином.

Для постепенного и лучшего пропитывания парафином кусочки из хлороформа переносили в расплавленную смесь хлороформа с парафином и оставляли в ней при температуре 37°C на 3 часа. Смесь хлороформа с парафином готовили из равных объемных частей одного и другого, для чего парафин предварительно расплавляли [35, 58].

Из смеси хлороформа с парафином кусочки перекладывали в расплавленный парафин, который был заранее приготовлен и находился в термостате, установленном на 3°C выше точки плавления парафина (55°C). Пропитывание в парафине проводили в двух порциях, обозначаемых как первая и вторая. Кусочки вначале помещали в первую чашечку на 1 час, затем перекладывали теплым пинцетом во вторую также на 1 час.

После того, как кусочки пробыли во втором парафине достаточное время, брали третью чашечку, смазывали дно глицерином и разогревали над спиртовкой до температуры 70°C. Кусочки из второго парафина быстро перекладывали в форму и заливали чистым, заранее приготовленным и расплавленным парафином. Толщина слоя парафина над уровнем кусочков составляла 0,5 см.

После этого образцы кожи доставали из чашечки и укладывали в специальных формах. Затем кусочки заливали чистым парафином и резко охлаждали в морозильной камере при -18°C. В результате образовывались парафиновые блоки [35].

#### **2.2.7.4 – Подготовка предметного стекла и получение срезов**

На сухое обезжиренное предметное стекло стеклянной палочкой наносили маленькую капельку белка с глицерином, который заранее приготавливали по следующему методу: брали свежий яичный белок (без примеси желтка), взбивали шпателем до состояния пены, выливали на большой широкопористый фильтр, предварительно смоченный дистиллированной водой, фильтровали в течение 24 часов, к белку добавляли равный объем глицерина, размешивали и добавляли

кусочек камфары для предупреждения загнивания. После нанесения капли белка с глицерином ее тщательно размазывали тонким слоем. Нанесенный на стекло слой белка с глицерином свертывали при небольшом нагревании (50-60°C).

Парафиновый блок прочно укрепляли в объектодержателе микротом. Закрепленный блок подвергали окончательной обрезке, начисто удаляя свободный парафин (т. е. расположенный вне ткани) с боковых сторон блока и оставляя его лишь в виде узкой каемки шириной до 2-3 мм, на стороне, обращенной к ножу и противоположной ей, для обеспечения склеивания срезов и получения лент. Толщина парафиновых срезов варьировалась от 5 до 15 мкм [35].

Полученные срезы аккуратно, при помощи мягкой кисточки и препаровальной иглы, снимали с ножа, не касаясь лезвия и переносили на подготовленное предметное стекло, на которое заранее нанесли небольшой слой смеси спирта и дистиллированной воды (5 капель спирта 96% на 50 мл воды).

Для полного разворачивания срезов стекло проводили над пламенем спиртовки, поскольку повышенная температура расправляет парафиновые срезы.

После нанесения всех срезов на предметное стекло, смесь спирта с водой аккуратно сливали при помощи марлевой ленты. Далее стекло оставляли в термостате при температуре 54-55°C на 12 часов для того, чтобы срезы плотно прилипли к стеклу. После этого стекла помещали в термостат с температурой 37°C на 2 часа. Затем срезы окрашивали.

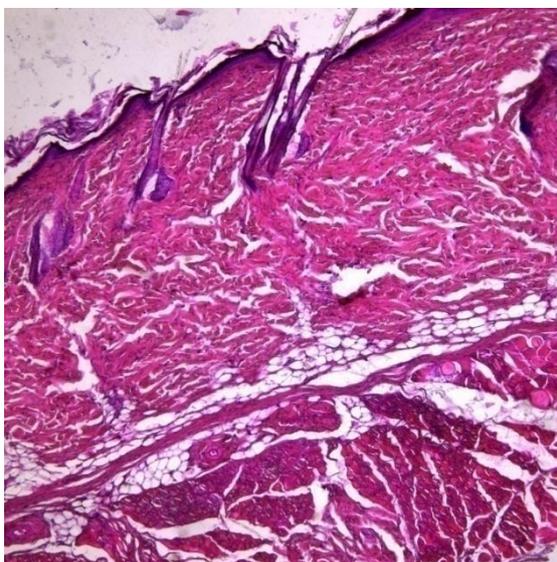
### **2.2.8 – Методика окрашивания срезов гематоксилин-эозином**

Перед окрашиванием срезы необходимо было депарафинировать. Для этого необходимо было достать стекло со срезами из термостата, опустить в баночку с ксилолом на 4 минуты таким образом, чтобы все срезы были скрыты. Затем в еще один свежий ксилол также на 4 минуты. Потом проводили по спиртам (2 порции) по 3 минуты. Далее оставляли в баночке с дистиллированной водой на некоторое время. После этого опустили в гематоксилин на 7 минут, ополоснули в 2 баночках с теплой водопроводной водой по 3 минуты или до появления синей окраски. Затем выдерживали в баночке с эозином в течение 3 минут, после чего необходимо было

быстро ополоснуть стекло в 2 баночках дистиллированной водой. Далее снова проводили по спиртам (2 банки по 3 минуты), опускали в карбоксиксилол на 3 минуты, 2 баночки ксилола по 3 минуты. Последний ксилол выполняет роль просветления окраски, поэтому стекло можно было доставать по визуальной оценке.

По истечению времени просветления во второй баночке ксилола, стекло доставали, протирали с нижней стороны и закрывали под покровное стекло следующим методом: на срезы нанесли тонкую полоску среды для заключения препаратов «Гистомаунт» (Компания «Элемент», Россия) и аккуратно, накрывали покровным стеклом, предварительно смоченным в ксилоле; после чего на покровное стекло необходимо было слегка надавить с помощью препаровальной иглы для вытеснения пузырей из-под стекла.

После проведенного, стёкла оставляли подсыхать при комнатной температуре несколько часов. Микроскопирование срезов, окрашенных по данной методике, представлено на *рисунке 5*.



**Рисунок 5 – Окраска гистологического среза гематоксилин-эозином**

*Примечание:* Об. 4 ок. 10.

### **2.2.9 – Методика окрашивания срезов по методу Ван-Гизона**

Набор для окрашивания по методу Ван-Гизона («Первая лабораторная компания», Россия):

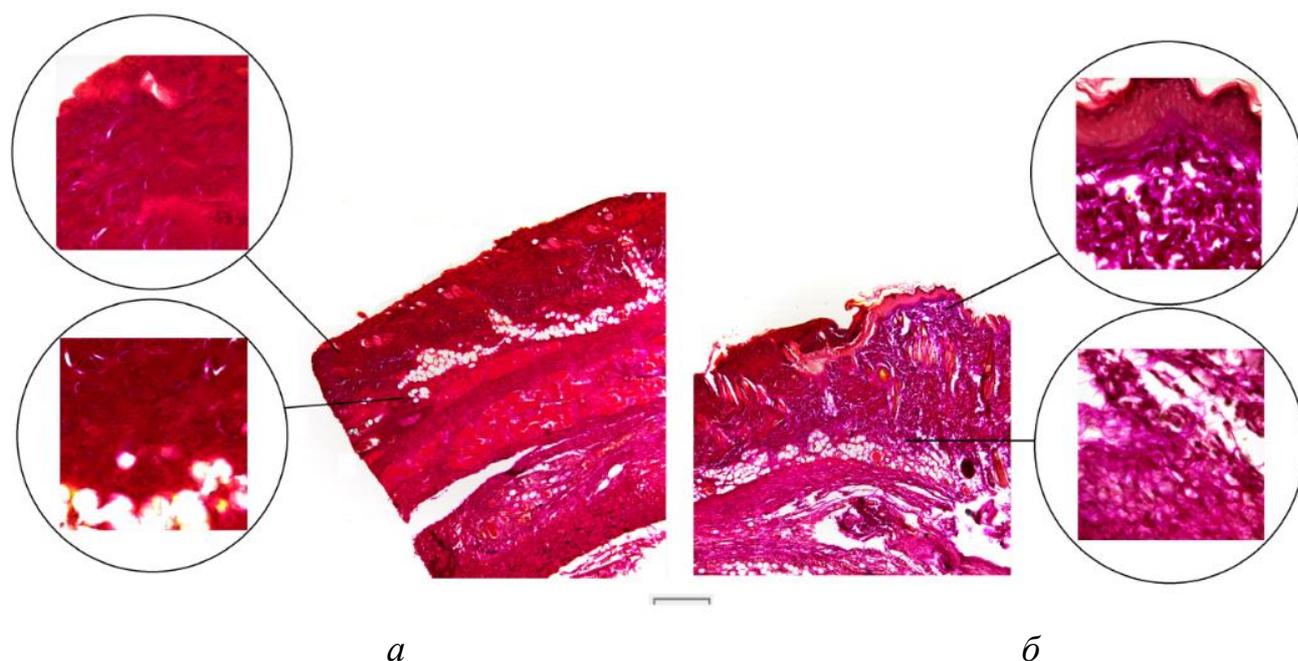
- А. Железный гематоксилин по Вейгерту, раствор В, 100 мл;
- В. Железный гематоксилин по Вейгерту, раствор А, 100 мл;
- С. Пикрофуксин по Ван-Гизону, 100 мл.

Перед окрашиванием срезы подвергали депарафинированию. Для этого стекло со срезами доставали из термостата, опускали в баночку с ксилолом на 4 минуты таким образом, чтобы все срезы были скрыты. Затем в еще один свежий ксилол также на 4 минуты. Потом проводили по спиртам (2 порции) по 3 минуты. Далее оставляли в баночке с дистиллированной водой на 5 минут. После этого стекла доставали, аккуратно протирали, не задев срезы, удаляя лишнюю воду.

Далее на срезы наносили смесь, состоящую из 5 капель реактива А и 5 капель реактива В, и оставляли на 10 мин. По истечению времени, образцы промывали в проточной воде в течение 10 мин. Затем на срезы наносили 10 капель реактива С и оставляли на 10 мин. По истечению времени срезы быстро промывали (2-3 сек) в дистиллированной воде. Затем дегидрировали в спиртах возрастающей концентрации, оставив на 1 мин в последнем (абсолютный этанол), просветляли в ксилоле и заключали под покровное стекло аналогично пункту 2.2.8.

После проведенного, стекла оставляли подсыхать при комнатной температуре несколько часов [42]. Микроскопирование срезов, окрашенных по данной методике, представлено на *рисунке б*.

В срезах оценивалась регенерация тканей и следующие показатели: склероз дермы, явление дистрофии стенок сосудов дермы, разрастание межклеточного матрикса (в т. ч. коллагена). В связи с анатомическим строением дермы, подсчет количества клеток проводили в зонах сосочковой, сетчатой дермы и на границе сетчатой дермы и гиподермы поврежденного участка и участка, находящегося в непосредственной близости (периферии) с использованием сетки для количественного подсчета клеточных элементов на площади 0,016 мм<sup>2</sup>, предложенной Глаголевым А.А. и модифицированной Автандиловым Г.Г. [2].



**Рисунок 6 – Поврежденная кожа (а) и участок, находящийся в непосредственной близости (б), после отморожения**

*Примечание:* Окраска по методу Ван-Гизона. Об. 4 (40) ок. 10.

Микроскопические исследования и фотографирование проводились с использованием микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия) – прямого лабораторно-исследовательского микроскопа с видеокomплектом анализа изображений со светодиодным осветителем проходящего света, 6-позиционной турелью для установки светоделительных элементов и цветной цифровой фотокамерой для микроскопии.

#### **2.2.10 – Определение инсулиноподобного фактора роста в сыворотке крови**

Пробы крови получали во время декапитации животных, затем центрифугировали при 15000 об./мин и 4°C в течение 10 мин. Содержание факторов роста в сыворотке крови определяли на аппарате иммуноферментного анализа Multiskan Fc (Thermo Fisher, США) с использованием соответствующего диагностического набора IFG-1 ELISA (Mediagnost, Германия).

### **2.2.11 – Определение сиаловых кислот в сыворотке крови**

После забора крови из п. 2.2.10, пробирки с кровью центрифугировали с помощью LMC-4200R (BioSan, Латвия) в течение 10 мин при температуре 8°C и 2700 об./мин. Сыворотку крови отбирали в пластиковые градуированные пробирки, после чего замораживали их в низкотемпературном морозильнике DW-86W100 (Haier, Китай).

В центрифужную пробирку, содержащую 1 мл сыворотки крови, добавляли 1 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты и перемешивали на вортексе Microspin FV-2400 (BioSan, Латвия). Пробирку помещали на 5 минут в термостат Combitherm-2 CH 3-150 (BioSan, Латвия) при 100°C, затем охлаждали ее в течение 5 минут при -3°C, после чего центрифугировали 5 минут при 13400 об/мин с помощью Minispin (Eppendorf, Германия). Отделяли надосадочную жидкость и повторно ее центрифугировали для качественного удаления осадка. В стеклянную пробирку отбирали 0,4 мл надосадочной жидкости, добавляли 5 мл уксусно-сернокислой смеси (реактив Гесса) и нагревали в кипящей водяной бане ПЭ-4300 (Экрос, Россия) при 100°C в течение 30 минут. После охлаждали под струей холодной воды. Оптическую плотность полученных образцов определяли на Spectrophotometer 2800 UV/VIS (United products & instruments, США) в кварцевой кювете с шириной слоя 10 мм при длине волны 545 нм против кюветы сравнения с реактивом Гесса. Результат выражали в условных единицах, умножая величину экстинкции на 1000.

### **2.2.12 – Методы статистического анализа**

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы SPSS for Windows (версия 13.0). Распределение параметров было ненормальным, в связи с чем описание выборок проводили с помощью подсчета среднего значения, медианы (Me) и межквартильного интервала в виде 25 и 75 перцентилей (Q25; Q75). Вероятность различий (p) оценивали по непараметрическим Z-критерию Колмогорова-Смирнова и W-критерию

Уилкоксона. Корреляционный анализ проводился с определением коэффициента Кендалла ( $\tau$ ). Статистическая достоверность присваивалась при значении  $p < 0,05$ .

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ В 2 ГЛАВЕ**

### *Патенты*

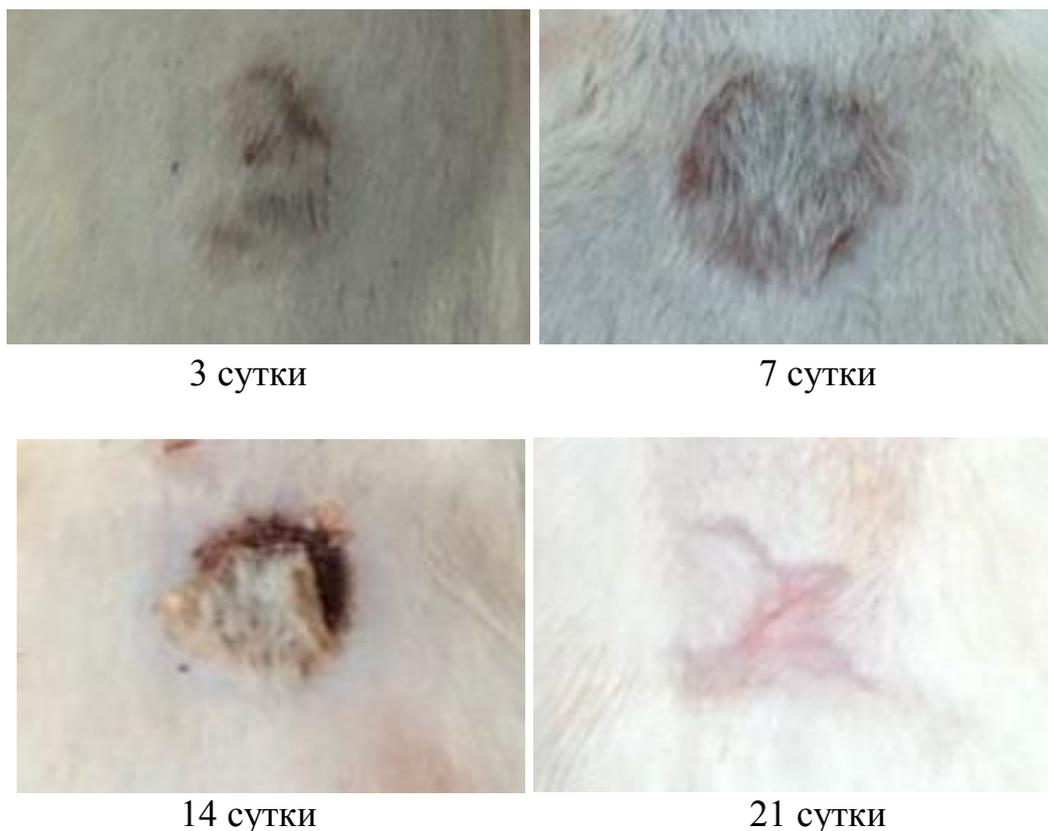
1. Способ определения количества коллагена в ткани: патент на изобретение № 2689337 Рос. Федерация: (51) МПК<sup>51</sup> G01N 33/48 / С.И. Малявская, С.Л. Кашутин, **Н.А. Шутский**, Л.Л. Шагров, Д.В. Мизгирёв, А.С. Аксенов, Д.Г. Чухчин; заявитель и правообладатель ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – № 2018124160; заявл. 02.07.2018, опубл. 27.05.2019. Бюлл. № 15.

2. Способ выделения коллагеновых волокон дермы: патент на изобретение № 2764514 Рос. Федерация: (51) МПК<sup>51</sup> А61К 35/36 / Л.Н. Горбатова, **Н.А. Шутский**, С.Л. Кашутин, С.И. Малявская, Л.Л. Шагров, Д.В. Мизгирёв, Д.Г. Чухчин; заявитель и правообладатель ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – № 2020142837; заявл. 23.12.2020, опубл. 18.01.2022. Бюлл. № 2.

### ГЛАВА 3 – ИНТЕНСИВНОСТЬ ДЕГРАДАЦИИ И СИНТЕЗА МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ДЕРМЫ У КРЫС ПОСЛЕ ЛОКАЛЬНОГО ХОЛОДОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

#### 3.1 – Динамика заживления раневой поверхности после острого отморожения

После моделирования контактного отморожения на 3 сутки на месте повреждения регистрировали отечность и гиперемию (*рисунок 7*). На 7 сутки эксперимента формировалась плотная серозная корочка и гиперемия вокруг зоны повреждения, отечность разрешилась. Пальпаторно определялась инфильтрация. На 14 сутки корочка отторгалась, обнажая эрозивно-язвенный дефект, окруженный краснотой. К 21 суткам происходило рубцевание, гиперемии уже не было.



**Рисунок 7 – Процесс заживления после острого отморожения**

### 3.2 – Содержание коллагена и толщина коллагеновых волокон дермы у крыс после острого отморожения

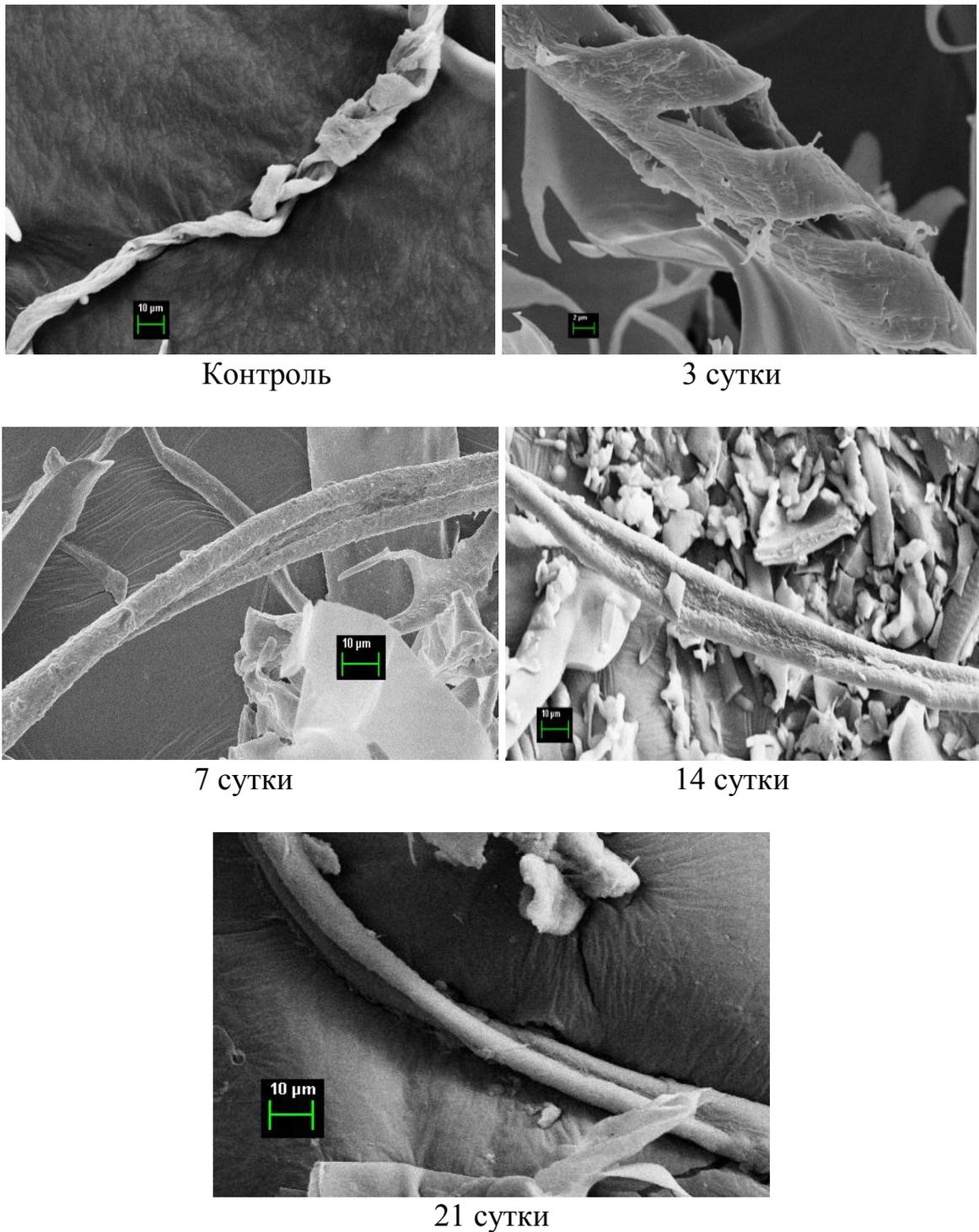
На 3 сутки после острого локального отморожения у крыс регистрировали статистически значимое снижение массы коллагена дермы на 7,60 мг, что составило немногим более 50% по сравнению с контрольной группой (таблица 1).

**Таблица 1 – Содержание коллагена дермы (мг и %) и толщина коллагеновых волокон в поврежденном участке дермы после острого отморожения у крыс в зависимости от продолжительности эксперимента [Ме (Q25; Q75)]**

Показатель	Контрольная группа	Продолжительность эксперимента, сутки				Уровень статистической значимости
		3	7	14	21	
1	2	3	4	5	6	7
Масса коллагена дермы, мг	10,70 (9,00; 12,30)	3,10 (2,80; 3,90)	5,25 (4,97; 5,92)	6,00 (5,70; 7,00)	8,95 (8,62; 9,57)	2-3 Z=1,87; p=0,002* 2-4 Z=1,79; p=0,003* 2-5 Z=1,60; p=0,010* 2-6 Z=1,13; p=0,150 3-4 Z=1,79; p=0,003* 3-5 Z=1,87; p=0,002* 3-6 Z=1,93; p=0,001* 4-5 Z=0,94; p=0,330 4-6 Z=1,85; p=0,002* 5-6 Z=1,65; p=0,008*
Содержание коллагена дермы, %	71,43 (59,21; 72,78)	21,71 (16,37; 22,51)	31,15 (30,02; 33,55)	35,91 (32,39; 49,29)	52,27 (46,42; 55,17)	2-3 Z=1,87; p=0,020* 2-4 Z=1,79; p=0,003* 2-5 Z=1,87; p=0,020* 2-6 Z=1,69; p=0,007* 3-4 Z=1,79; p=0,003* 3-5 Z=1,87; p=0,002* 3-6 Z=1,93; p=0,001* 4-5 Z=1,24; p=0,090 4-6 Z=1,85; p=0,002* 5-6 Z=1,38; p=0,040*
Толщина коллагеновых волокон, мкм	11,11 (10,08; 13,90)	3,36 (3,08; 4,42)	5,65 (5,09; 6,08)	6,99 (6,38; 7,81)	8,99 (8,95; 9,76)	2-3 Z=2,02; p=0,001* 2-4 Z=2,10; p=0,001* 2-5 Z=2,10; p=0,001* 2-6 Z=1,64; p=0,009* 3-4 Z=1,93; p=0,001* 3-5 Z=1,93; p=0,001* 3-6 Z=1,78; p=0,006* 4-5 Z=1,75; p=0,004* 4-6 Z=1,75; p=0,004* 5-6 Z=1,75; p=0,004*

Примечание: \* - статистически значимые различия значений ( $p < 0,05$ )

Снижение массы коллагена дермы сопровождалось статистически значимым уменьшением толщины коллагеновых волокон в 3,3 раза ( $p = 0,001$ ) (рисунок 8).



**Рисунок 8 – Электронная микроскопия коллагеновых волокон дермы поврежденного участка после острого отморожения**

Но уже на 7 сутки после холодового повреждения масса коллагена начала восстанавливаться, достигнув 5,25 мг ( $p = 0,003$ ). Наряду с увеличением массы коллагена существенно увеличилось его содержание в дерме. В период с 7 по 14 сутки увеличение массы коллагена и дермального содержания в

собственно коже регистрировали только в виде тенденции к увеличению на 10 %. Увеличение толщины коллагеновых волокон дермы начиналось на 7 сутки (до 5,65 мкм,  $p = 0,002$ ) и достигало к 14 суткам 6,99 мкм ( $p = 0,004$ ). Статистически значимое увеличение синтеза коллагена вновь возобновилось с 14 по 21 сутки, достигнув уровня 8,95 мг ( $p = 0,008$ ), что также отразилось на увеличении его содержания в дерме почти в 1,5 раза и на толщине волокон на 2 мкм. Масса коллагена дермы и его содержание на 21 сутки практически достигло уровня интактной группы, в то время как толщина волокон на всем протяжении наблюдения статистически значимо отличалось от контрольных значений.

Таким образом, после локального отморожения интенсивное увеличение массы коллагена дермы, его содержания в дерме и толщины волокон происходило с 3 по 7 и с 14 по 21 сутки.

На основании увеличения массы коллагена и его содержания в дерме с 3 по 7 сутки, можно полагать о начале репаративных процессов именно в этот период. Таким образом, скопления фибробластов в очаге локального холодового повреждения на 7 сутки являлись функционально активными в направлении синтеза волокнистых структур соединительной ткани. С 7 по 14 сутки регистрировалось увеличение массы коллагена и его содержания в дерме, но оно не являлось статистически значимым. Следующий пик наблюдался с 14 по 21 сутки. Учитывая, что статистически значимых различий в массе коллагена и его содержания между группой контроля и опытной группой на 21 сутки не отмечено, можно считать, что изучаемые параметры одинаковы, что позволяет полагать о частичном восстановлении массы коллагена дермы к 21 суткам. Однако, толщина коллагеновых волокон значительно снизилась на 3 сутки и нарастала, так и не достигнув к 21 суткам изначального уровня.

### 3.3 – Содержание сиаловых кислот в сыворотке крови у крыс после острого отморожения

При исследовании динамики содержания сиаловых кислот в сыворотке крови у крыс после локального отморожения статистически значимое снижение концентрации сиаловых кислот в сыворотке крови у крыс регистрировали уже на 3 сутки эксперимента в 1,5 раза по сравнению с группой контроля (*таблица 2*).

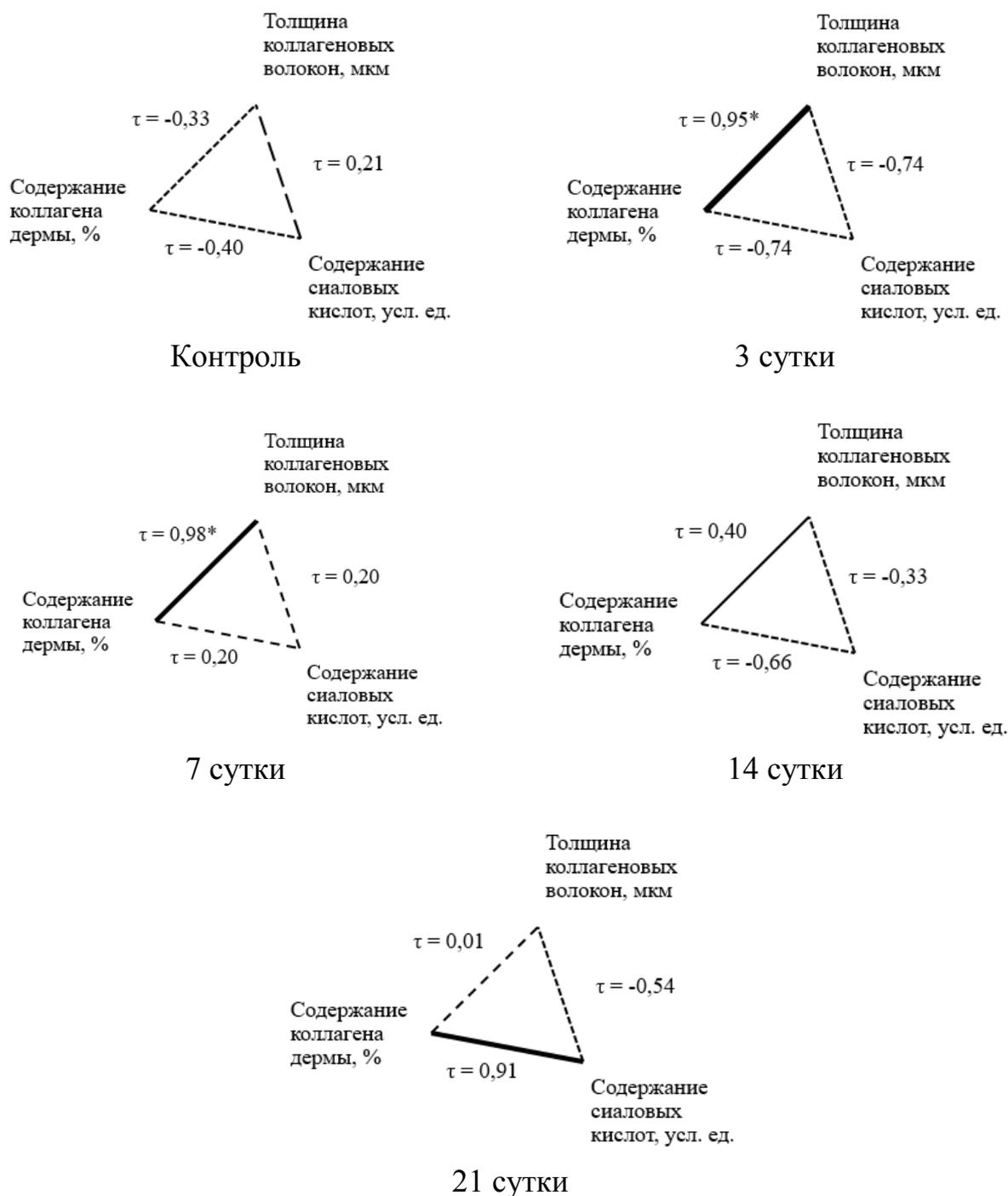
К 7 суткам наблюдали незначительную тенденцию к увеличению показателя ( $p = 0,082$ ). В период с 7 по 14 сутки вновь регистрировали статистически значимое увеличение уровня сиаловых кислот в сыворотке крови. К 21 суткам после локального холодового повреждения у крыс отмечали уровень содержания сиаловых кислот, статистически значимо не отличающийся от значений контрольной группы ( $p = 0,070$ ).

**Таблица 2 – Содержание сиаловых кислот в сыворотке крови у крыс после локального холодового воздействия в зависимости от продолжительности эксперимента [Me (Q25; Q75)]**

Показатель	Контроль- ная группа	Продолжительность эксперимента, сутки				Уровень статистической значимости
		3	7	14	21	
1	2	3	4	5	6	7
Содержа- ние сиаловых кислот, усл. ед.	151,0 (138,0; 180,0)	101,0 (70,0; 110,0)	127,0 (109,0; 131,5)	138,5 (137,3; 143,5)	108,5 (105,5; 131,5)	2-3 Z=1,79; p=0,003* 2-4 Z=1,68; p=0,006* 2-5 Z=0,93; p=0,360 2-6 Z=1,29; p=0,070 3-4 Z=1,27; p=0,082 3-5 Z=1,49; p=0,023* 3-6 Z=0,89; p=0,400 4-5 Z=1,49; p=0,023* 4-6 Z=0,82; p=0,512 5-6 Z=1,06; p=0,211

*Примечание:* \* - статистически значимые различия значений ( $p < 0,05$ )

Корреляционный анализ изучаемых параметров (*рисунок 9*) показал сильную взаимосвязь между содержанием коллагена и толщиной коллагеновых волокон на 3 и 7 сутки, которая подтверждалась статистически ( $\tau = 0,95$ ;  $p = 0,022$  и  $\tau = 0,99$ ;  $p = 0,012$ , соответственно). В остальных случаях регистрировали либо слабые, либо обратные связи между изучаемыми показателями.



**Рисунок 9 – Корреляционный анализ содержания коллагена и толщины коллагеновых волокон дермы, сиаловых кислот в сыворотке крови после острого отморожения**

*Примечание:* прямые связи: слабая связь – линия с крупными штрихами, умеренная связь – линия средней толщины, сильная связь – толстая линия; обратная связь – линия с мелким штрихом; \* $p < 0,05$ .

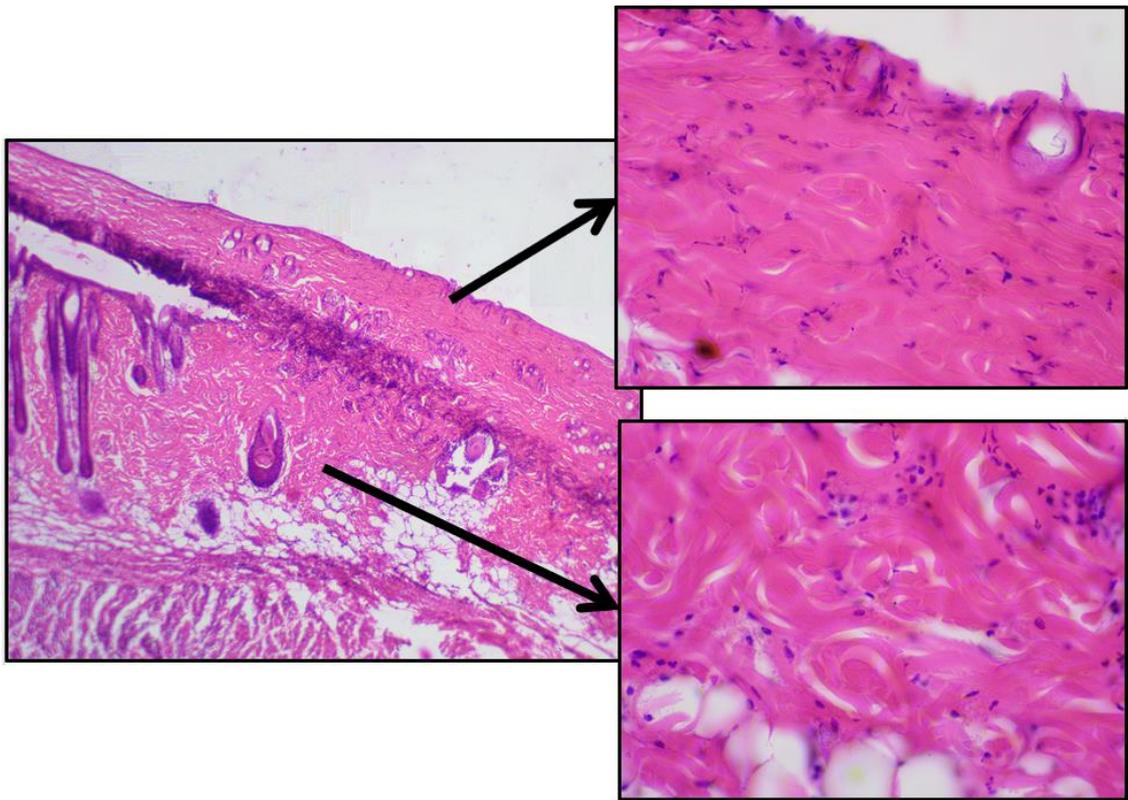
### **3.4 – Гистологическое исследование кожи крыс после острого отморожения**

В ходе проведения морфологических исследований было установлено, что на 3 сутки эксперимента в зоне повреждения эпителиальный слой кожи полностью разрушился (в том числе межклеточные контакты по типу десмосом, контакт базального слоя эпидермиса с базальной мембраной по типу полудесмосом), произошли некротические и воспалительные процессы в дерме, что сопровождалось полной реорганизацией волокнистой структуры, разрушением волосяных фолликулов и сальных желез (*рисунок 10*).

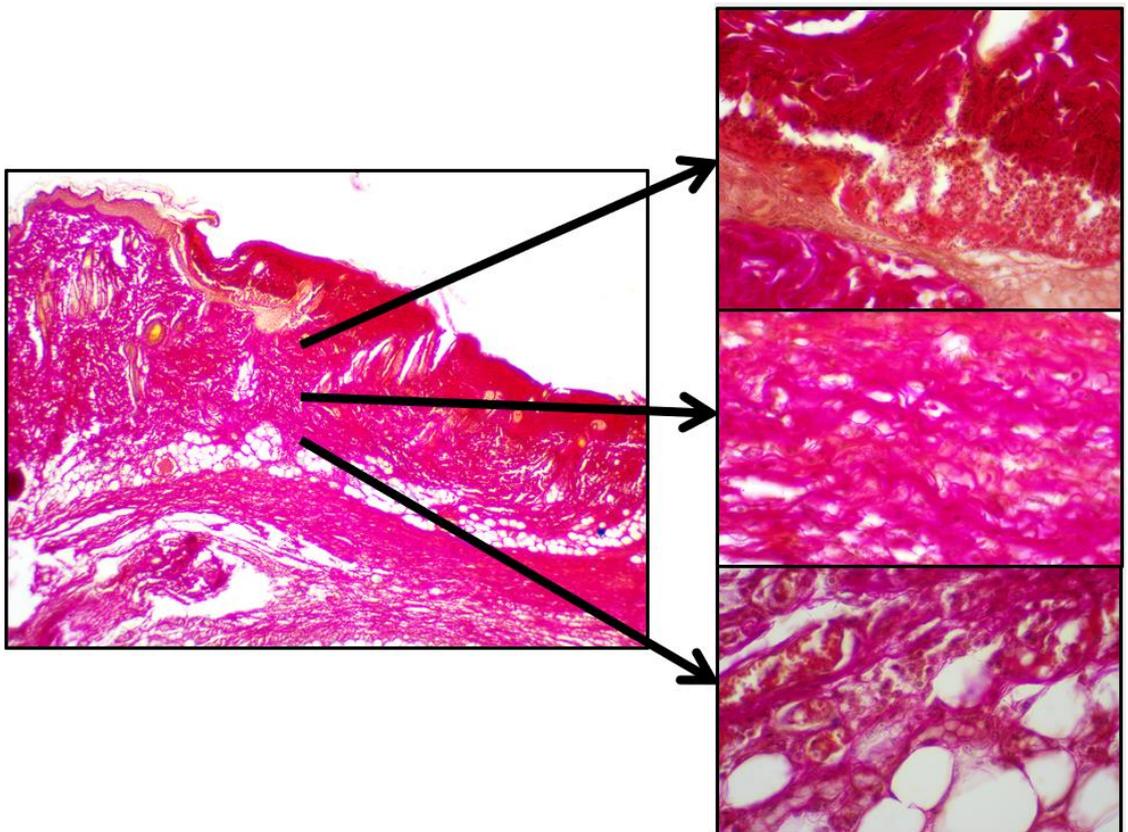
Также в месте поражения было отмечено небольшое скопление клеток, преимущественно нейтрофильных лейкоцитов. Они мигрируют к очагу повреждения и, при помощи гистолитических ферментов (протеаз, пептидаз и др.), рассасывают отмирающую ткань в следствие фибриноидного некроза.

На 7 сутки наблюдалась миграция клеток (предположительно, фибробластов и лимфоцитов) в место поражения (*рисунок 11*). В зоне поражения, со стороны подкожной жировой клетчатки, начинает формироваться новая соединительная ткань, состоящая из тонких коллагеновых волокон и клеток фибробластического дифферона. Также наблюдался лимфогистиоцитарный вал, клетки которого разрушают некротическую ткань и защищают от раневой инфекции.

На 14 сутки в зоне поражения образовался струп, с периферии которого определялась небольшая зона возрастающего эпителия (*рисунок 12*). Также наблюдалось образование грануляционной ткани под струпом, которая была представлена многочисленными тонкими соединительнотканными волокнами, большим количеством сосудов микроциркуляторного русла и скоплением, согласно литературным данным, макрофагов, лимфоцитов, фибробластических и малодифференцированных клеток. Преимущественная зона для миграции клеток определялась в сетчатой дерме на границе с подкожной жировой клетчаткой.



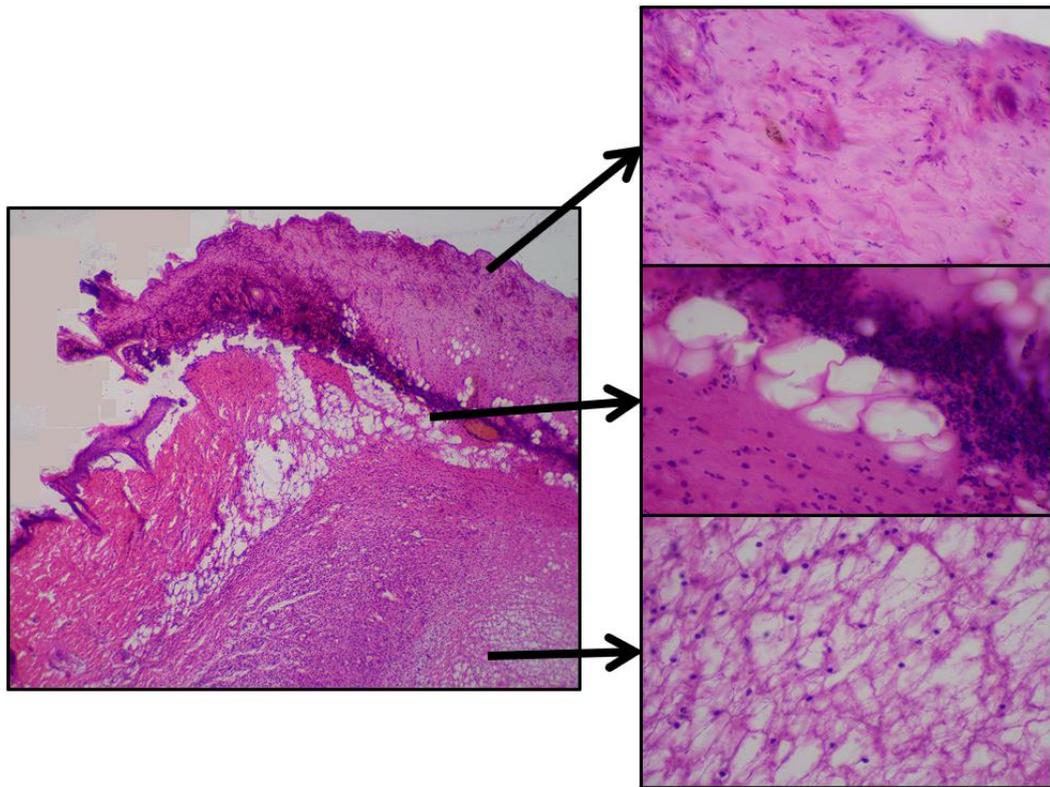
а



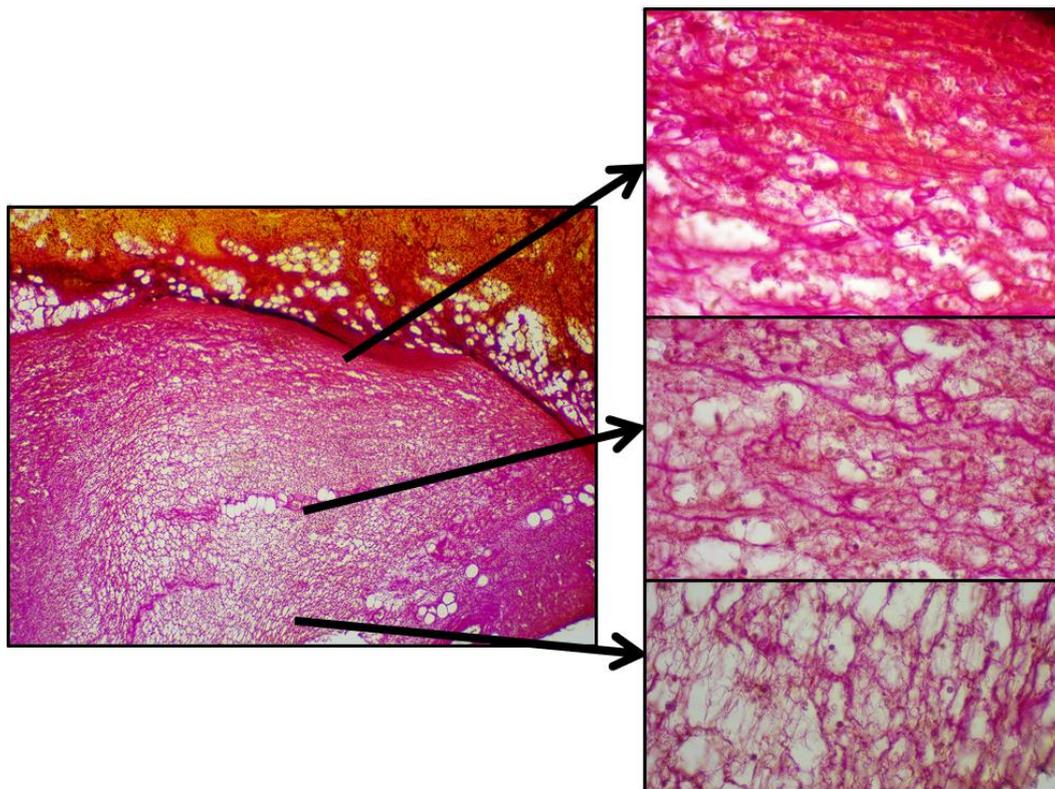
б

**Рисунок 10 – Поврежденная кожа на 3 сутки эксперимента**

*Примечание:* Окрашивание гематоксилин-эозином (а) и по методу Ван-Гизона (б).  
Об. 4 (40) ок. 10.



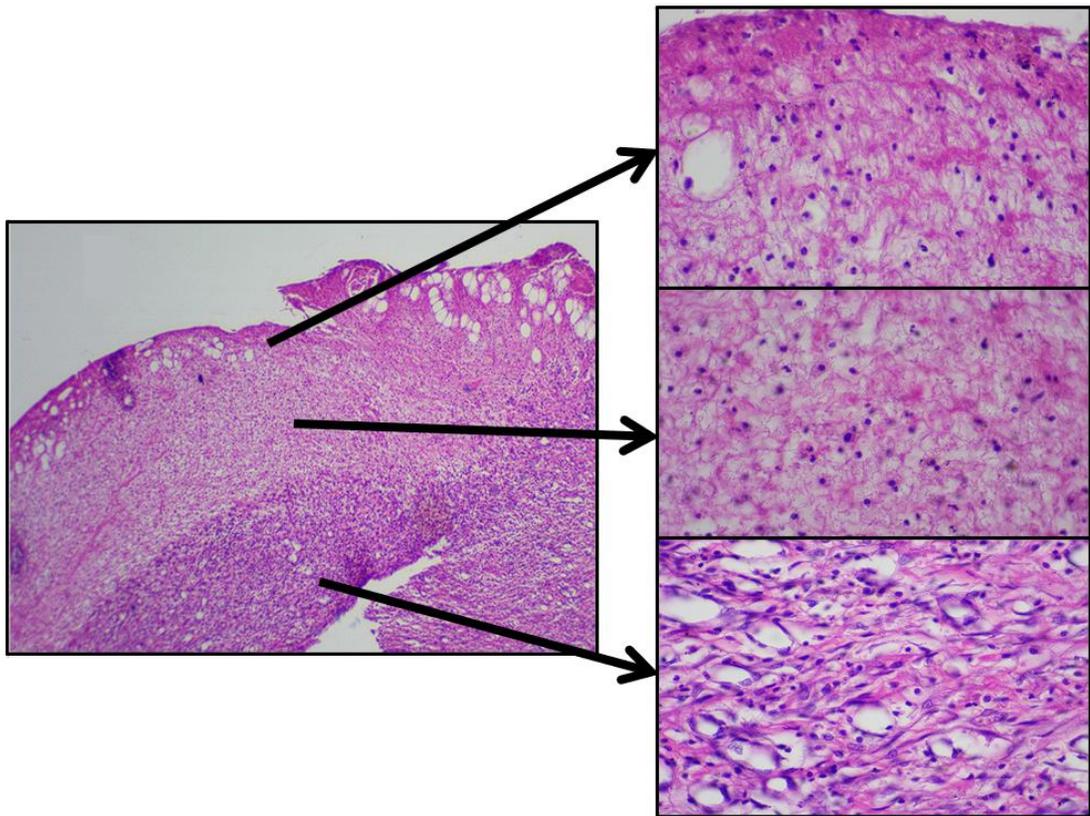
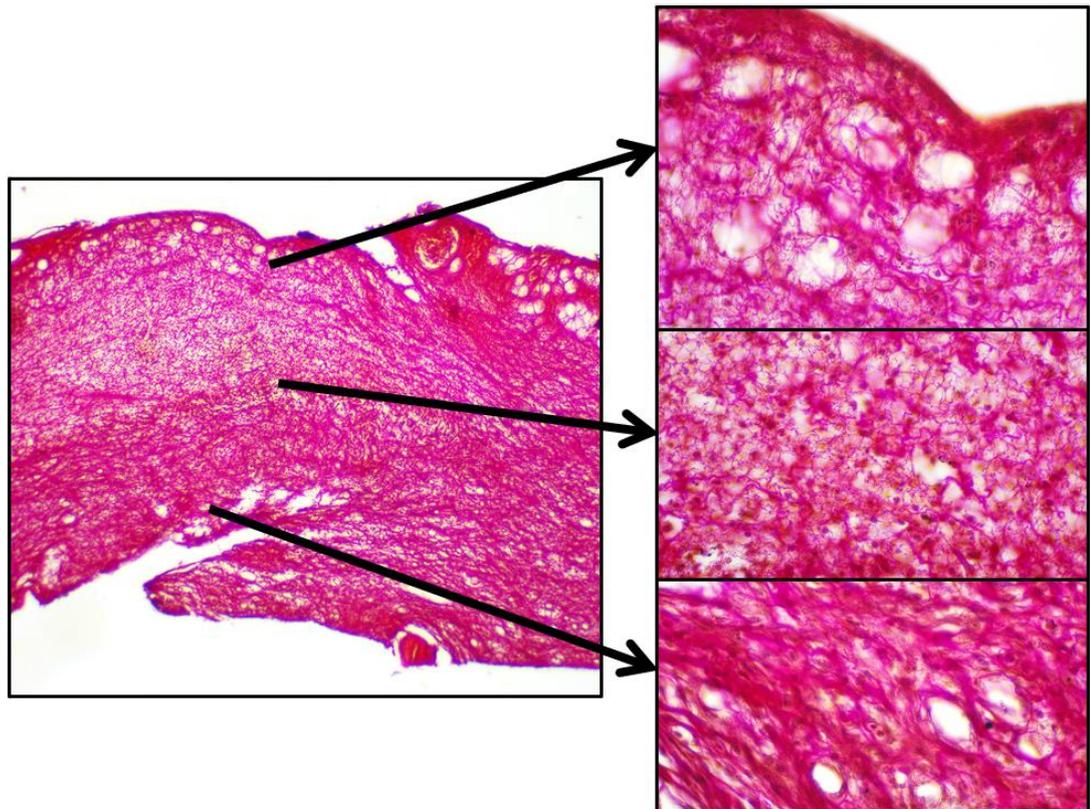
*a*



*б*

**Рисунок 11 – Поврежденная кожа на 7 сутки эксперимента**

*Примечание:* Окрашивание гематоксилин-эозином (*a*) и по методу Ван-Гизона (*б*).  
Об. 4 (40) ок. 10.

*a**б*

**Рисунок 12 – Поврежденная кожа на 14 сутки эксперимента**

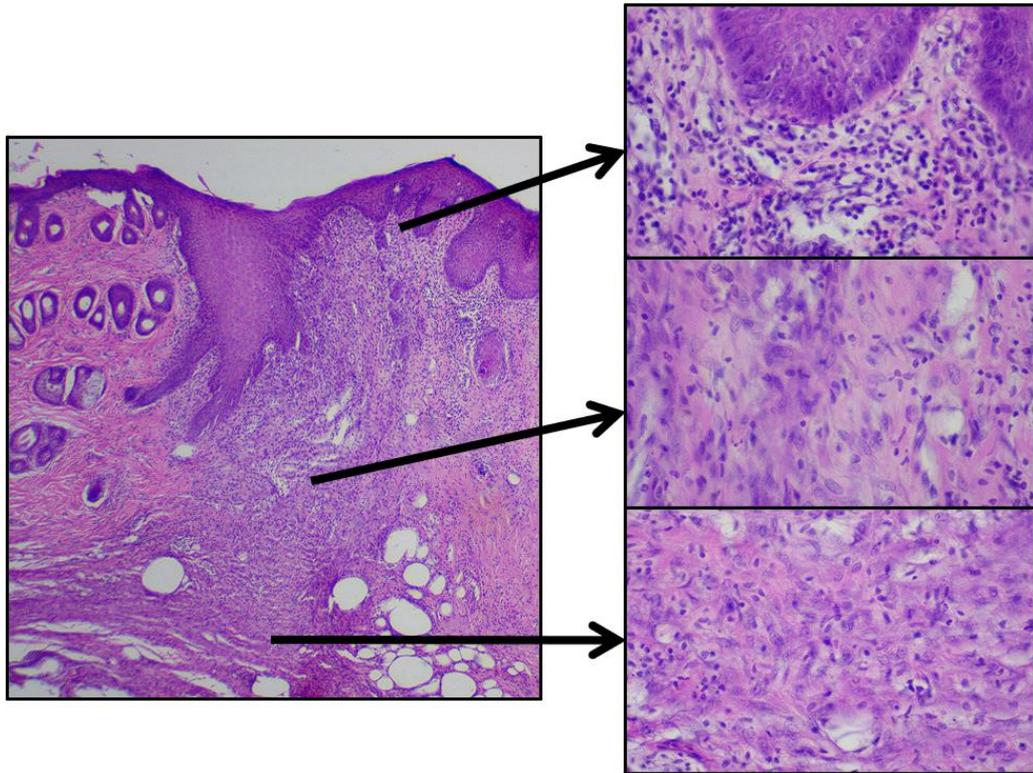
*Примечание:* Окрашивание гематоксилин-эозином (*a*) и по методу Ван-Гизона (*б*).

Об. 4 (40) ок. 10.

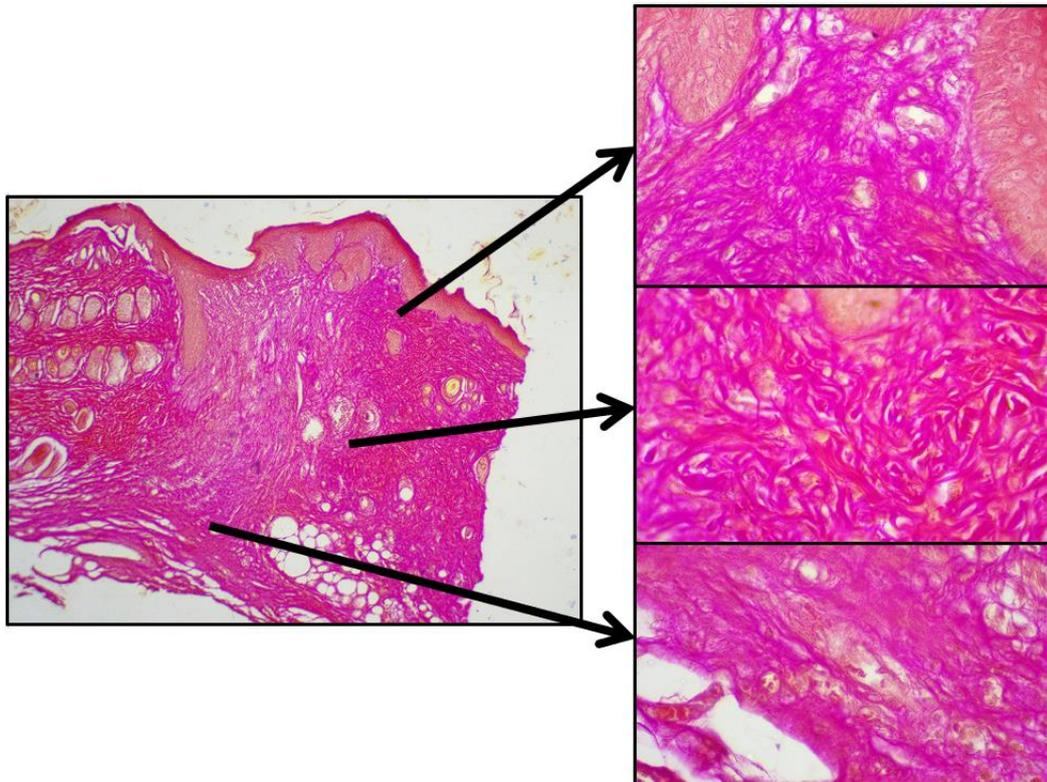
Только лишь на 21 сутки зона холодого воздействия покрывалась эпителиальным слоем. В грануляционной ткани вследствие продолжающихся воспалительных процессов клеточные элементы не преобладали над волокнистыми структурами (*рисунок 13*). В основном под эпидермальным слоем определялась плотная рубцовая ткань, но в редких случаях наблюдались небольшие сальные железы. В сформировавшемся регенерате элементы придатков кожи, а именно волосяные фолликулы, практически не восстанавливались.

На *рисунке 14* представлены микрофотографии неповрежденной кожи, на которой отчетливо наблюдаются эпидермис, сосочковая и сетчатая дермы, подкожно-жировая клетчатка, а также многочисленные волосяные фолликулы.

Поскольку на 3 сутки при 3<sup>ей</sup> степени отморожения эпидермис полностью слущен, сосочковый слой дермы разрушен, а в сетчатой дерме – выраженный фибриноидный некроз, то вполне очевидно, что содержание массы коллагена к 3 суткам минимальное: он разрушен, и синтез новых волокон не наблюдается.



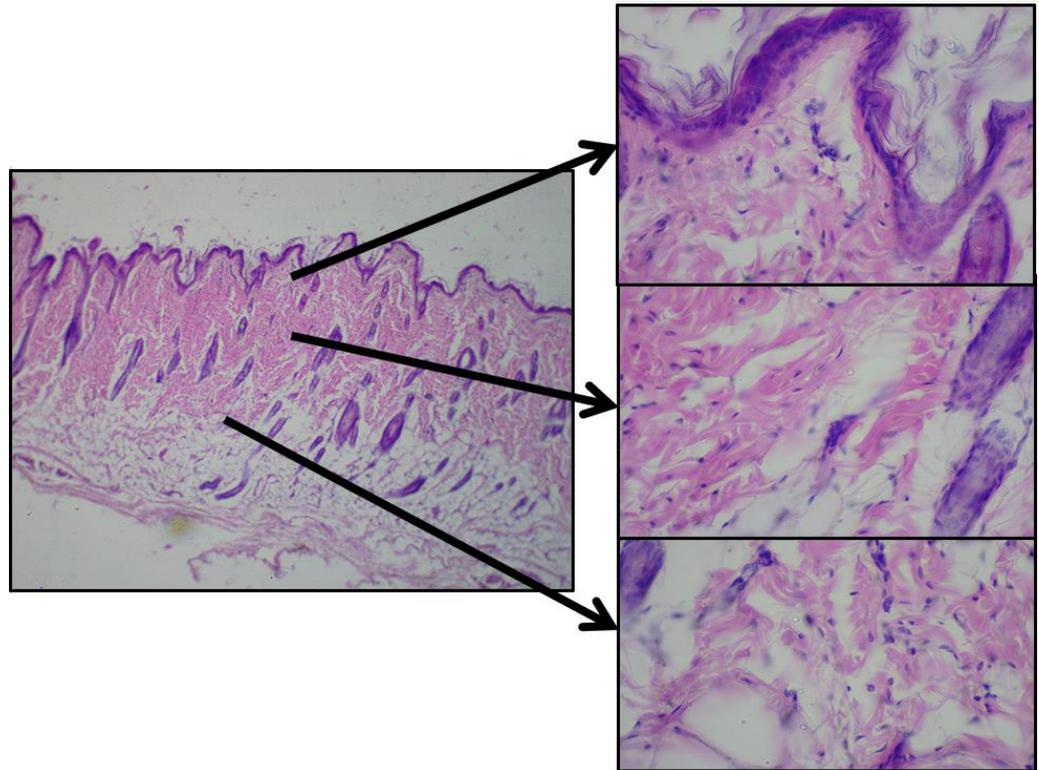
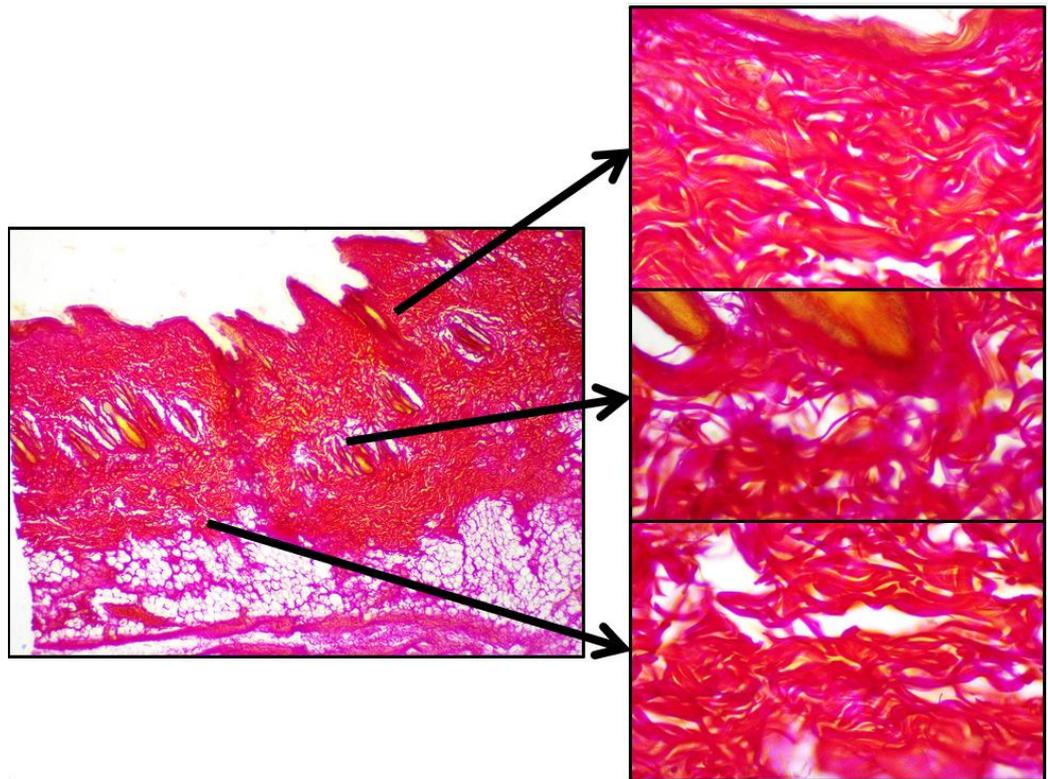
а



б

**Рисунок 13 – Поврежденная кожа на 21 сутки эксперимента**

*Примечание:* Окрашивание гематоксилин-эозином (а) и по методу Ван-Гизона (б).  
Об. 4 (40) ок. 10.

*a**б***Рисунок 14 – Здоровая кожа контрольной группы**

*Примечание:* Окрашивание гематоксилин-эозином (*a*) и по методу Ван-Гизона (*б*).  
Об. 4 (40) ок. 10.

### 3.5 – Клеточный состав дермы у крыс после острого отморожения

В сосочковой дерме поврежденного участка увеличение количества клеток на единицу площади наблюдалось уже на 3 сутки после локального повреждения в сравнении с неповрежденной зоной группы контроля (таблица 3).

**Таблица 3 – Количество клеток на единицу площади в поврежденном и неповрежденном участках кожи в зависимости от локализации в дерме после острого отморожения [Me (Q25; Q75)]**

Продолжительность эксперимента, сутки	Сосочковая дерма		Граница сетчатой дермы и гиподермы		Уровень статистической значимости
	поврежденный участок кожи	периферия	поврежденный участок кожи	периферия	
1	2	3	4	5	6
3	2,0 (1,3; 2,0)	0,0 (0,0; 1,0)	4,0 (3,0; 4,0)	2,0 (1,0; 3,0)	2-3 W=-3,90; p=0,001* 2-4 W=-3,56; p=0,001* 3-5 W=-3,58; p=0,001* 4-5 W=-3,68; p=0,001*
7	2,0 (1,0; 2,0)	1,0 (0,0; 1,0)	4,0 (3,3; 6,0)	2,0 (1,0; 2,0)	2-3 W=-3,99; p=0,001* 2-4 W=-3,76; p=0,001* 3-5 W=-3,04; p=0,002* 4-5 W=-3,84; p=0,001*
14	1,0 (1,0; 2,0)	0,0 (0,0; 1,0)	3,5 (2,0; 4,0)	1,0 (1,0; 1,8)	2-3 W=-3,28; p=0,001* 2-4 W=-3,57; p=0,001* 3-5 W=-3,08; p=0,002* 4-5 W=-3,79; p=0,001*
21	1,0 (1,0; 2,0)	0,0 (0,0; 1,0)	2,0 (2,0; 3,0)	1,0 (1,0; 1,8)	2-3 W=-3,75; p=0,001* 2-4 W=-2,58; p=0,010* 3-5 W=-3,12; p=0,002* 4-5 W=-3,60; p=0,001*

Примечание: \* - статистически значимые различия значений ( $p < 0,05$ ).

На 7 сутки эксперимента количество клеток в сосочковой дерме у группы крыс без нарушений толерантности к глюкозе не изменилось в сравнении с данными, полученными на 3 сутки эксперимента. К 14 суткам отмечалось снижение количества клеток, и к 21 суткам после локального холодого воздействия количество клеток в сосочковой дерме хоть и снизилось, но все равно отличалось от показателей в контрольной группе крыс ( $p = 0,010$ ).

В сетчатой дерме у крыс после холодого воздействия увеличение количества клеток на единицу площади регистрировали на 3 сутки. Затем медиана изучаемого показателя практически не изменялась в течение всего периода наблюдения и к 21 суткам не вернулась к значению контроля.

На границе сетчатой дермы и гиподермы статистически значимое увеличение количества клеток на единице площади наблюдалось на 3 сутки, а после этого показатель снижался, и к 21 суткам его значение также не вернулось к исходным значениям контроля.

В сосочковой дерме на границе пораженного и непораженного участков у группы крыс без нарушения толерантности к глюкозе концентрация клеток не претерпела каких-либо значимых изменений на протяжении всего постхолодового периода. В сетчатой дерме также не было зафиксировано статистически значимых изменений в содержании клеток на единице площади. Однако на границе сетчатой дермы и гиподермы увеличение показателя наблюдалось на 3 сутки после холодового повреждения у крыс. На 21 сутки наблюдалось возвращение количества клеток к значениям до контактного холодового воздействия ( $p = 1,000$ ).

Таким образом, после холодового повреждения в зоне периферии повреждения клетки в основном концентрировались на границе сетчатой дермы и гиподермы, в меньшей степени – в сетчатой дерме уже на 3 сутки.

### **3.6 – Содержание инсулиноподобного фактора роста в сыворотке крови крыс после острого отморожения**

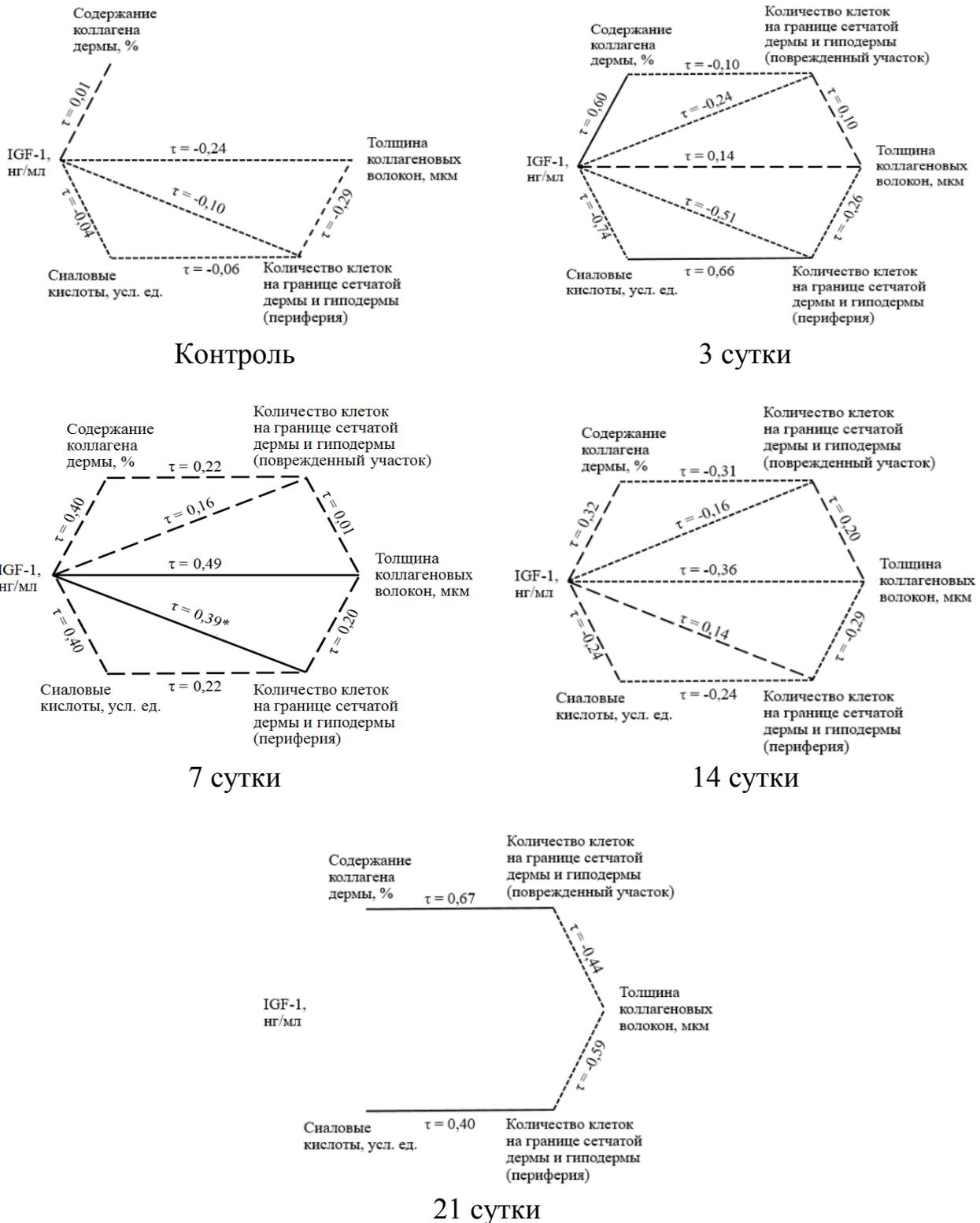
В ходе определения фактора роста (*таблица 4*) в сыворотке крыс наблюдалось незначительное снижение концентрации IGF-1 на 3 сутки после локального холодового воздействия с 600,0 до 216,0 нг/мл. К 7 суткам его содержание в сыворотке резко увеличилось в 6 раз, а максимальное значение этого показателя достигло на 14 сутки (1800,0 нг/мл) и сохранялось до окончания периода наблюдения, не вернувшись к значениям группы контроля.

**Таблица 4 – Содержание IGF-1 в сыворотке крови крыс после локального острого отморожения [Me (Q25; Q75)]**

Показатель	Контрольные значения	Продолжительность эксперимента, сутки				Уровень статистической значимости
		3	7	14	21	
1	2	3	4	5	6	7
IGF-1, нг/мл	600,0 (232,0; 1080,0)	216,0 (148,0; 919,0)	1285,0 (404,0; 800,0)	1800,0 (1022,0; 1800,0)	1800,0 (1800,0; 1800,0)	2-3 Z=1,24; p=0,093 2-4 Z=1,16; p=0,131 2-5 Z=1,92; p=0,001* 2-6 Z=2,74; p=0,001* 3-4 Z=1,32; p=0,060 3-5 Z=1,77; p=0,004* 3-6 Z=2,48; p=0,001* 4-5 Z=1,10; p=0,177 4-6 Z=1,94; p=0,001* 5-6 Z=0,84; p=0,474

*Примечание:* IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста; \* - статистически значимые различия значений ( $p < 0,05$ ).

При проведении корреляционного анализа (*рисунок 15*) выявлена умеренная статистически значимая связь между увеличением содержания IGF-1 и концентрацией клеток на границе сетчатой дермы и гиподермы вокруг зоны повреждения ( $\tau = 0,39$ ;  $p = 0,039$ ) только на 7 сутки после локального холодового воздействия.



**Рисунок 15 – Корреляционный анализ содержания инсулиноподобного фактора роста (IGF-1), содержания коллагена, толщины коллагеновых волокон, сигнальных кислот в сыворотке крови и количества клеток дермы после острого отморожения**

*Примечание:* прямые связи: слабая связь – линия с крупными штрихами, умеренная связь – линия средней толщины, сильная связь – толстая линия; обратная связь – линия с мелким штрихом; \* $p < 0,05$ .

### 3.7 – Резюме

Таким образом, после холодового воздействия у крыс без нарушения толерантности к глюкозе деградация коллагена наступала на 3 сутки, о чем свидетельствовало снижение его массы, содержания в дерме и толщины коллагеновых волокон. Деградация межклеточного вещества, которое окружает волокнистые компоненты соединительной ткани, происходила позже – на 7 сутки, на что указывало увеличение концентрации сиаловых кислот в сыворотке крови, продолжающееся до 14 суток.

После 3 суток начиналась ремодуляция коллагена, которая характеризовалась двухфазностью: 3-7 сутки и 14-21 сутки, когда активно продуцировался коллаген, и увеличивалась толщина коллагеновых волокон.

После 14 суток, а особенно на 21 сутки отмечали снижение содержания сиаловых кислот, которое достигло уровня контрольной группы.

В сосочковой дерме поврежденного участка увеличение количества клеток на единице площади наблюдалось уже на 3 сутки после локального холодового повреждения. На 7 сутки эксперимента количество клеток (лимфоцитов и гистиоцитов) в сосочковой дерме у группы крыс без нарушения глюкозотолерантности не изменилось в сравнении с данными, полученными на 3 сутки эксперимента. К 14 суткам отмечалось снижение количества клеток на единице площади. Таким образом, к 21 суткам после локального отморожения количество клеток в сосочковой дерме хоть и снизилось, но все равно отличалось от показателей в контрольной группе крыс.

В сетчатой дерме у крыс после холодового воздействия увеличение количества клеток на единице площади регистрировали уже на 3 сутки. Затем медиана изучаемого показателя практически не изменялась в течение всего периода наблюдения и к 21 суткам не вернулась к значению контроля.

На границе сетчатой дермы и гиподермы статистически значимое увеличение количества клеток на единице площади наблюдалось на 3 сутки. После этого показатель снижался к 21 суткам, также не достигнув исходных значений контроля.

В сосочковой дерме на границе пораженного и непораженного участков у группы крыс без нарушений толерантности к глюкозе концентрация клеток не претерпела каких-либо значимых изменений на протяжении всего постхолодового периода. В сетчатой дерме также не было зафиксировано статистически значимых изменений в содержании клеток на единице площади. Однако на границе сетчатой дермы и гиподермы увеличение показателя наблюдалось на 3 сутки после повреждения. На 21 сутки наблюдалось возвращение количества клеток к значениям до повреждения.

В сыворотке крыс наблюдалось незначительное снижение концентрации IGF-1 на 3 сутки после острого отморожения. К 7 суткам его содержание в сыворотке резко увеличилось. Максимального значения этот показатель достиг на 14 сутки и сохранялся до окончания периода наблюдения, не вернувшись к значениям группы контроля.

Следовательно, к 21 суткам в зоне повреждения полностью был сформирован рубец, состоящий из волокон и межклеточного вещества, синтезированных фибробластами.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ В 3 ГЛАВЕ**

*Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и индексируемых в международных базах данных WoS и Scopus:*

1. **Шутский, Н.А.** Содержание коллагена дермы и факторов роста сыворотки крови у крыс после локального холодового повреждения / Н.А. Шутский, Л.Л. Шагров, С.Л. Кашутин, С.И. Малявская // Цитология. – 2020. – Т. 62, № 8. – С. 601-608. (Scopus, WoS, RSCI, ИФ РИНЦ – 0.622, К-1)

*Публикации в других изданиях:*

2. **Шутский, Н.А.** Динамика содержания коллагена дермы крыс после локального холодового повреждения / Н.А. Шутский, Л.Л. Шагров, С.Л. Кашутин, А.С. Аксенов, С.И. Малявская // Труды Карельского научного центра Российской академии наук. – 2019. – № 6. – С. 85-91.

3. Шагров, Л.Л. Динамика гематологических показателей крови крыс после локального холодового повреждения / Л.Л. Шагров, **Н.А. Шутский**, С.Л. Кашутин, С.И. Малявская // Труды Карельского научного центра Российской академии наук. – 2019. – № 12. – С. 86-92.

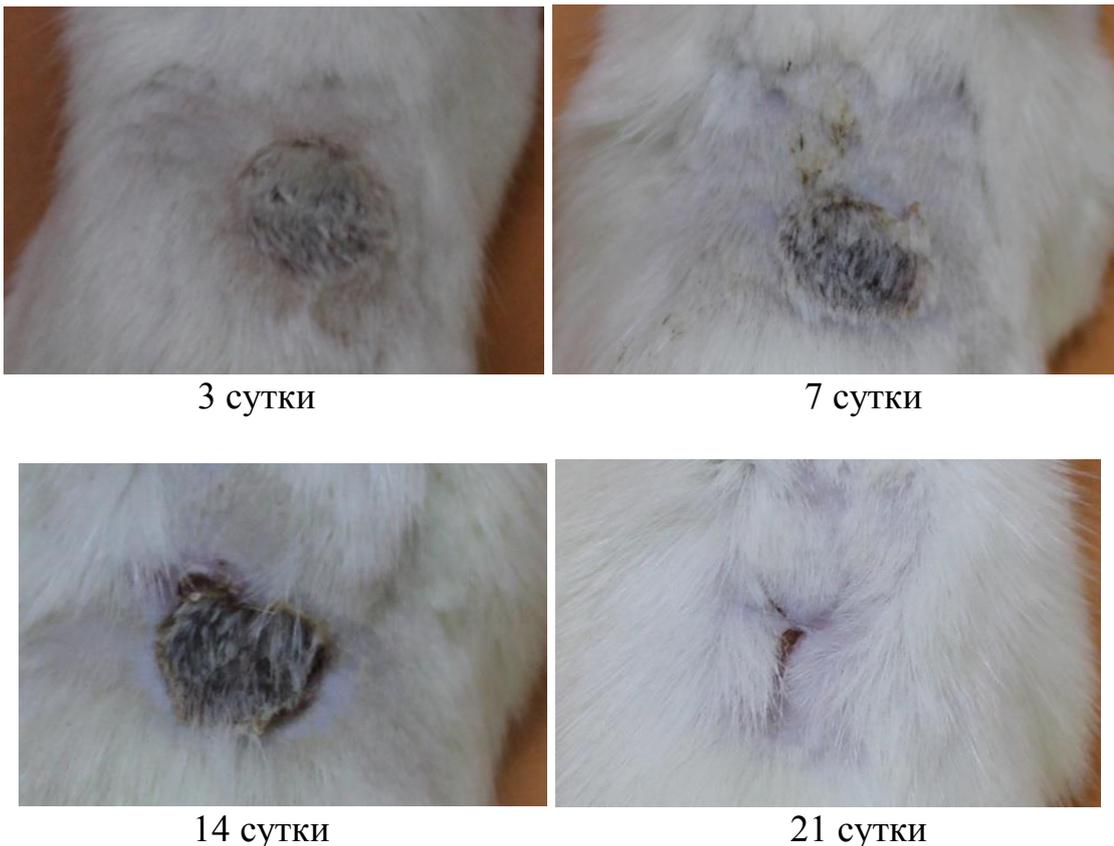
4. Об участии эозинофилов в восстановлении тканей после локальной холодовой травмы / Л.Л. Шагров, **Н.А. Шутский**, С.Л. Кашутин, В.И. Николаев, С.И. Малявская // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. – 2020. – Т. 12, № 2. – С. 71-78.

5. Изучение динамики содержания клеток в зависимости от локализации в дерме после локального холодового повреждения / **Н.А. Шутский**, С.Л. Кашутин, Л.Л. Шагров, Л.Н. Горбатова, С.И. Малявская, О.В. Калмин, И.М. Кобелев // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2021. – № 2 (58). – С. 151-159.

**ГЛАВА 4 – ИНТЕНСИВНОСТЬ ДЕГРАДАЦИИ И СИНТЕЗА  
МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ДЕРМЫ  
ПОСЛЕ ОСТРОГО ОТМОРОЖЕНИЯ У КРЫС  
НА ФОНЕ НАРУШЕНИЯ ТОЛЕРАНТНОСТИ К ГЛЮКОЗЕ**

**4.1 – Динамика заживления раневой поверхности после острого  
отморожения у крыс на фоне нарушения толерантности к глюкозе**

После подтверждения наличия нарушения толерантности к глюкозе у лабораторных животных с помощью ГТТ и на основании массы тела моделировали контактные отморожения (*рисунок 16*).



**Рисунок 16 – Процесс заживления после острого отморожения  
на фоне нарушения толерантности к глюкозе**

На 3 сутки на месте локального холодового повреждения регистрировали отечность и гиперемию. На 7 сутки эксперимента отечность и гиперемия вокруг зоны повреждения сохранялись, формировалась плотная серозная корочка. Пальпаторно определялась инфильтрация. На 14 сутки корочка полностью не отторгалась, эрозивно-язвенный дефект был окружен краснотой. Полного рубцевания к 21 суткам не происходило, т. к. все еще визуализировался язвенно-эрозивный дефект кожи.

#### **4.2 – Содержание коллагена дермы у крыс после острого отморожения на фоне нарушения толерантности к глюкозе**

На 3 сутки контактного холодового повреждения регистрировали статистически значимое снижение содержания коллагена дермы почти в 3 раза (*таблица 5*). Но затем уровень изучаемого показателя сменился увеличением в 1,5 раза и на 7 сутки достиг значения 40,51%. Увеличение данного показателя продолжилось к 14 суткам, но в период с 14 по 21 сутки наблюдения содержание коллагена дермы увеличилось всего на 3% без статистически значимого подтверждения. Таким образом, к 21 суткам после локального отморожения содержание коллагена дермы не достигло уровня соответствующего показателя в контрольной группе.

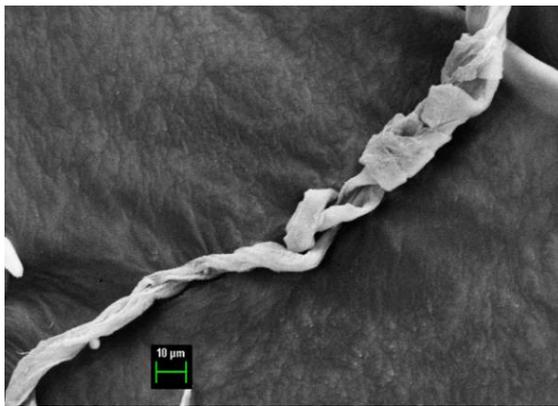
На 3 сутки после холодового воздействия снижение содержания коллагена дермы сопровождалось статистически значимым уменьшением толщины коллагеновых волокон (*рисунок 17*).

Увеличение толщины начиналось на 7 сутки и продолжилось к 14 суткам. На 21 сутки после холодового повреждения толщина коллагеновых волокон достигала 9,36 мкм и практически не отличалась от аналогичного показателя в группе контроля ( $p = 0,071$ ).

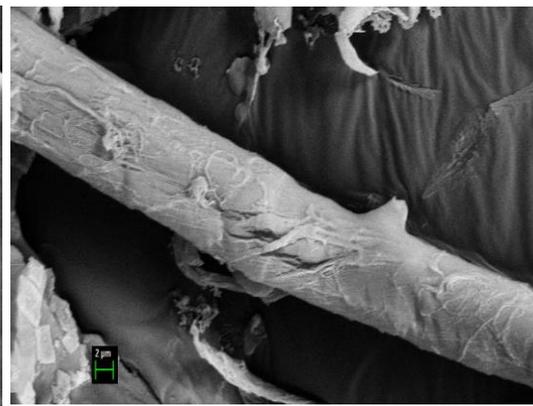
**Таблица 5 – Содержание коллагена дермы (мг и %) и толщина коллагеновых волокон в поврежденном участке дермы после острого отморожения у крыс с нарушением толерантности к глюкозе в зависимости от продолжительности эксперимента [Me (Q25; Q75)]**

Показатель	Контроль- ная группа при НТГ	Продолжительность эксперимента, сутки				Уровень статистической значимости
		3	7	14	21	
1	2	3	4	5	6	7
Масса коллагена дермы, мг	13,80 (12,60; 15,35)	5,70 (4,27; 8,08)	9,40 (9,20; 13,61)	8,75 (7,17; 14,43)	10,00 (8,90; 10,39)	2-3 Z=1,85; p=0,002* 2-4 Z=1,22; p=0,100 2-5 Z=1,23; p=0,095 2-6 Z=1,63; p=0,010* 3-4 Z=1,29; p=0,071 3-5 Z=1,16; p=0,139 3-6 Z=1,29; p=0,071 4-5 Z=1,03; p=0,236 4-6 Z=0,35; p=0,998 5-6 Z=0,78; p=0,586
Содержа- ние коллагена дермы, %	69,91 (69,05; 70,87)	26,92 (23,48; 30,80)	40,51 (38,43; 42,12)	53,22 (49,98; 56,53)	56,28 (54,23; 56,78)	2-3 Z=1,85; p=0,002* 2-4 Z=1,63; p=0,010* 2-5 Z=1,85; p=0,002* 2-6 Z=1,63; p=0,010* 3-4 Z=1,54; p=0,016* 3-5 Z=1,73; p=0,005* 3-6 Z=1,54; p=0,016* 4-5 Z=1,54; p=0,016* 4-6 Z=1,41; p=0,037* 5-6 Z=0,78; p=0,586
Толщина коллагено- вых волокон, мкм	10,26 (9,90; 10,85)	4,48 (3,43; 4,73)	5,62 (5,14; 6,10)	8,64 (7,64; 9,31)	9,36 (9,17; 9,53)	2-3 Z=1,75; p=0,004* 2-4 Z=1,48; p=0,025* 2-5 Z=1,54; p=0,018* 2-6 Z=1,29; p=0,071 3-4 Z=1,36; p=0,047* 3-5 Z=1,58; p=0,013* 3-6 Z=1,36; p=0,047* 4-5 Z=1,36; p=0,047* 4-6 Z=1,22; p=0,999 5-6 Z=0,82; p=0,509

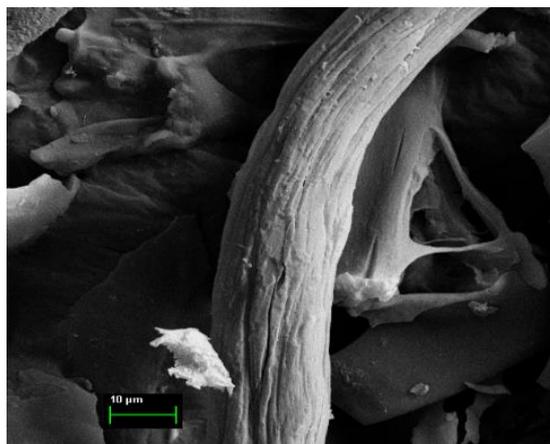
*Примечание:* НТГ – нарушение толерантности к глюкозе; \* - статистически значимые различия значений ( $p < 0,05$ ).



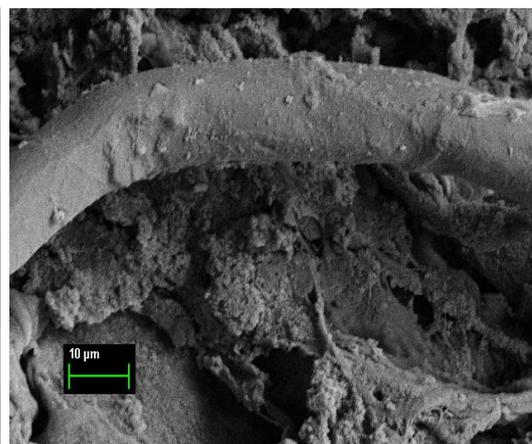
Контроль



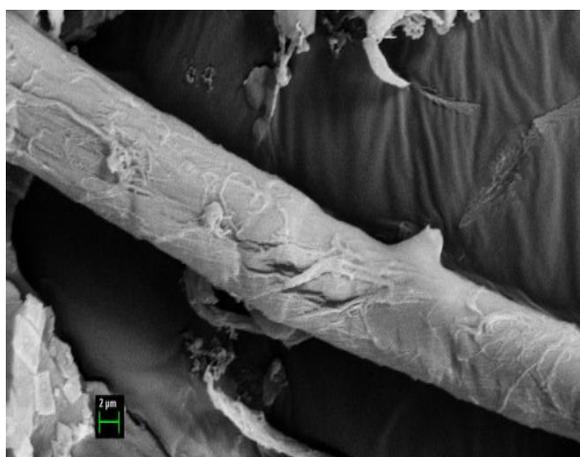
3 сутки



7 сутки



14 сутки



21 сутки

**Рисунок 17 – Электронная микроскопия коллагеновых волокон дермы поврежденного участка после острого отморожения у крыс на фоне нарушения толерантности к глюкозе**

### 4.3 – Сравнение содержания коллагена и толщины коллагеновых волокон дермы у крыс после острого отморожения

При сравнении значений в содержании коллагена (в мг и в процентном содержании) и толщины коллагеновых волокон статистически значимых различий не наблюдалось ни в контрольных группах, ни на протяжении всего периода наблюдения заживления раневой поверхности (таблица 6).

**Таблица 6 – Сравнительные данные значений по содержанию коллагена и толщины коллагеновых волокон у крыс после острого отморожения с наличием нарушения глюкозотолерантности и без него в зависимости от продолжительности эксперимента**

Показатель	Контрольные группы	Продолжительность эксперимента, сутки			
		3	7	14	21
Содержание коллагена дермы, мг	Z = 0,61; p = 0,845	Z = 1,10; p = 0,177	Z = 0,94; p = 0,329	Z = 0,55; p = 0,922	Z = 0,78; p = 0,576
Содержание коллагена дермы, %	Z = 0,61; p = 0,845	Z = 1,04; p = 0,224	Z = 0,94; p = 0,329	Z = 0,82; p = 0,503	Z = 1,12; p = 0,161
Толщина коллагеновых волокон, мкм	Z = 1,05; p = 0,216	Z = 0,88; p = 0,423	Z = 0,40; p = 0,990	Z = 1,09; p = 0,181	Z = 0,89; p = 0,400

### 4.4 – Содержание сиаловых кислот в сыворотке крови у крыс после острого отморожения на фоне нарушения толерантности к глюкозе

Нарушение толерантности к глюкозе само по себе, даже без локального острого отморожения, сопровождалось увеличением содержания сиаловых кислот в сыворотке крови (151,0 усл. ед. (138,0;180,0) против 276,5 усл. ед. (243,0; 280,8); Z = 2,10; p = 0,001) (таблицы 7 и 8). При наличии локального острого отморожения уровень сиаловых кислот в сыворотке крови еще больше возрастал на всем протяжении эксперимента (от p=0,003 до p=0,001) в случае сравнения с контрольной группой крыс, не имеющих нарушений углеводного обмена. В сравнении с контрольной группой крыс, имеющих нарушения толерантности к глюкозе, изменения на 7 сутки проявились в виде слабой тенденции к увеличению

на 7,5% ( $Z=0,82$ ;  $p=0,518$ ), с последующим снижением уже на 14 сутки на 5,4% ( $Z=0,72$ ;  $p=0,685$ ). К 21 суткам данный показатель вернулся к исходному значению.

**Таблица 7 – Содержание сиаловых кислот в сыворотке крови крыс после острого отморожения у крыс изучаемых групп в зависимости от продолжительности эксперимента [Me (Q25; Q75)]**

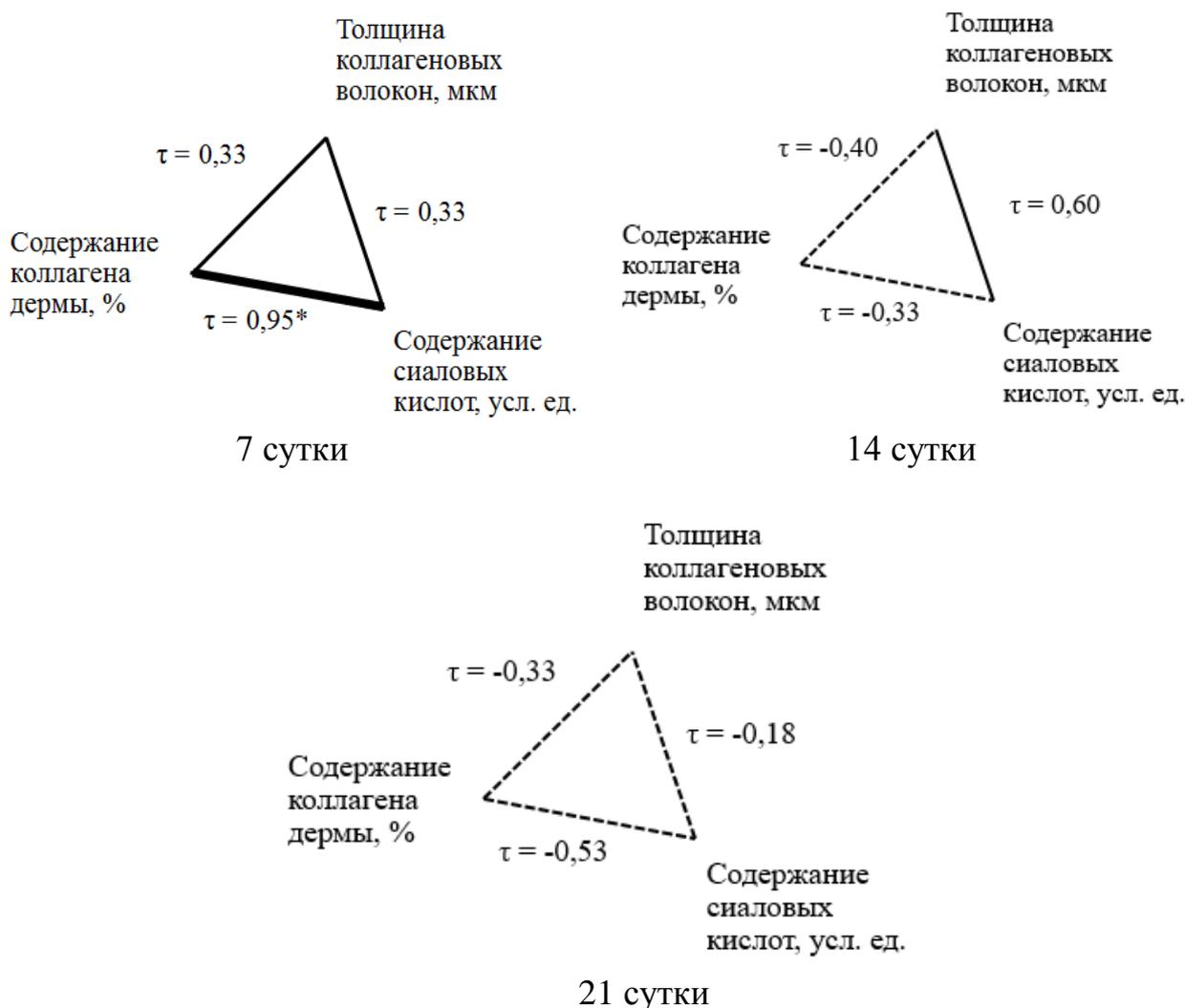
Показатель	Контрольная группа при НТГ	Продолжительность эксперимента, сутки			Уровень статистической значимости
		7	14	21	
1	2	3	4	5	6
Содержание сиаловых кислот, усл. ед.	276,5 (243,0; 280,8)	299,0 (253,0; 314,0)	283,0 (246,0; 295,0)	278,0 (274,0; 294,5)	2-3 $Z=0,82$ ; $p=0,518$ 2-4 $Z=0,77$ ; $p=0,591$ 2-5 $Z=0,74$ ; $p=0,646$ 3-4 $Z=0,72$ ; $p=0,685$ 3-5 $Z=0,63$ ; $p=0,819$ 4-5 $Z=0,77$ ; $p=0,593$

*Примечание:* НТГ – нарушение толерантности к глюкозе; \* - статистически значимые различия значений ( $p < 0,05$ ).

Корреляционный анализ изучаемых параметров (*рисунок 18*) показал сильную статистически подтвержденную корреляцию только между содержанием коллагена в дерме в поврежденной соединительной ткани и содержанием сиаловых кислот на 7 сутки после локального холодового воздействия ( $\tau = 0,95$ ;  $p = 0,002$ ). В остальных случаях регистрировали или слабые, или умеренные, или обратные связи между показателями.

Таким образом, на 3 сутки после острого отморожения происходила активная деградация соединительной ткани дермы, о чем свидетельствовали снижение процентного содержания коллагена дермы, уменьшение толщины коллагеновых волокон и тенденция к увеличению концентрации сиаловых кислот в сыворотке крови. На 7 сутки после холодового воздействия увеличивались содержание коллагена дермы и толщина коллагеновых волокон на фоне высокого содержания сиаловых кислот. С 7 по 14 сутки продолжала наблюдаться динамика увеличения содержания коллагена и толщины его волокон уже на фоне некоторого снижения концентрации сиаловых кислот в сыворотке крови. К 21 суткам уровень изучаемых параметров, кроме концентрации сиаловых кислот, в экспериментальной группе все еще не достигал значений группы контроля, что может указывать на

продолжение восстановления соединительной ткани после холодового воздействия.



**Рисунок 18 – Корреляционный анализ содержания коллагена, толщины коллагеновых волокон дермы и сиаловых кислот в сыворотке крови после острого отморожения у крыс с нарушенной толерантностью к глюкозе**

*Примечание:* прямые связи: слабая связь – линия с крупными штрихами, умеренная связь – линия средней толщины, сильная связь – толстая линия; обратная связь – линия с мелким штрихом.

#### 4.5 – Сравнение значений содержания сиаловых кислот в сыворотке крови у крыс после острого отморожения

При сравнении содержания сиаловых кислот в ходе регенераторного процесса установлено, что на каждом этапе наблюдения (на 7, 14, 21 сутки) уровни

статистически значимо различались (таблица 8). Это может свидетельствовать о разных механизмах разрушения и формирования межклеточного матрикса дермы после локального холодового воздействия в условиях нарушенной толерантности к глюкозе и без такого отклонения.

**Таблица 8 – Сравнительные данные значений содержания сиаловых кислот в сыворотке крови у крыс после острого отморожения без нарушения толерантности к глюкозе и на фоне нарушения толерантности к глюкозе в зависимости от продолжительности эксперимента**

Показатель	Контрольные группы	Продолжительность эксперимента, сутки		
		7	14	21
Содержание сиаловых кислот, усл. ед.	Z = 2,10; p = 0,001*	Z = 1,58; p = 0,013*	Z = 1,54; p = 0,016*	Z = 1,49; p = 0,023*

*Примечание:* \* - статистически значимые различия значений ( $p < 0,05$ ).

#### **4.6 – Гистологическое исследование кожи после острого отморожения у крыс на фоне нарушения толерантности к глюкозе**

В зоне холодового повреждения у крыс с нарушением глюкозотолерантности на 3 сутки эксперимента эпителиальный слой кожи также, как и в группе без НТГ, полностью разрушился. Наблюдалась полная реорганизация волокнистой структуры, разрушение волосяных фолликулов и сальных желез, а также отсутствие сосудов микроциркуляторного русла.

В целом, гистологический анализ не показал отличий в ходе регенераторного процесса в изучаемых группах крыс. К 3 суткам в повреждённом участке соединительной ткани также наблюдался некроз, эпидермис отсутствовал, дно дефекта было представлено подкожной жировой клетчаткой, где находился очаг некроза. На 7 сутки наблюдалась миграция клеток для разрушения отмирающей ткани и дальнейшего формирования рубца. К 14 суткам после моделирования повреждения на поверхности раны образовался плотный сухой струп, отслаивающийся по периферии, а также наблюдались вновь синтезированные волокна межклеточного матрикса. На 21 сутки зона повреждения покрывалась эпидермисом, однако клеточные структуры все еще обнаруживались в

грануляционной ткани. В формирующемся регенерате элементы придатков кожи, а именно волосяных фолликулов, к 21 суткам не восстанавливались, аналогично, как и в группе без нарушений углеводного обмена.

#### **4.7 – Клеточный состав дермы после острого отморожения у крыс на фоне нарушения толерантности к глюкозе**

В сосочковой дерме поврежденного участка увеличение количества клеток на единице площади наблюдалось уже на 3 сутки после локального холодового повреждения. На 7 сутки эксперимента увеличение количества клеток в сосочковой дерме достигло максимальных значений у крыс с отклонениями толерантности к глюкозе, а к 14 суткам отмечалось снижение количества клеток на единицу площади. Дальнейшее снижение показателя продолжилось.

Таким образом, к 21 суткам после локального острого отморожения количество клеток в сосочковой дерме хоть и снизилось, но все равно отличалось от контроля у крыс на фоне нарушений толерантности к глюкозе ( $p = 0,010$ ).

В сетчатой дерме у крыс с отклонениями толерантности к глюкозе количество клеток статистически значимо увеличилось. Затем регистрировали только снижение: на 14 сутки и на 21 сутки, причем значения так и не достигли исходных.

На границе сетчатой дермы и гиподермы статистически значимое увеличение количества клеток на единицу площади наблюдалось на 7 сутки. После этого показатель снижался, также не достигнув исходных значений контроля к 21 суткам.

Сравнение содержания клеток в различных слоях дермы представлено в *таблице 9*. У крыс без нарушения углеводного обмена в поврежденном участке значительно большее количество клеток на единицу площади установлено на границе сетчатой дермы и гиподермы, чем в том же участке сосочковой и сетчатой зоны дермы на протяжении всего периода эксперимента. Подобные результаты наблюдались и в зонах дермы, находящихся в непосредственной близости от зоны повреждения.

**Таблица 9 – Количество клеток на единице площади в поврежденном и неповрежденном участках кожи в зависимости от локализации в дерме после острого отморожения на фоне нарушения толерантности к глюкозе [Me, (Q25; Q75)]**

Продолжительность эксперимента, сутки	Сосочковая дерма		Граница сетчатой дермы и гиподермы		Уровень статистической значимости
	поврежденный участок кожи	периферия	поврежденный участок кожи	периферия	
1	2	3	4	5	6
3	1,0 (1,0;2,0)	1,0 (1,0;1,0)	3,0 (1,0;3,0)	1,0 (1,0;3,0)	2-3 W=-0,557; p=0,564 2-4 W=-1,807; p=0,071 3-5 W=-1,069; p=0,285 4-5 W=-0,921; p=0,357
7	4,0 (2,75;4,5)	1,5 (1,0;2,0)	7,5 (6,5;8,0)	3,0 (2,75;3,25)	2-3 W=-2,214; p=0,001* 2-4 W=-2,226; p=0,026* 3-5 W=-2,264; p=0,024* 4-5 W=-2,232; p=0,026*
14	3,5 (1,75;4,5)	1,5 (1,0;3,0)	3,5 (2,0;5,5)	2,0 (1,0;2,25)	2-3 W=-1,382; p=0,167 2-4 W=-0,707; p=0,480 3-5 W=-0,001; p=0,999 4-5 W=-2,032; p=0,042*
21	3,0 (0,0;3,0)	0,0 (0,0;1,0)	3,0 (2,0;4,0)	1,0 (0,0;1,0)	2-3 W=-2,060; p=0,039* 2-4 W=-1,730; p=0,084 3-5 W=-1,890; p=0,059 4-5 W=-2,414; p=0,016*

*Примечание:* \* - статистически значимые различия значений ( $p < 0,05$ ).

В условиях нарушения толерантности к глюкозе максимальное скопление клеток, представленных фибробластами и лимфогистиоцитарными элементами, учитывая ранние исследования [14], отмечалось также на границе сетчатой дермы и гиподермы, но только на 7 и 21 сутки. На 3 и 14 сутки статистически значимых различий в содержании клеток на единицу площади между изучаемыми зонами дермы не регистрировалось.

Таким образом, после холодового повреждения клетки в основном концентрировались на границе сетчатой дермы и гиподермы, в меньшей степени – в сетчатой дерме уже на 3 сутки.

На 3 сутки после холодового повреждения клетки мигрировали преимущественно в зону воздействия на границу сетчатой дермы и гиподермы. С учетом ранее полученных нами данных относительно увеличения массы коллагена и его содержания в дерме после 7 суток, можно полагать, что для полноценной

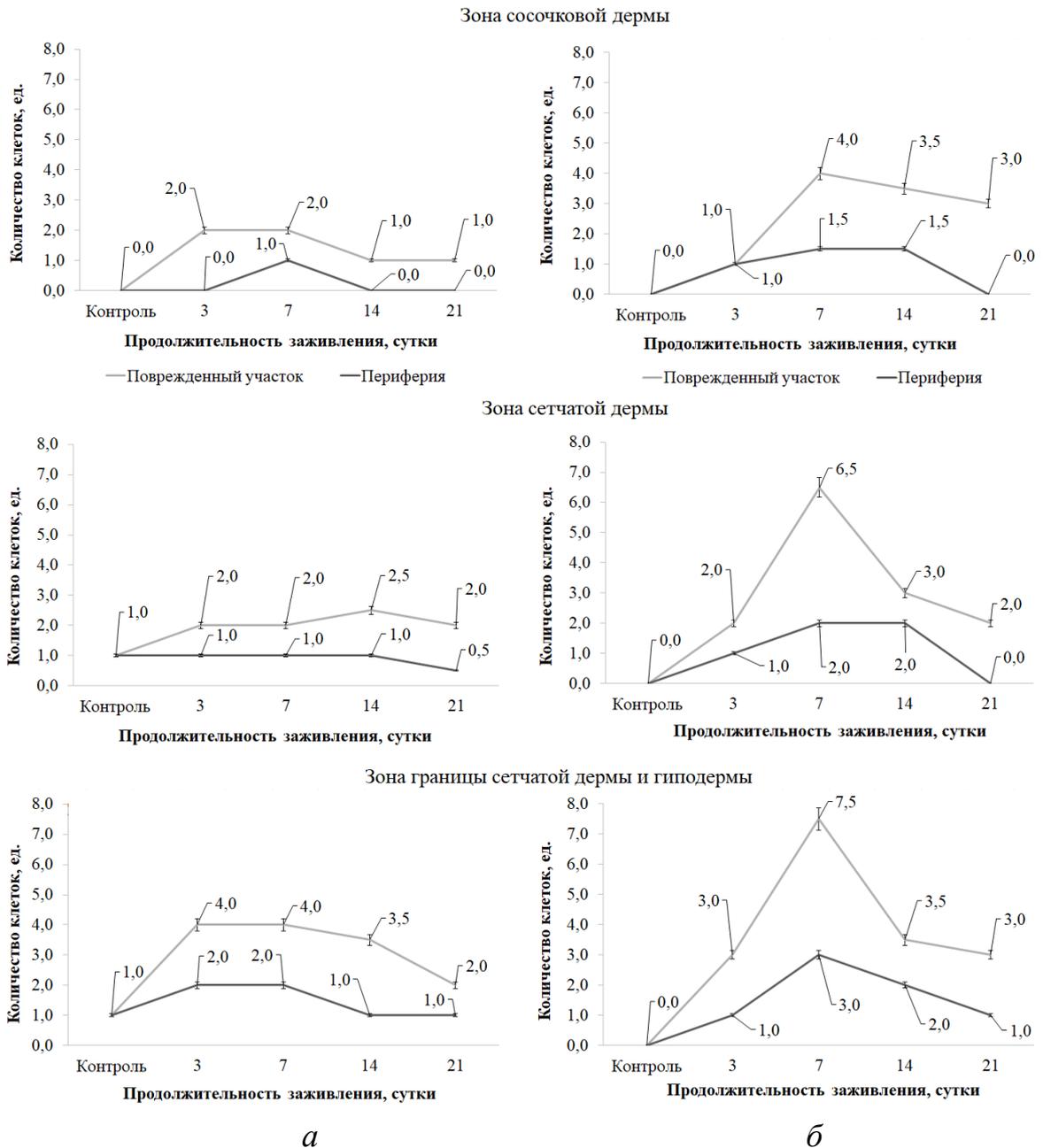
продукции коллагена после миграции клеткам требуется около 4 суток (с 3 по 7 сутки). На основании того, что содержание клеток на единицу площади больше на границе сетчатой дермы и гиподермы, можно предположить, что синтез коллагена происходит в большей степени именно здесь, чем в сосочковой или сетчатой дерме.

После 7 суток количество клеток на единицу площади на границе сетчатой дермы и гиподермы статистически значимо снижалось, тогда как синтез коллагена продолжался вплоть до 21 суток. Вполне вероятно, что с 7 по 21 сутки большее количество коллагена продуцировалось меньшим количеством клеток.

Таким образом, на 3-7 сутки после локального холодового повреждения увеличение клеточного состава в зоне поврежденного и неповрежденного участков кожи происходило преимущественно на границе сетчатой дермы и гиподермы. После 7 суток количество клеток на единицу площади на границе сетчатой дермы и гиподермы статистически значимо снижалось, тогда как синтез коллагена продолжался вплоть до 21 суток.

#### **4.8 – Сравнение значений клеточного состава дермы у крыс после острого отморожения**

После холодового воздействия в поврежденном участке максимальное содержание клеток во всех изучаемых зонах дермы (в сосочковой и сетчатой, а также на границе сетчатой дермы и гиподермы) при нарушении толерантности к глюкозе наблюдалось позднее – на 7 сутки, тогда как без нарушения – уже на 3 сутки (*рисунок 19*). Учитывая, что количество клеток на единицу площади в сосочковой и сетчатой зонах, а также на границе сетчатой дермы и гиподермы у крыс с нарушением толерантности к глюкозе статистически значимо больше, чем у крыс без него, можно полагать, что в условиях метаболических отклонений пик миграционного процесса наступает позже при большем количестве клеток, вовлеченных в миграцию.



**Рисунок 19 – Динамика медиан количества клеток дермы**

*Примечание:* после острого отморожения у крыс без нарушения толерантности к глюкозе (а) и на фоне нарушения толерантности к глюкозе (б).

Исследование показало, что у крыс изучаемых групп в сосочковой и сетчатой дерме, расположенной на периферии участка повреждения, количество клеток на единицу площади практически не отличалось от контрольных данных на всем протяжении наблюдения в постхолодовом периоде. Напротив, на границе сетчатой дермы и гиподермы регистрировалось статистически значимое увеличение концентрации клеток на 3 сутки у крыс без нарушений углеводного обмена и на 7

сутки – в группе крыс с нарушением толерантности к глюкозе. Вполне вероятно, что в процесс регенерации в участке повреждения вовлекались зоны сосочковой и сетчатой дермы, и особенно зона сетчатой дермы на границе с гиподермой, тогда как на периферии поврежденного участка – преимущественно зона, расположенная на границе сетчатой дермы и гиподермы. Учитывая, что к концу эксперимента на периферии поврежденного участка наблюдалось возвращение количества клеток к значениям группы контроля, чего не происходило в центре поврежденного участка, можно полагать, что именно граница сетчатой дермы и гиподермы очага повреждения – основное место регенеративных процессов в постхолодовом периоде. Факт увеличения клеток на периферии поврежденного участка у крыс без нарушений на 3 сутки и у крыс с отклонениями толерантности к глюкозе на 7 сутки также может свидетельствовать в пользу предположения, что в условиях метаболических нарушений пик миграционного процесса наступает позже.

Следовательно, после локального холодового воздействия регенеративные изменения связаны с концентрацией клеток в зоне, находящейся на границе сетчатой дермы и гиподермы поврежденного участка, при этом характерной особенностью регенерации раневой поверхности у крыс с нарушением толерантности к глюкозе является более позднее наступление пика миграционного процесса и большее количество клеток, вовлеченных в миграцию.

В сосочковой дерме перифокальной зоны у крыс без нарушения толерантности к глюкозе концентрация клеток не претерпела каких-либо значимых изменений на протяжении всего постхолодового периода. У крыс с нарушенным углеводным обменом регистрировалась только тенденция к увеличению данного показателя на 3, 7 и 14 сутки. К 21 суткам значение содержания клеток на единице площади уже не отличалось от контроля ( $p = 1,000$ ).

В сетчатой дерме у крыс без нарушения толерантности к глюкозе также не зафиксировано статистически значимых изменений в содержании клеток на единицу площади. На фоне нарушения глюкозотолерантности в данной зоне регистрировалось увеличение концентрации клеток на 7 сутки и 14 сутки. На 21

сутки наблюдалось снижение данного показателя, что привело к отсутствию статистически значимого различия с исходными данными.

На границе сетчатой дермы и гиподермы увеличение содержания клеток на единицу площади наблюдалось на 3 сутки после холодового повреждения у крыс без нарушений и на 7 сутки у крыс с нарушением толерантности к глюкозе. На 21 сутки наблюдалось возвращение количества клеток к значениям до повреждения.

#### **4.9 – Содержание инсулиноподобного фактора роста в сыворотке крови после острого отморожения у крыс на фоне нарушения толерантности к глюкозе**

Нарушение толерантности к глюкозе само по себе, даже без локального острого отморожения, сопровождалось увеличением содержания IGF-1 в сыворотке крови (1304,0 нг/мл (1203,0; 1454,0) против 600,0 нг/мл (232,0; 1080,0);  $Z = 1,96$ ;  $p = 0,001$ ) (таблицы 10 и 11).

#### **Таблица 10 – Содержание IGF-1 в сыворотке крови крыс после острого отморожения у крыс на фоне нарушения толерантности к [Me (Q25; Q75)]**

Показатель	Контрольная группа при НТГ	Продолжительность эксперимента, сутки				Уровень статистической значимости
		3	7	14	21	
1	2	3	4	5	6	7
IGF-1, нг/мл	1304,0 (1203,0;1454,0)	1123,0 (979,0;1409,0)	693,0 (607,0;843,0)	1164,0 (1069,0;1237,0)	1086,0 (893,0;1394,0)	2-3 $Z=1,04$ ; $p=0,219$ 2-4 $Z=1,63$ ; $p=0,010^*$ 2-5 $Z=0,92$ ; $p=0,358$ 2-6 $Z=1,22$ ; $p=0,100$ 3-4 $Z=1,26$ ; $p=0,082$ 3-5 $Z=0,66$ ; $p=0,775$ 3-6 $Z=0,39$ ; $p=0,998$ 4-5 $Z=1,65$ ; $p=0,009^*$ 4-6 $Z=1,36$ ; $p=0,048^*$ 5-6 $Z=0,77$ ; $p=0,593$

*Примечание:* IGF-1 - инсулиноподобный фактор роста; НТГ – нарушение толерантности к глюкозе; \* - статистически значимые различия значений ( $p < 0,05$ )

При наличии локального острого отморожения уровень IGF-1 в сыворотке крови возрастал на 54% на 3 сутки, на 48% на 14 сутки и на 44% на 21 сутки при сравнении с контрольной группой крыс, не имеющих нарушений углеводного обмена (таблица 10). В сравнении с контрольной группой крыс, имеющих нарушения толерантности к глюкозе, изменения проявились в виде снижения концентрации данного показателя на протяжении всего периода эксперимента,

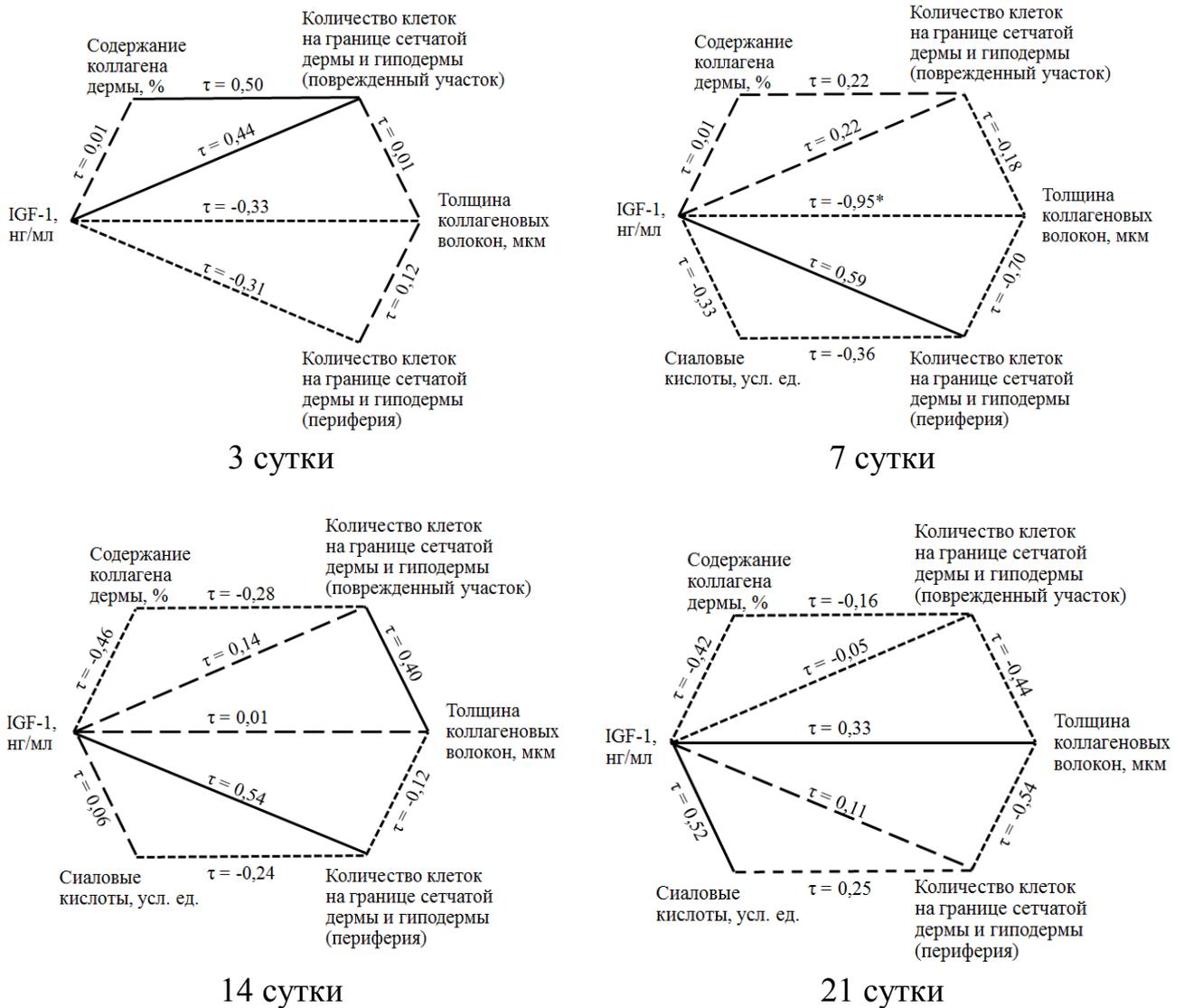
особенно на 7 сутки ( $Z=1,63$ ;  $p=0,010$ ). К 21 суткам данный показатель не вернулся к исходному значению.

**Таблица 11 – Сравнительные данные значений содержания IGF-1 у крыс после острого отморожения без нарушения толерантности к глюкозе и на его фоне в зависимости от продолжительности эксперимента**

Показатель	Контрольные группы	Продолжительность эксперимента, сутки			
		3	7	14	21
IGF-1, нг/мл	$Z = 1,96$ ; $p = 0,001^*$	$Z = 1,46$ ; $p = 0,028^*$	$Z = 1,20$ ; $p = 0,108$	$Z = 1,48$ ; $p = 0,024^*$	$Z = 2,20$ ; $p = 0,001^*$

*Примечание:* IGF-1 - инсулиноподобный фактор роста; \* - статистически значимые различия значений ( $p < 0,05$ )

Корреляционный анализ показал обратную, статистически достоверную связь только между содержанием IGF-1 и толщиной коллагеновых волокон на 7 сутки ( $\tau = -0,95$ ;  $p = 0,001$ ), отраженной на *рисунке 20*.



**Рисунок 20 – Корреляционный анализ содержания инсулиноподобного фактора роста (IGF-1), содержания коллагена, толщины коллагеновых волокон, количества клеток дермы и сialовых кислот в сыворотке крови после острого отморожения у крыс на фоне нарушения толерантности к глюкозе**

*Примечание:* прямые связи: слабая связь – линия с крупными штрихами, умеренная связь – линия средней толщины, сильная связь – толстая линия; обратная связь – линия с мелким штрихом; \* $p < 0,05$ .

#### 4.10 – Сравнение значений инсулиноподобного фактора роста в сыворотке крови после острого отморожения

Динамика концентрации IGF-1 в сыворотки крови наблюдалась различная. Различия значений инсулиноподобного фактора роста зафиксированы, как отмечалось ранее, в контрольной группе ( $Z = 1,96$ ;  $p = 0,001$ ) и на 3 сутки ( $Z = 1,46$ ;

$p = 0,028$ ) после локального отморожения у крыс с нарушением толерантности к глюкозе и без отклонения (таблица 11). В группе крыс с НТГ отмечалось увеличение данного показателя, в то время как у крыс без углеводных отклонений, наоборот, концентрация снижалась. К 7 суткам статистически значимых различий между исследуемыми показателями у крыс обеих групп не выявлено ( $p = 0,108$ ), но у группы с НТГ увеличение сменилось снижением, а в группе без НТГ – снижение сменилось повышением. Однако на 14 и на 21 сутки значения снова различались ( $p = 0,024$  и  $p = 0,001$ , соответственно), хотя в обеих группах наблюдался значительный подъем в концентрации IGF-1. С 14 до 21 сутки ситуация наблюдалась идентичная, за исключением того, что в группе с НТГ концентрация детектировалась практически в 2 раза ниже. Данное наблюдение указывает на разные механизмы регенерации в зависимости от наличия нарушения углеводного обмена.

Таким образом, динамика концентрации инсулиноподобного фактора роста в сыворотке крови зависит от наличия или отсутствия нарушения толерантности к глюкозе.

#### **4.11 – Резюме**

В группе крыс с нарушением толерантности к глюкозе деградация коллагена наступала на 3 сутки, о чем свидетельствовало снижение его массы, содержания в дерме и толщины коллагеновых волокон, что не являлось отличительной чертой от группы без НТГ.

Деградация межучточного вещества также происходила уже на 3 сутки, что подтверждалось увеличением концентрации сиаловых кислот в сыворотке крови и находилось на высоком уровне до конца периода наблюдения, так и не вернувшись к значениям контрольной группы.

После 3 суток начиналась регенерация коллагена, которая характеризовалась одним пиком: с 7 по 14 сутки, когда активно синтезировался коллаген.

В сосочковой дерме поврежденного участка увеличение количества клеток на единице площади наблюдалось уже на 3 сутки после локального холодового

повреждения на фоне НТГ. На 7 сутки эксперимента увеличение количества клеток в сосочковой дерме достигло максимальных значений у крыс с отклонениями толерантности к глюкозе, но уже к 14-21 суткам отмечалось снижение данного показателя.

Таким образом, к 21 суткам после острого отморожения количество клеток в сосочковой дерме хоть и снизилось, но все равно отличалось от контроля у крыс на фоне нарушений толерантности к глюкозе.

В сетчатой дерме у крыс с отклонениями толерантности к глюкозе количество клеток статистически значимо увеличилось на 7 сутки. Затем регистрировалось только снижение: на 14 и 21 сутки.

На границе сетчатой дермы и гиподермы статистически значимое увеличение количества клеток на единицу площади наблюдалось на 7 сутки. После этого показатель снижался и к 21 суткам.

У крыс без нарушений углеводного обмена в поврежденном участке значительно большее количество клеток на единицу площади установлено на границе сетчатой дермы и гиподермы, чем в том же участке сосочковой и сетчатой зоны дермы на протяжении всего периода эксперимента. Подобные результаты наблюдались и в зонах дермы, находящихся в непосредственной близости от зоны повреждения.

В условиях нарушения толерантности к глюкозе максимальное скопление клеток (лимфоцитов, гистиоцитов) отмечалось также на границе сетчатой дермы и гиподермы, но только на 7 и 21 сутки. На 3 и 14 сутки статистически значимых различий в содержании клеток на единицу площади между изучаемыми зонами дермы не регистрировалось.

В сыворотке крови не наблюдалось динамики в концентрации IGF-1 в первые 3 суток после локального холодового воздействия на фоне НТГ. На 7 сутки была отмечена тенденция к снижению, а затем (на 14 сутки) наблюдалось резкое увеличение изучаемого показателя.

Таким образом, наступление регенерации происходило с 3 по 7 сутки после локального холодового повреждения без связи с нарушением толерантности к

глюкозе. К 21 суткам у группы крыс с НТГ заживление продолжалось, о чем свидетельствовало наличие эрозивно-язвенных дефектов и гиперемии вокруг них. В то же время, в группе крыс без нарушения углеводного обмена регенеративный процесс завершался к 21 суткам. Также группа с НТГ характеризовалась более низкой интенсивностью синтеза коллагена дермы, который проявлялся одним пиком увеличения его содержания с 7 по 14 сутки на 12,7 %, что отличало регенерацию в условиях отсутствия нарушений углеводного обмена, при которой интенсивное увеличение содержания коллагена происходило с 3 по 7 сутки на 9,4% и с 14 по 21 сутки на 16,4%. Изменение концентрации инсулиноподобного фактора роста в сыворотке крови у крыс с нарушением глюкозотолерантности заключалось в увеличении на 3 сутки почти в 2 раза, затем снижением на 7 сутки в 1,6 раза. В отсутствии нарушения толерантности к глюкозе вначале наблюдалось снижение показателя в 2 раза (на 3 сутки), а затем сменялось резким увеличением почти в 6 раз.

#### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ В 4 ГЛАВЕ**

*Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и индексируемых в международных базах данных WoS и Scopus:*

1. Содержание клеток в зонах дермы крыс в норме и на фоне метаболического синдрома при восстановлении после холодовой травмы / **Н.А. Шутский**, С.Л. Кашутин, Л.Л. Шагров, С.И. Малявская, Н.С. Холопов // Журнал медико-биологических исследований. – 2022. – Т. 10, № 2. – С. 87-99. (ВАК, ИФ РИНЦ – 0.521, К-2)

2. **Шутский, Н.А.** Интенсивность деградации и синтеза межклеточного матрикса дермы у крыс после локальной холодовой травмы на фоне метаболического синдрома / Н.А. Шутский, Л.Н. Горбатова, С.Л. Кашутин, Н.С. Холопов, Л.Л. Шагров, А.Л. Зашихин // Цитология. – 2023. – Т. 65. – № 5. – С. 499-506. (Scopus, WoS, RSCI, ИФ РИНЦ – 0.481, К-1)

*Публикации в других изданиях:*

3. Изучение динамики содержания клеток в зависимости от локализации в дерме после локального холодового повреждения у крыс с метаболическим синдромом / **Н.А. Шутский**, С.Л. Кашутин, Л.Л. Шагров, Л.Н. Горбатова, С.И. Малявская, О.В. Калмин // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2021. – № 3 (59). – С. 167-176.

4. Изучение динамики содержания нейтрофильных лейкоцитов красного костного мозга у крыс после холодовой травмы на фоне метаболического синдрома / И.М. Кобелев, **Н.А. Шутский**, Н.С. Холопов, Н.Л. Шапчиц, С.Л. Кашутин // Бюллетень Северного государственного медицинского университета. – 2022. – № 2 (48). – С. 150-152.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что на 3 сутки эксперимента в зоне повреждения эпителиальный слой кожи полностью разрушился, происходили воспалительные процессы в дерме (гиперемия, отек), что сопровождалось полной реорганизацией волокнистой структуры, разрушением волосяных фолликулов, сальных и потовых желез. Учитывая высокие концентрации сиаловых кислот в сыворотке крови в условиях нарушения толерантности к глюкозе (НТГ), можно предполагать, что на фоне нарушения углеводного обмена деградация соединительной ткани происходит более интенсивно, что отражается на более длительной регенерации.

Процесс ремоделирования межклеточного матрикса дермы на 21 сутки после острого отморожения на фоне нарушения толерантности к глюкозе продолжался, о чем свидетельствовало наличие эрозивно-язвенных дефектов в стадии рубцевания и гиперемии вокруг их. Напротив, при холодовом повреждении без нарушения углеводного обмена к 21 суткам ремодуляция заканчивалась формированием рубца.

Разработанные и впервые примененные способы количественного определения коллагена дермы (патент РФ № 2689337) и выделения коллагеновых волокон дермы (патент РФ № 2764514) позволили провести количественный и качественный анализ содержания коллагена в дерме, формируемого в ходе восстановления после локального холодового повреждения, а также позволили судить о проявлении активности фибробластов к синтезу основного белка межклеточного матрикса.

Коллаген как основной белок межклеточного матрикса дермы состоит из трех полипептидных цепей, в каждой из которых примерно 1000 аминокислотных остатков, где доминирует глицин (33%). Кроме глицина, в коллагене много аланина, пролина, оксипролина и оксилизина. Два последних специфичны для

коллагена. В физиологических условиях коллаген постоянно синтезируется клетками соединительной ткани (фибробластами, остеобластами, хондробластами и др.) и разрушается ферментативно, но интенсивность его обмена относительно низкая. Период полураспада разных типов коллагена колеблется от нескольких дней до года. Деградация коллагеновых волокон в норме проходит в несколько этапов. Сначала происходит расщепление молекул коллагена под воздействием неспецифических и специфических протеиназ, а также матриксных металлопротеиназ – ММП-1, -8, -13, -14, -18. В последующем деградация коллагена продолжается внутри- и внеклеточными путями. Трехцепочечные фрагменты денатурированного коллагена подвергаются протеолизу лизосомальными протеазами до олигопептидов [28].

В некоторых ситуациях синтез коллагена заметно увеличивается. Избыточный синтез коллагена и накопление коллагеновых волокон происходит в результате нарушений в системе синтеза/деградации коллагена. Такой дисбаланс приводит к фиброзу органа – разрастанию волокнистой соединительной ткани, а в некоторых случаях – к замене рыхлой волокнистой соединительной ткани на плотную. При репаративном (заместительном) фиброзе преобладает пролиферация фибробластов, индуцированная воспалением, а нарастание массы коллагена является следствием увеличения числа коллагенпродуцирующих клеток. Для фиброзной ткани характерно более плотное, но неупорядоченное расположение коллагеновых волокон [30].

В соответствии с полученными данными, на 3 сутки после холодового повреждения регистрировали статистически значимое снижение содержания коллагена по отношению к массе биоптата, что согласуется с предшествующими исследованиями [13]. Заметная деградация коллагена дермы сопровождалась статистически значимым снижением толщины коллагеновых волокон. На основании статистически значимого увеличения содержания коллагена в дерме с 3 по 7 сутки, можно полагать о начале репаративных процессов именно в этот период. Таким образом, скопления фибробластов в очаге локального холодового повреждения на 7 сутки являются функционально активными в направлении

синтеза волокнистых структур соединительной ткани. Увеличение толщины коллагеновых волокон дермы начиналось на 7 сутки и продолжилось до конца периода наблюдения. Статистически значимое ускорение синтеза изучаемого белка вновь возобновилось с 14 по 21 сутки, что отразилось на увеличении его содержания в дерме и на толщине волокон. Содержание коллагена к 21 суткам так и не достигло уровня интактной группы, как и показатель толщины волокон, который на всем протяжении наблюдения статистически значимо различался с контрольными значениями, что также согласуется с выводами, сделанными ранее [14, 17].

Увеличение содержания коллагена в дерме и толщины волокон происходило с 3 по 7 и с 14 по 21 сутки, что может указывать на существование двух пиков регенерации коллагена дермы после холодового повреждения именно в эти периоды. Отсутствие статистически значимых различий в содержании коллагена между группой контроля и опытной группой на 21 сутки может свидетельствовать, что изучаемые параметры одинаковы, что позволяет полагать о восстановлении массы коллагена дермы к 21 суткам.

Известно, что проколлаген синтезируется в фибробластах в виде 3-х цепочечных спиралей, поступающих в межклеточный матрикс. Там, преобразовываясь в тропоколлаген, они формируют фибриллы, из которых в дальнейшем создаются коллагеновые волокна [23]. Как показали результаты настоящего исследования, увеличение толщины коллагеновых волокон происходило к 7 суткам после локального холодового воздействия и продолжалось до окончания эксперимента. Таким образом, укрупнение коллагеновых волокон может свидетельствовать, с одной стороны, о нарастающей синтетической активности фибробластов дермы, а с другой – об активности процессов пространственной организации волокон из фибрилл тропоколлагена в матриксе дермы. Наряду с увеличением толщины коллагеновых волокон увеличивалось содержание коллагена. Естественно полагать, что данная зависимость прямая и очевидная. Обращает внимание тот факт, что нарастание содержания коллагена

имеет 2 пика, тогда как толщина волокон увеличивается прямолинейно и происходит без пиковых значений.

Одним из компонентов межклеточного матрикса дермы являются сиаловые кислоты, которые высвобождаются в процессе разрушения МКМ и, следовательно, их содержание в сыворотке крови повышается. Однако, нарушение толерантности к глюкозе само по себе, даже без локального острого отморожения, сопровождалось увеличением содержания сиаловых кислот в сыворотке крови (151,0 усл. ед. (138,0; 180,0)).

В соответствии с полученными результатами исследования, в условиях НТГ на 3 сутки после локального холодового воздействия уровень сиаловых кислот достиг пикового значения – 299,0 усл. ед. (253,0; 314,0). В последующие сутки наблюдения концентрация сиаловых кислот снижалась до 278,0 усл. ед. (274,0; 294,5) к 21 суткам, но все еще превышала значение в контрольной группе.

При отсутствии нарушений со стороны углеводного обмена резкое падение концентрации сиаловых кислот на 3 сутки после локального холодового воздействия сменилось увеличением на 7 и 14 сутки, а затем вновь снижением.

Следовательно, динамика содержания сиаловых кислот в двух экспериментальных группах различна. Более низкий уровень сиаловых кислот, чем в контрольной группе на 21 сутки эксперимента может указывать на преобладание процессов синтеза межклеточного матрикса, проявляющихся полностью готовым рубцом. На фоне образующегося матрикса на 21 сутки после холодового воздействия в условиях НТГ продолжалось разрушение межклеточного вещества, о чем свидетельствовали высокие значения сиаловых кислот в сыворотке крови, что, по-видимому, объясняет отсутствие полностью сформированного регенерата к 21 суткам.

Таким образом, в течение первых 3 суток после холодового воздействия без нарушения толерантности к глюкозе наблюдалась деградация межклеточного матрикса, затем два пика синтеза коллагена с 3 по 7 и с 14 по 21 сутки. В связи с этим возникает вопрос: «а где локализуются в дерме центры синтеза коллагеновых волокон?». Как известно, дерма представляет собой два слоя – сосочковый и

сетчатый. В норме в сосочковом слое локализуются фибробласты, синтезирующие и ремоделирующие межклеточный матрикс дермы. Структура межклеточного матрикса оказывает значительное влияние на функции фибробластов. Продуцируя сигнальные молекулы, влияющие на проницаемость сосудистых стенок и метаболизм, они осуществляют трофическую функцию. Дермальные фибробласты активно участвуют в ангиогенезе, продуцируя множество проангиогенных факторов, которые, в свою очередь, индуцируют дифференцировку и миграцию эндотелиальных клеток, способствуя образованию и стабилизации сосудов [24]. В то же время, в ходе воспроизведения экспериментальной модели локального холодового воздействия 3 степени в патологический процесс вовлекаются все слои дермы [14, 25]. Ответ на поставленный вопрос позволит в последующем обосновать точки приложения терапевтических мероприятий при лечении данной хирургической патологии, направленных на активизацию регенеративного процесса, с целью ускорения реабилитационного периода и исключения стойкой нетрудоспособности.

В соответствии с полученными данными, на 3 сутки после холодового повреждения в зоне поражения регистрировали увеличение количества клеток на единице площади во всех зонах дермы, особенно на границе сетчатой дермы и гиподермы. Данная ситуация сохранялась до 7 суток, но к 14 суткам после поражения наметилась слабая тенденция к снижению количества клеток в сосочковой дерме и на границе сетчатой дермы и гиподермы. К 21 суткам регистрировали статистически значимое снижение количества клеток в сосочковой дерме и на границе сетчатой дермы и гиподермы.

В неповрежденной коже, находящейся в непосредственной близости от очага повреждения, статистически значимых изменений в содержании клеток в сосочковой и сетчатой дерме после холодового воздействия на протяжении всего периода наблюдения не регистрировали. Было отмечено лишь статистически значимое увеличение количества клеток на единице площади на границе сетчатой дермы и гиподермы на 3 сутки после холодового повреждения. После 14 суток наметилась слабая тенденция к снижению.

Следовательно, один из вероятных центров регенерации в дерме может быть расположен в неповрежденной коже, находящейся в непосредственной близости от очага поражения на границе сетчатой дермы и гиподермы. Также, основываясь на полученных результатах, можно заключить, что в очаге повреждения на границе сетчатой дермы и гиподермы содержание клеток значительно больше, чем в сосочковой и сетчатой дерме на протяжении всего периода эксперимента. Учитывая вышесказанное, вторым центром регенерации в дерме может являться область на границе сетчатой дермы и гиподермы, где была воспроизведена модель локального холодового воздействия.

Таким образом, относительно увеличения массы коллагена, его содержания в дерме и утолщения волокон после 7 суток, можно полагать, что для полноценной продукции коллагена после миграции клеткам требуется около четырех суток (с 3 по 7 сутки). На основании того, что содержание клеток больше на границе сетчатой дермы и гиподермы, можно предположить, что синтез и формирование коллагена происходит в большей степени именно здесь, нежели в сосочковой или сетчатой дерме. После 7 суток количество клеток на единицу площади на границе сетчатой дермы и гиподермы статистически значимо снижалось, тогда, как синтез коллагена продолжался вплоть до 21 суток. Вполне вероятно, что с 7 по 21 сутки большее количество коллагена продуцировалось меньшим количеством клеток.

Ключевую роль в регуляции процессов восстановления тканей после повреждения играют биологически активные молекулы: цитокины и факторы роста. Активация и оптимальное использование эндогенных биоактивных молекул является важнейшей задачей регенеративной медицины. Одним из возможных источников факторов роста в организме при патологических процессах может быть фракция тромбоцитов или продукты на их основе [16, 107, 118].

Инсулиноподобный фактор роста (IGF-1) представляет собой полипептид, гомология которого напоминает проинсулин. Биодоступность и последующая активность IGF-1 регулируются связывающими белками, которые обычно конкурируют с ним за его рецепторы. Инсулиноподобный фактор роста

синтезируется большинством тканей, и гомеостаз IGF-1, по всей видимости, оказывает как системные, так и паракринные эффекты [16].

В настоящем исследовании тенденцией анализируемого фактора роста в первые 3 суток являлось снижение концентрации в сыворотке одновременно со снижением содержания коллагена и толщины его волокон дермы. После 3 суток содержание их начинало увеличиваться. Уровень IGF-1 в сыворотке достиг пикового значения на 14 сутки и сохранялся до 21 суток. Это может свидетельствовать об усилении процессов пролиферации и активации биосинтетических функций клеток дермы в зоне локального холодового повреждения именно в эти сутки после локального холодового воздействия [105, 111].

Известно, что метаболические или гормональные отклонения на основе инсулинорезистентности и компенсаторной гиперинсулинемии, способствующие развитию сердечно-сосудистых заболеваний, нарушению микроциркуляции и энергетического обмена, являются отягчающими факторами, усиливающими последствия холодовых повреждений [102]. В связи с этим представляет интерес анализ механизма регенерации, на который оказывает влияние метаболическое нарушение в виде нарушения толерантности к глюкозе.

Значительная распространенность нарушения толерантности к глюкозе и частая встречаемость холодовых повреждений, особенно в условиях климата северных широт Российской Федерации, обуславливает высокую вероятность одновременного наличия их у одного организма. Неясным остается механизм влияния на длительность и качество восстановления кожных покровов после холодового воздействия при нарушенном углеводном обмене. Вполне вероятно, что на подготовительном этапе при проведении реконструктивно-восстановительных операций использование ресурсов сохранившейся ткани может быть одним из решений, направленных на повышение эффективности лечения отморожений [113]. С учетом того, что метаболические отклонения в виде нарушения толерантности клеток к глюкозе широко распространены в

Арктической зоне, исследование регенеративных механизмов, сопряженных с их наличием, представляет особый интерес.

В соответствии с полученными результатами, на 3 сутки после локального холодового воздействия у крыс на фоне нарушения толерантности к глюкозе регистрировали значимое снижение содержания коллагена поврежденной дермы. Но уже к 7 суткам уровень изучаемого показателя возрастал. Увеличение данного показателя продолжилось к 14 суткам, но в период с 14 по 21 сутки наблюдения содержание коллагена дермы увеличилось незначительно, иными словами, к 21 суткам после локального холодового повреждения содержание коллагена дермы не достигло уровня соответствующего показателя в контрольной группе.

Учитывая тот факт, что при холодовом воздействии у крыс без НТГ коллаген интенсивно синтезировался с 3 по 7 сутки и с 14 по 21 сутки, а на фоне нарушения толерантности к глюкозе пик проявлялся на 7-14 сутки, можно полагать, что нарушение углеводного обмена существенно сказывается на интенсивности синтеза коллагена фибробластами. Однако толщина коллагеновых волокон в ходе ремоделирования в условиях НТГ за 21 сутки сформировалась и не имела различий с группой контроля к концу периода наблюдения. Подтверждением этого является то, что на 3 сутки после холодового воздействия снижение содержания коллагена дермы сопровождалось значимым уменьшением толщины коллагеновых волокон. Увеличение толщины начиналось на 7 сутки и продолжилось до 21 суток. Иными словами, динамика изменения толщины коллагеновых волокон была практически идентичной, как в случае формирования толщины коллагеновых волокон при отсутствии нарушения глюкозотолерантности. Различие было только в том, что к 21 суткам толщина волокон при метаболических нарушениях не отличалась от контрольных цифр, чего не было у крыс без таких нарушений.

В ходе проведенного эксперимента отмечено, что в период с 3 по 7 сутки при НТГ основная масса клеток сосредотачивалась именно на границе сетчатой дермы и гиподермы как в зоне повреждения, так и перифокально, так же как в условиях без нарушения толерантности к глюкозе. Различия касаются количества клеток на единицу площади: на фоне НТГ их больше, чем без него. Поскольку для

полноценной продукции коллагена после миграции клеткам требуется около 4 суток (с 3 по 7 сутки), можно предположить, что в этот период времени продукция коллагена в большей степени происходила на границе сетчатой дермы и гиподермы, чем в сосочковой или сетчатой дерме. С 7 по 21 сутки количество клеток на единицу площади на границе дермы и гиподермы статистически значимо снижалось, тогда как синтез коллагена продолжался вплоть до 21 суток.

Полученные данные позволяют утверждать, что ремодуляция после локального холодового повреждения связана со скоплением клеток на границе сетчатой дермы и гиподермы зоны повреждения в обеих экспериментальных группах. При этом отмечалось более позднее наступление пика миграционного процесса и большее количество клеток, вовлеченных в миграцию, в условиях метаболических нарушений углеводного обмена в сравнении с регенерацией раневой поверхности при отсутствии таких нарушений. Вполне вероятно, что в процесс регенерации пораженного участка включаются все исследуемые зоны дермы, особенно дерма на границе с гиподермой, тогда как на периферии поврежденного участка – преимущественно зона дермы, расположенная на границе сетчатой дермы и гиподермы. Вероятно, что при большем скоплении клеток в вероятных центрах регенерации интенсивность образования коллагена ниже на фоне нарушений толерантности к глюкозе.

Как известно, инсулиноподобный фактор роста-1, обладая способностью к ингибированию апоптоза, опосредованно отвечает за стимуляцию пролиферации и дифференцировки клеток путем увеличения потребления ими глюкозы. Учитывая, что рецепторы клеток к IGF-1 повсеместны, естественно полагать, что влияние на метаболические процессы, вызванные IGF-1, происходит на все типы клеток, в том числе фибробласты и эндотелиоциты сосудов дермы, поскольку сосудистые эффекты IGF-1 связаны с его вазодилатирующим действием [118].

Как и в случае с сиаловыми кислотами в сыворотке крови, нарушение толерантности клеток к глюкозе характеризуется увеличением содержания IGF-1 в сыворотке крови до 1304,0 нг/мл (1203,0; 1454,0).

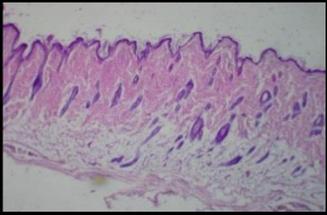
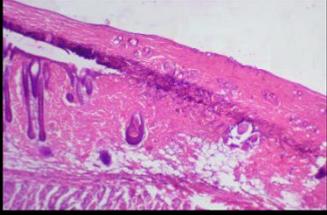
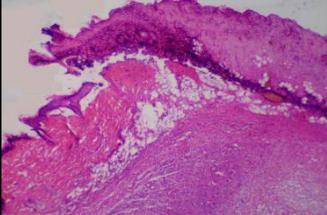
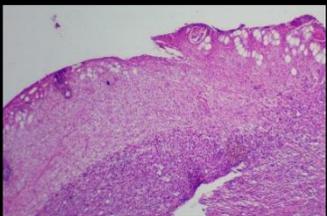
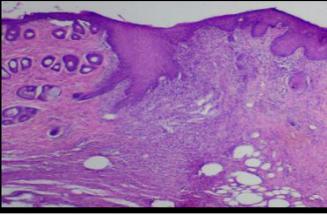
При исследовании динамики инсулиноподобного фактора роста у крыс после локального острого отморожения на фоне нарушения толерантности к глюкозе установлено, что на 3 сутки различий с контрольными значениями не наблюдалось, однако на 7 сутки была отмечена тенденция к снижению, а затем (на 14 сутки) – резкое увеличение изучаемого показателя. На данном уровне значение сохранялось до окончания эксперимента, не отличаясь от группы контроля. Различия значений инсулиноподобного фактора роста-1 между группами крыс с метаболическими нарушениями и без них не зафиксированы только на 7 сутки после локального холодового повреждения. В другие периоды наблюдения регистрировали значимые отличия, подтвержденные статистически.

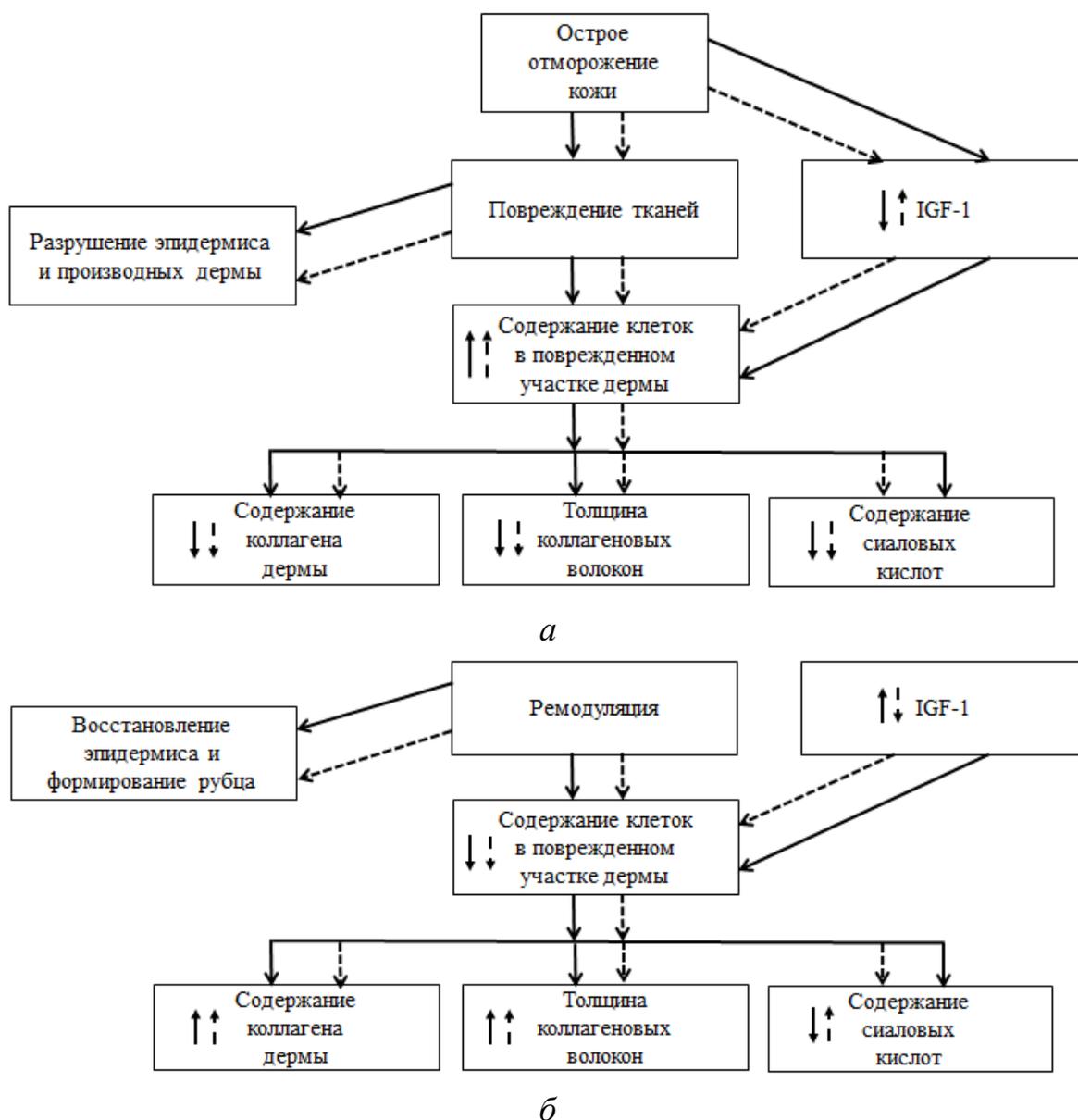
При проведении корреляционного анализа выявлена прямая статистически достоверная связь между увеличением содержания IGF-1 и концентрацией клеток на границе сетчатой дермы и гиподермы вокруг зоны повреждения ( $\tau = 0,39$ ;  $p = 0,039$ ) только на 7 сутки после локального холодового воздействия. При нарушении толерантности к глюкозе после локального холодового повреждения резкое снижение уровня IGF-1 в сыворотке крови с 1123,0 нг/мл до 693,0 нг/мл сопровождалось увеличением толщины коллагеновых волокон в зоне повреждения с 3 по 7 сутки, что подтвердилось статистически достоверной обратной корреляцией ( $\tau = 0,95$ ;  $p = 0,001$ ).

Механизм влияния инсулиноподобного фактора роста-1 проявлялся как при холодовом повреждении, так и при холодовом повреждении на фоне НТГ на 7 сутки эксперимента. Различие заключалось в том, что при локальном холодовом воздействии концентрация IGF-1 оказывала влияние на содержание клеток на границе сетчатой дермы и гиподермы в перифокальной зоне, тогда как при НТГ низкие концентрации IGF-1 отрицательно коррелировали с толщиной коллагеновых волокон.

Сводные данные ремодуляции межклеточного матрикса дермы после острого локального отморожения представлена в *таблице 12*, согласно которой были выявлены основные механизмы, представленные на *рисунке 21*.

**Таблица 12 – Сводные данные ремодуляции межклеточного матрикса дермы после острого отморожения**

		Без НТГ	При НТГ	
Контроль	Содержание коллагена Толщина коллагеновых волокон Содержание сиаловых кислот Кол-во клеток в зоне повреждения Концентрация IGF-1	71,43% 11,11 мкм 151,0 усл. ед. 2,0 кл. 600,0 нг/мл	69,91% 10,26 мкм 276,5 усл. ед. 0,0 кл. 1304,0 нг/мл	
3 сутки	Содержание коллагена Толщина коллагеновых волокон Содержание сиаловых кислот Кол-во клеток в зоне повреждения Концентрация IGF-1	21,71% 3,36 мкм 101,0 усл. ед. 8,0 кл. 216,0 нг/мл	26,92% 4,48 мкм 287,8 усл. ед. 6,0 кл. 1123,0 нг/мл	
7 сутки	Содержание коллагена Толщина коллагеновых волокон Содержание сиаловых кислот Кол-во клеток в зоне повреждения Концентрация IGF-1	31,15% 5,65 мкм 127,0 усл. ед. 8,0 кл. 1285,0 нг/мл	40,51% 5,62 мкм 299,0 усл. ед. 18,0 кл. 693,0 нг/мл	
14 сутки	Содержание коллагена Толщина коллагеновых волокон Содержание сиаловых кислот Кол-во клеток в зоне повреждения Концентрация IGF-1	35,91% 6,99 мкм 138,5 усл. ед. 7,0 кл. 1800,0 нг/мл	53,22% 8,64 мкм 283,0 усл. ед. 10,0 кл. 1164,0 нг/мл	
21 сутки	Содержание коллагена Толщина коллагеновых волокон Содержание сиаловых кислот Кол-во клеток в зоне повреждения Концентрация IGF-1	52,27% 8,99 мкм 108,5 усл. ед. 5,0 кл. 1800,0 нг/мл	56,28% 9,36 мкм 278,0 усл. ед. 8,0 кл. 1086,0 нг/мл	



**Рисунок 21 – Механизмы ремодуляции кожи после острого отморожения: *a* – в реактивном периоде на 3 сутки; *б* – в восстановительном периоде на 21 сутки**

*Примечание:* НТГ – нарушение толерантности к глюкозе; IGF-1 - инсулиноподобный фактор роста; ———▶ - без НТГ; - - - -▶ - при НТГ

Таким образом, процесс ремодуляции после острого отморожения на фоне нарушения толерантности к глюкозе характеризовался поздним образованием рубца; низкой интенсивностью синтеза и формирования дермального коллагена; увеличением содержания сиаловых кислот в сыворотке крови на 7 сутки; более поздним наступлением пика миграционного процесса и большим количеством клеток, вовлеченных в миграцию; влиянием инсулиноподобного фактора роста на толщину коллагеновых волокон.

## ВЫВОДЫ

1. Статистически значимое снижение содержания коллагена межклеточного матрикса дермы, регистрируемое на 3 сутки после острого локального отморожения, сменяется синтезом и формированием его уже на 7 сутки, независимо от наличия или отсутствия нарушений толерантности к глюкозе; на фоне нарушения толерантности к глюкозе ремодуляция кожи после локального острого отморожения более продолжительная, чем без нарушения углеводного обмена, о чем свидетельствует наличие эрозивно-язвенных дефектов в стадии рубцевания и гиперемии на 21 сутки.

2. При нарушении глюкозотолерантности ремодуляция дермы после острого отморожения происходит медленнее за счет более низкой интенсивности синтеза коллагена дермы, что проявляется увеличением его содержания только с 7 по 14 сутки, и отличает ремодуляцию в условиях отсутствия нарушения углеводного обмена, при которой интенсивное увеличение содержания коллагена в дерме происходит с 3 по 7 сутки и с 14 по 21 сутки.

3. Активное увеличение толщины коллагеновых волокон дермы в ходе регенераторного процесса после острого отморожения на фоне нарушения толерантности к глюкозе происходит с 3 по 14 сутки, в то время как без нарушения углеводного обмена данный процесс наблюдается с 3 по 21 сутки.

4. Нарушение толерантности к глюкозе само по себе, даже без локального острого отморожения, сопровождается увеличением содержания сиаловых кислот в сыворотке крови; в условиях ремодуляции межклеточного матрикса дермы незначительное увеличение содержания сиаловых кислот к 7 суткам на 7,5% сменяется снижением уровня их на 14 сутки и достигает исходного значения контрольной группы к 21 суткам эксперимента.

5. Механизмы ремодуляции дермы после острого отморожения сопряжены с миграцией макрофагов, лейкоцитов, гистиоцитов, фибробластических и малодифференцированных клеток на границу сетчатой дермы и гиподермы поврежденного участка: пик миграции у крыс без нарушения толерантности к глюкозе наступает на 3 сутки, на фоне нарушений углеводного обмена – на 7 сутки.

6. Нарушение толерантности к глюкозе связано с увеличением концентрации IGF-1 в сыворотке крови: снижение концентрации IGF-1 происходит на протяжении всего периода ремодуляции межклеточного матрикса дермы, особенно на 7 сутки, к 21 суткам к исходному значению данный показатель не возвращается.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Для определения количества коллагена кожи рекомендовано использовать способ, заключающийся в многократной гомогенизации материала, лиофильного высушивания и определения массы материала до и после ферментативного гидролиза коллагена (патент РФ № 2689337).

2. Для выделения коллагеновых волокон дермы рекомендовано использовать способ, заключающийся в обработке измельченного кусочка кожи гидроксидом калия, гомогенизации, промывки и лиофильного высушивания материала (патент РФ № 2764514).

3. Результаты исследования, касающиеся выявленных центров локализации синтеза коллагеновых волокон, могут быть использованы при лечении острых отморожений с целью ускорения реабилитационного периода и исключения стойкой нетрудоспособности.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ГТТ – глюкозотолерантный тест

МКМ – межклеточный матрикс

НТГ – нарушение толерантности к глюкозе

СК – сиаловые кислоты

IGF – инсулиноподобный фактор роста

IL – интерлейкин

TGF – трансформирующий фактор роста

TNF – фактор некроза опухоли

VEGF – васкулоэндотелиальный фактор роста

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абрамович, С.Г. Физиотерапия воспаления / С.Г. Абрамович // Курортная медицина. – 2021. – № 3. – С. 6–21.
2. Автандилов, Г.Г. Основы количественной патологической анатомии : учеб. пособие / Г. Г. Автандилов. – Москва : Изд-во «Медицина», 2002. - 240 с. – ISBN 5-225-04151-5.
3. Адаскевич, В.П. Актуальная дерматология : монография / В.П. Адаскевич. – Нижний Новгород : Изд-во «Ниж. гос. мед. академия», 2000. – 165 с.
4. Аккуратова Е.В. Сиаловые кислоты как неспецифические окомаркеры / Е.В. Аккуратова, Е.Г. Аккуратов // Вестник современных исследований. – 2019. – № 1. 12(28). – С. 4-7.
5. Алексеева, Н.Т. Роль клеток фибробластического дифферона в процессе заживления ран / Н.Т. Алексеева, А.А. Глухов, А.П. Остроушко // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2012. – Т. 5, № 3. – С. 601-608.
6. Аметов, А.С. Профилактика развития сахарного диабета типа 2 / А.С. Аметов, А.А. Кривошеева // Эндокринология: Новости. Мнения. Обучение. – 2017. – Т. 4, № 21. – С. 14-25.
7. Артериальная гипертензия, абдоминальное ожирение, нарушение толерантности к глюкозе / А. Шилов, А. Авшалумов, А. Осия, [и др.] // Врач. – 2010. – № 9. – С. 61-65.
8. Байрейтер, К. Фибробласты при нормальной и патологической терминальной дифференцировке, старении, апоптозе и трансформации / К. Байрейтер, П. Франц, Х. Родеман // Онтогенез. – 1995. – Т. 236, № 1. – С. 22-37.
9. Бакалец, Н.Ф. Метаболический синдром как фактор риска кожной патологии / Н.Ф. Бакалец, Л.А. Порошина // Проблемы здоровья и экологии. – 2018. – Т. 4, № 58. – С. 9-15.

10. Биорегулирующая терапия у больных с острой холодовой травмой / В.А. Сизоненко, Б.И. Кузник, Ю.А. Витковский, В.И. Подойницына // Холодовая травма : третья научная конференция по проблеме : сб. тез. (Санкт-Петербург, 18 апр. 2002 г.). – Санкт-Петербург, 2002. – С. 68-70.
11. Бозо, И.Я. Фибробласт-специализированная клетка или функциональное состояние клеток мезенхимного происхождения / И.Я. Бозо, Р.В. Деев, Г.П. Пинаев // Цитология. – 2010. – Т. 52, № 2. – С. 99-109.
12. Бокарев, И.Н. Метаболический синдром / И.Н. Бокарев // Клиническая медицина. – 2014. – Т. 92, № 8. – С. 71-76.
13. Бочаров, М.И. Терморегуляция организма при холодовых воздействиях (обзор): сообщение II / М.И. Бочаров // Журнал медико-биологических исследований. – 2015. – № 2. – С. 5-16.
14. Валентюкевич, А.Л. Экспериментальное моделирование отморожений разной степени тяжести у лабораторных животных: ч. 2: Морфологическая оценка эффективности устройства для моделирования контактных отморожений / А.Л. Валентюкевич, В.Д. Меламед, Н.И. Прокопчик // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2021. – Т. 19, № 1. – С. 46-54.
15. Гарстукова, Л.Г. Наглядная гистология (общая и частная) : учеб. пособие / Л.Г. Гарстукова, С.Л. Кузнецов, В.Г. Деревянко. – Москва : Медицинское информационное агентство, 2008. – 204 с. – ISBN 5894815975.
16. Геннадиник, А.Г. Роль инсулиноподобного фактора роста-I в метаболизме, регуляции клеточного обновления и процессах старения / А.Г. Геннадиник, А.А. Нелаева // Ожирение и метаболизм. – 2010. – № 2. – С.10-15.
17. Груздева, О.С. Патологическая анатомия отморожений / О.С. Груздева // Забайкальский медицинский вестник. – 2020. – № 4. – С. 137-144.
18. Гудков, А.Б. Эколого-физиологическая характеристика климатических факторов Севера обзор литературы / А.Б. Гудков, О.Н. Попова, Н.Б. Лукманова // Экология человека. – 2012. – № 1. – С. 12-17.

19. Дедов, И.И. Распространенность сахарного диабета 2 типа у взрослого населения России (исследование NATION) / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, Г.Р. Галстян // Сахарный диабет. – 2016. – Т. 19, № 2. – С. 104-112.

20. Дедух, Н.В. Новые технологии в регенерации кости: использование факторов роста / Н.В. Дедух, С.А. Хмызов, А.А. Тихоненко // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2008. – Т. 4. – С. 129-132.

21. Добродеева, Л.К. Соотношение содержания иммунокомпетентных клеток в регуляции иммунного статуса человека, проживающего на Севере / Л.К. Добродеева, О.Е. Филиппова, С.Н. Балашова // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2014. – № 2. – С. 132-134.

22. Звягинцева, Т.В. Структурно-метаболическое состояние соединительной ткани при локальном ультрафиолетовом облучении кожи морских свинок / Т.В. Звягинцева, С.И. Миронченко // Актуальні проблеми транспортної медицини: навколишнє середовище; професійне здоров'я; патологія. – 2019. – № 2. – С. 150-154.

23. Зорин, В.Л. Дermalные фибробласты для лечения дефектов кожи / В.Л. Зорин, А.И. Зорина, О.С. Петракова, В.Р. Черкасов // Гены и клетки. – 2009. – Т. 4, № 4. – С. 26-40.

24. Зорина, А.И. Дermalные фибробласты: разнообразие фенотипов и физиологических функций, роль в старении кожи / А.И. Зорина, В.Л. Зорин, В.Р. Черкасов // Эстетическая медицина. – 2012. – Т. 11, №. 1. – С. 15-31.

25. Изучение морфологических особенностей в тканях экспериментальных животных при моделировании холодовой травмы / В.В. Бойко, А.Э. Миловидова, Л.Г. Яновская, [и др.] // Вестник морфологии. – 2010. – № 16. – С. 3.

26. Казанцева, К.В. Сравнительная динамика клинико-функционального состояния пациентов с патологическими рубцами кожи в сочетании с метаболическим синдромом и без него при комбинированном применении физиотерапевтических технологий / К.В. Казанцева, С.Н. Нагорнев, В.К. Фролков // Russian Journal of Rehabilitation Medicine. – 2020. – № 4. – С. 59-70.

27. Карайланов, М.Г. Термоизоляция пораженных тканей как профилактика некрозов при холодовых поражениях в вооруженных конфликтах / М.Г. Карайланов // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2008. – № 1. – С. 70-73.
28. Кириленко, В.П. Биохимические преобразования соединительной ткани шейки матки как фактор инициации прерывания беременности / В.П. Кириленко, Л.М. Небышинец // Медицинские новости. – 2020. – Т. 3, № 306. – С. 13-20.
29. Коллагеназы в медицинской практике: современные средства на основе коллагеназы и перспективы их совершенствования / А.В. Майорова, Б.Б. Сысуев, Ю.О. Иванкова, И.А. Ханалиева // Фармация и фармакология. – 2019. – Т. 7, № 5. – С. 260-270.
30. Корочина, И.Э. Состояние основных типов коллагена при наиболее ревматических заболеваниях, и современная стратегия его диагностики / И.Э. Корочина, Г.Г. Багирова // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2008. – № 1. – С. 118-129.
31. Красильников, А.В. Метаболический синдром: патогенез и гериатрические аспекты проблемы / А.В. Красильников, А.Л. Азин // Практическая медицина. – 2011. – № 54. – С. 31-35.
32. Кузина, Е.В. Изменения сиалирования сыворотки крови при онкологических заболеваниях / Е.В. Кузина // Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования. – 2018. – С. 68.
33. Лазаренко, В.А. Эффекты синтетического аналога индолицидина на регенерацию кожи при локальной холодовой травме / В.А. Лазаренко, Ю.Д. Ляшев, Н.И. Шевченко // Актуальные проблемы медицины. – 2015. – Т. 29, № 4. – С. 77-84.
34. Лукин, А.А. Структурно-механические и химические особенности нативного коллагена / А.А. Лукин // Международное сотрудничество: опыт, проблемы и перспективы. – 2020. – С. 51-54.

35. Люцко, В.В. Биопсия кожи в дерматологии / В.В. Люцко // Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики. – 2015. – № 4. – С. 45-55.
36. Мавлянова, Ш.З. Применение дермальных фибробластов в лечении дерматологических заболеваний / Ш.З. Мавлянова, М.Д. Уразметова, С.З. Обидов // Журнал теоретической и клинической медицины. – 2020. – № 3. – С. 176-183.
37. Макарчук, О.И. Общие свойства и гетерогенитет субпопуляций фибробластов кожи / О.И. Макарчук // Морфологія. – 2007. – Т. 1, № 3. – С. 12-20.
38. Мангилева, Т.А. Метаболические и гемодинамические эффекты системы гормон роста — инсулиноподобный фактор роста / Т.А. Мангилева, Н.Х. Гафарова // Терапевтический архив. – 2015. – Т. 12. – С. 128-133.
39. Мартынов, А.В. Динамика коллагеногенеза в дерме кожи при компрессионной травме / А.В. Мартынов // Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье. – 2022. – С. 94-95.
40. Медведев, И.Н. Антиагрегационная активность сосудистой стенки у больных артериальной гипертонией с нарушением толерантности к глюкозе / И.Н. Медведев, О.В. Гамолина // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2008. – № 7. – С. 432-436.
41. Метаболический синдром: история развития, основные критерии диагностики / Ю.Н. Беленков, Е.В. Привалова, В.Ю. Каплунова, [и др.] // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2018. – Т. 14, № 5. – С. 757-764.
42. Михайлова, В.С. Методы гистологической окраски: справочник / В.С. Михайлова – Санкт-Петербург: БиоВитрум, 2009. – С. 10.
43. Морфологические изменения кожи конечности крыс при местном воздействии низкой температуры на фоне применения дигидрохверцетина / Е.А. Малюк, С.С. Целуйко, Г.И. Никишина, Н.П. Красавина // In Situ. – 2015. – № 4. – С. 23-26.
44. Можина, Н.В. Коллагенолитические ферменты патогенных микроорганизмов / Н.В. Можина, Г.Н. Руденская // Биомедицинская химия. – 2004. – Т. 50, № 6. – С. 539-554.

45. Некоторые современные методы диагностики огнестрельных повреждений / И.Ю. Макаров, Д.В. Богомол, Н.Д. Гюльмамедова, А.Н. Шай // Судебно-медицинская экспертиза. – 2019. – Т. 62, № 2. – С. 55-60.

46. Николаев В.М. Интенсивность свободнорадикального окисления липидов в организме больных холодовой травмой / В.М. Николаев, Р.З. Алексеев, С.А. Федорова // Якутский медицинский журнал. – 2018. – № 2. – С. 34-38.

47. Ноздрин, В.И. Гистофизиология кожи : учеб. пособие / В.И. Ноздрин, С.А. Барашкова, В.В. Семченко – Омск ; Орел : Изд-во Омская государственная медицинская академия, 2008. – 280 с. ISBN 5-87367-056-0.

48. Образцова А.Е. Морфофункциональные особенности репаративного процесса при заживлении кожных ран с учетом возможных рубцовых деформаций (обзор литературы) / А.Е. Образцова, А.А. Ноздреватых // Вестник новых медицинских технологий: [электронное издание] – 2021. – Т. 15, № 1.

49. Овчарова, Т.С. Участие инсулиноподобного фактора роста 1 в ремоделировании суставного хряща / Т.С. Овчарова, Ю.А. Зимица, П.А. Крылов // Природные системы и ресурсы. – 2020. – Т. 10, № 4. – С. 22-29.

50. Омеляненко, Н.П. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия) : монография / Н.П. Омеляненко, Л.И. Слуцкий. – Москва : Изд-во «Известия», 2009. – 378 с. – ISBN 978-5-206-00740-4.

51. Опыт проведения некрэктомии при глубоких отморожениях физическими способами воздействия на ткани / К.Н. Мовчан, А.В. Коваленко, Е.В. Зиновьев, [и др.] // Вестник хирургии имени И.И. Грекова. – 2011. – Т. 170, № 1. – С. 36-40.

52. Особенности ангиогенеза при регенерации тканей кожи / Е.А. Пронина, Т.В. Степанова, Т.С. Кириязи, [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2019. – Т. 15, № 1. – С. 104-107.

53. Особенности оказания медицинской помощи при отморожениях в советско-финской войне / А.А. Будко, С.Х. Кичемасов, Ю.Р. Скворцов, А.М. Барановский // Военно-медицинский журнал. – 2000. – Т. 4, № 1. – С. 73-78.

54. Особенности реакции легочного газообмена на локальное холодное воздействие у молодых лиц трудоспособного возраста / А.А. Шаньгина, О.Н. Попова, Е.В. Тихонова, [и др.] // Экология человека. – 2018. – № 5. – С. 33-38.

55. Оценка структуры и состояния коллагена по сигналу генерации второй гармоники / В.В. Дуденкова, М.В. Ширманова, М.М. Лукина, [и др.] // Успехи биологической химии. – 2019. – № 59. – С. 181.

56. Оценка тяжести вреда здоровью при ожоговых поражениях / В.В. Колкутин, С.Г. Шаповалов, И.А. Толмачёв, [и др.] // Военно-медицинский журнал. – 2009. – Т. 330, № 3. – С. 20-23.

57. Оценка фармакологической эффективности применения серотонина адипината, опиоидного пептида DSLET и их комбинации при экспериментальном контактном отморожении на фоне активной хирургической тактики / А.Л. Чигунадзе, Е.Б. Артюшкова, В.Н. Мишустин, [и др.] // Человек и его здоровье: Курский научно-практический вестник. – 2015. – № 2. – С. 89-95.

58. Пальцев, М.А. Стандартные технологические процедуры при морфологическом исследовании биопсийного и операционного материала / М.А. Пальцев, П.Г. Мальков, Г.А. Франк // Архив патологий. – 2011. – Т. 73. – С. 60-66.

59. Патракеева, В.П. Влияние кратковременного общего охлаждения на миграцию, рециркуляцию и энергетический ресурс иммунокомпетентных клеток периферической крови человека / В.П. Патракеева, А.В. Самодова // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2017. – Т. 14, № 4. – С. 362-368.

60. Патракеева, В.П. Влияние фоновой лимфопении на реакции системного иммунитета при кратковременном общем охлаждении / В.П. Патракеева, В.А. Штаборов // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2019. – Т. 16, № 2. – С. 170-176.

61. Патракеева, В.П. Изменение уровня лимфоцитов периферической венозной крови как метод оценки индивидуальной холодной чувствительности / В.П. Патракеева // Экологический мониторинг: методы и подходы : Сложные

системы в экстремальных условиях : XX международный симпозиум : сб. тез. (Красноярск, 20-24 сентября 2021 г.). – Красноярск, 2021. – С. 170-173.

62. Патракеева, В.П. Метаболическая активность иммунокомпетентных клеток в оценке индивидуальной холодовой чувствительности / В.П. Патракеева, В.А. Штаборов // Медицина экстремальных ситуаций. – 2022. – Т. 24, № 4. - С. 102-106.

63. Предиктивная оценка индивидуальной восприимчивости организма человека к опасному воздействию холода / В.П. Чашин, А.Б. Гудков, М.В. Чашин, О.Н. Попова // Экология человека. – 2017. – № 5. – С. 3-13.

64. Роль сиаловых кислот в поддержании иммунного гомеостаза / А.В. Москалев, В.Б. Сбойчаков, А.В. Апчел, В.Н. Цыган // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2018. – № 3. – С. 233-237.

65. Серов, В.В. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология) : монография / В.В. Серов, А.Б. Шехтер. – Москва: Изд-во «Медицина», 1981. – 312 с.

66. Сизоненко, В.А. Классификация холодовой травмы / В.А. Сизоненко // VI съезд травматологов и ортопедов России: сб. тез. (Нижний Новгород, 9-12 сентября 1997 г.). – Нижний Новгород, 1997. – С. 138.

67. Синтез коллагена в коже: генетические и эпигенетические аспекты / Н.Н. Потекаев, О.Б. Борзых, Н.А. Шнайдер, [и др.] Бюллетень сибирской медицины. – 2022. – Т. 21 (3). – С. 217-226.

68. Соколовский, Е.В. Кожные и венерические болезни : учеб. пособие / Е.В. Соколовский. – Санкт-Петербург : Фолиант, 2006. – 484 с. ISBN 5-93929-130-9.

69. Соснова, Е.А. Метаболический синдром / Е.А. Соснова // Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева. – 2016. – Т. 3, № 4. – С. 172-180.

70. Способ выделения коллагеновых волокон дермы: патент на изобретение № 2764514 Рос. Федерация: (51) МПК<sup>51</sup> А61К 35/36 /Л.Н. Горбатова, Н.А. Шутский, С.Л. Кашутин, С. И. Малявская, Л.Л. Шагров, Д.В. Мизгирёв, Д.Г. Чухчин; заявитель и правообладатель ФГБОУ ВО "Северный

государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации. – № 2020142837; заявл. 23.12.2020, опубл. 18.01.2022. Бюлл. № 2.

71. Способ определения количества коллагена в ткани: патент на изобретение № 2689337 Рос. Федерация: (51) МПК<sup>51</sup> G01N 33/48 / С.И. Малявская, С.Л. Кашутин, Н.А. Шутский, Л.Л. Шагров, Д.В. Мизгирёв, А.С. Аксенов, Д.Г. Чухчин; заявитель и правообладатель ФГБОУ ВО "Северный государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации. – № 2018124160; заявл. 02.07.2018, опубл. 27.05.2019. Бюлл. № 15.

72. Суркова, Г.В. Климатические ресурсы современного климата в середине и конце XXI века как основа прогноза социально-важных показателей в Арктике / Г.В. Суркова // Меняющийся климат и социально-экономический потенциал Российской Арктики. – 2015. – С. 7-20.

73. Тателадзе, Д.Г. Клинико-статистический анализ больных с термическими поражениями / Д.Г. Тателадзе, С.Н. Симонов // Вестник российских университетов. Математика. – 2017. – Т. 22, № 1. – С. 205-211.

74. Тотолян А.А. Клетки иммунной системы : учеб. пособие / А.А. Тотолян, И.С. Фрейдлин. – Санкт-Петербург : Изд-во «Наука», 1999. – 390 с. – ISBN 5-02-026159-9.

75. Угольник, Т.С. Нарушения периферического кровообращения и микроциркуляции : учеб.-метод. пособие / Т.С. Угольник, И.А. Атаманенко, Е.В. Тимошкова. — Гомель : Изд-во ГомГМУ, 2019. — 80 с.

76. Фибробласты дермы: особенности цитогенеза, цитофизиологии и возможности клинического применения / А.И. Зорина, И.Я. Бозо, В.Л. Зорин. [и др.] // Гены и клетки. – 2011. – Т. 6, № 2. – С. 15-26.

77. Хадарцев, А.А. Применение гипотермии в сочетании с транскраниальной электростимуляцией в спорте (краткое сообщение) / А.А. Хадарцев, Н.А. Фудин, И.А. Миненко // Вестник новых медицинских технологий. – 2022. – Т. 16, № 1. – С. 147-150.

78. Хакунов, Р.Н. Метаболический синдром: актуальные вопросы: обзор литературы / Р.Н. Хакунов // Новые технологии. – 2012. – № 4. – С. 318-324.
79. Халимов Т.А. Особенности ангиогенеза при заболеваниях глаз / Т.А. Халимов // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2021. – Т. 25, № 2. – С. 106-113.
80. Хрущов, Н.Г. Гистогенез соединительной ткани. Экспериментальные исследования происхождения фибробластов : монография / Н.Г. Хрущов. – Москва: Изд-во «Наука», 1976. – 117 с.
81. Шамханов, Ч.Ю. Влияние коллагеназы на белковые фракции мышечной ткани птицы / Ч.Ю. Шамханов, Л.В. Антипова, О.С. Осминин // Мясная индустрия. – 2003. – № 10. – С. 37-39.
82. Шаповалов, К.Г. Изменения компонентов сосудистого тонуса и показателей микроциркуляции при отморожениях нижних конечностей / К.Г. Шаповалов // Вестник хирургии имени И.И. Грекова. – 2008. – № 3. – С. 67-68.
83. Шерстюков, Б.Г. Климатические условия Арктики и новые подходы к прогнозу изменения климата / Б.Г. Шерстюков // Арктика и север. – 2016. – № 24. – С. 39-67.
84. Шишко, О.Н. Взаимосвязь между ферментами системы глутатиона, цитокинами, микроциркуляцией и нарушениями углеводного обмена / О.Н. Шишко // БГМУ: 90 ЛЕТ В АВАНГАРДЕ МЕДИЦИНСКОЙ НАУКИ И ПРАКТИКИ. – 2013. – С. 227-230.
85. Экспериментальное изучение специфической активности препарата на основе мезенхимальных мультипотентных стволовых клеток человека на модели местного отморожения, находящихся в условиях гипоксии (модель Арктики) / Д.Ю. Жуков, С.П. Рыбалкин, А.В. Миляев, [и др.] // Состояние и перспективы развития современной науки по направлению «Биотехнические системы и технологии» 2020: II Всероссийская научно-техническая конференция: сб. тез. (Анапа, 21 мая 2020 г.). – Анапа, 2020. – Т. 2. – С. 119-127.

86. Юрина, Н.А. Кожа и ее производные : учеб. пособие / Н.А. Юрина, А.И. Радостина. – Москва : Изд-во «ММА им. И.М. Сеченова», 1996. – 52 с. – ISBN 5-209-00751-0.

87. Arora, R. Mechanism of freeze-thaw injury and recovery: a cool retrospective and warming up to new ideas / R. Arora // *Plant Science*. – 2018. – V. 270. – P. 301-313.

88. Banzo, J. Frostbite of the upper and lower limbs in an expert mountain climber: the value of bone scan in the prediction of amputation level / J. Banzo, V.G. Martínez, M.D. Abós // *Rev. Esp. Med. Nucl.* – 2002. – V. 21(5). – P. 366-369.

89. Bikkle, D.D. Vitamin D metabolism and function in the skin / D.D. Bikkle // *Biol. Chem.* – 2011. – V. 392(7). – P. 643-651.

90. Capoluongo, E. Inverse correlation between serum free IGF-1 and IGFBP-3 levels and blood pressure in patients affected with type I diabetes / E. Capoluongo, D. Pitocco, P. Lulli // *Cytokine*. – 2006. – V. 34. – P. 303-311.

91. Chen, X. Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure / X. Chen, O. Nadiarynk, S. Plotnikov, P.J. Campagnola // *Nature protocols*. – 2012. – V. 7(4). – P. 654-669.

92. Collagens, elastic fibers, and other extracellular matrix proteins of the dermis / T. Krieg, M. Aumailley, M. Koch, [et al.] // *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. – 2010. – P. 741-751.

93. Delafontaine, P. Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels / P. Delafontaine, Y.H. Song, Y. Li // *Arterioscleros, Thrombos Vasc Biol.* – 2004. – V. 24. – P. 435-444.

94. FINDERLE, Z. Delayed treatment of frostbite injury with hyperbaric oxygen therapy: a case report / Z. FINDERLE // *Aviat Space Environ Med.* – 2002. – V. 73, No. 4. – P. 392-394.

95. Freund, I. Connective tissue polarity. Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon / I. Freund, M. Deutsch, A. Sprecher // *Biophys. J.* – 1986. – V. 50. – P. 693-712.

96. Grinnell, F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices / F. Grinnell // *Trends Cell Biol.* – 2003. – V. 13, No. 5. – P. 264-269.
97. Hanefeld, M. Geschichte und definition(en) des metabolischen syndroms / M. Hanefeld, F. Schaper, A. Ceriello // *Internist.* – 2007. – V. 48. – P. 117-125.
98. Human keratinocytes express the three major splice forms of vascular endothelial growth factor / C. Ballaum, W. Weninger, A. Uthman, [et al.] // *J. Invest. Dermatol.* – 1995. – V. 104, No. 1. – P. 7-10.
99. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: implications for care / D.M. Nathan, M.B. Davidson, R.A. DeFronzo, [et al.] // *Diabetes care.* – 2007. – V. 30, No. 3. – P. 753-759.
100. Impact of intercellular crosstalk between epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts on skin homeostasis / M. Jevtić, A. Loewa, A. Nováčková, A. Kováčik, [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research.* – 2020. – V. 1867, No. 8. – P. 118722.
101. Ingram, B.J. Recognition and treatment of freezing and nonfreezing cold injuries / B.J. Ingram, T.J. Raymond // *Curr. Sports. Med. Rep.* – 2013. – V. 12, No. 2. – P. 125-130.
102. Kaur, J. A comprehensive review on metabolic syndrome / J. Kaur // *Cardiology research and practice.* – 2014. – P. 1-21.
103. Khavkin, J. Aging skin: histology, physiology, and pathology / J. Khavkin, D.A.F. Ellis // *Facial Plastic Surgery Clinics.* – 2011. – V. 19, No. 2. – P. 229-234.
104. Kozlov, V.S. Rol' vospaleniya v patogeneze respiratornykh zabolevaniy / V.S. Kozlov, V.V. Shilenkova, O.D. Chistyakova // *Consilium Medicum.* – 2003. – V. 5, No. 10. – P. 566-573.
105. Laron, Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone / Z. Laron // *Molecular Pathology.* – 2001. – V. 54, No. 5. – P. 311.
106. Lopez-Lopez, C. Insulin-like growth factor I is required for vessels remodeling in the adult brain / C. Lopez-Lopez, D. LeRoith, I. Torres-Aleman // *PNAS.* – 2004. – V. 101. – P. 9833-9838.

107. Maloney, J. P. Proinflammatory cytokines increase vascular endothelial growth factor expression in alveolar epithelial cells / J.P. Maloney, L. Gao // *Mediators Inflammation*. – 2015. – V. 2015. – P. 7.
108. Mohr, W.J. Cold Injury / W.J. Mohr, K. Jenabzadeh, D.H. Ahrenholz // *Hand Clinics*. – 2009. – V. 25, No. 4. – P. 481-496.
109. Patrakeeva, V.P. Lymphopenia and lymphocytosis in practical healthy people born and living in the north / V.P. Patrakeeva, L.K. Dobrodeeva // *Immunity, Inflammation and Disease*. – 2020. – V. 8, No. 3. – P. 320-324.
110. Plikus, M.V. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease / M.V. Plikus // *Cell*. – 2021. – V. 184, No. 15. – P. 3852-3872.
111. Puche, J.E. Human conditions of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) deficiency / J.E. Puche, E. Castilla-Cortazar // *J Transl Med*. – 2012. – V. 10. – P. 224-235.
112. Pulla, R.J. Frostbite: an overview with case presentations / R.J. Pulla, L.J. Pickard, T.S. Carnett // *J-Foot-Ankle-Surg*. – 1994. – V. 33, No. 1. – P. 53-63.
113. Regulatory role of endothelin-1, brain natriuretic peptide and irisin in the development of the immune response to short-term general cooling / A.V. Samodova, L.K. Dobrodeeva, V.P. Patrakeeva, V.A. Shtaborov // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – 2019. – P. 012039.
114. Schauer, R. Exploration of the sialic acid world / R. Schauer, J.P. Kamerling // *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. – 2018. – V. 75. – P. 1-213.
115. Sorrel, J.M. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep / J.M. Sorrel, A.I. Caplan // *J Cell Sci*. – 2004. – V. 117. – P. 667-675.
116. The effect of long-term intranasal serotonin treatment on metabolic parameters and hormonal signaling in rats with high-fat diet/low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetes / K.V. Derkach, V.M. Bondareva, O.V. Chistyakova, [et al.] // *International Journal of Endocrinology*. – 2015. – P. 1-17.
117. Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues / P.J. Campagnola, A.C. Millard, M. Terasaki, [et al.] // *Biophys J*. – 2002. – V. 82. – P. 493-508.

118. Vascular endothelial growth factor receptor-2 in breast cancer / S. Guo, L.S. Colbert, M. Fuller, [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer*. – 2010. – V. 1806. – P. 108.

119. Wilderness medical society clinical practice guidelines for the prevention and treatment of frostbite / S.E. McIntosh, L. Freer, C.K. Grissom // *Wilderness & Environmental Medicine*. – 2019. – V. 30, No. 4. – P. 19-32.