

Федеральное государственное бюджетное учреждения науки Институт
биофизики клетки Российской академии наук
Федеральное государственное бюджетное общеобразовательное
учреждение высшего образования Тульский государственный университет

На правах рукописи

ПОТАПОВА АНГЕЛИНА ВЛАДИМИРОВНА

**РЕГЕНЕРАТИВНЫЕ И ПРОТЕКТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ
ЭКЗОГЕННОГО ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 И ПАРАКРИННЫХ
ФАКТОРОВ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ
ХИМИЧЕСКИХ И МЕХАНИЧЕСКИХ ТРАВМАХ КОЖИ**

03.01.04. – Биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
доктор биологических наук, профессор Музафаров Евгений Назибович;
доктор медицинских наук Темнов Андрей Александрович

Пушино – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1. Морфология, функции и особенности регенерации кожи.....	11
1.1. Морфология кожи.....	11
1.2. Основные функции кожи.....	15
1.3. Особенности физиологической регенерации кожи.....	16
2. Кожные раны и их классификация.....	18
2.1. Классификация ран.....	18
2.2. Химический ожог.....	19
3. Особенности заживления ран и современные препараты.....	20
3.1. Механизмы заживления ран.....	20
3.2. Фазы заживления ран и их особенности.....	21
3.3. Митоз и миграция клеток в процессе заживления ран.....	25
3.4. Сигнальные пути во время заживления ран.....	26
3.5. Окислительный стресс и регенерация раны.....	27
3.6. Современные препараты для лечения кожных ран.....	29
4. Окислительный стресс и антиоксидантные системы кожи.....	35
4.1. Ферменты-антиоксиданты и их роль в заживлении кожных ран.....	36
4.2. Пероксиредоксины.....	38
4.2.1. Роль пероксиредоксинов в защите клеток от окислительного стресса.....	41
4.2.2. Пероксиредоксины и их роль в заживлении кожных ран.....	43
4.3. Пероксиредоксин 6.....	45
5. Факторы, регулирующие процессы регенерации в эпителиальных тканях.....	49

5.1. Паракринные факторы мезенхимальных стволовых клеток	50
II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	54
1. Материалы	54
1.1. Животные и этика	54
1.2. Рекомбинантный человеческий пероксиредоксин 6	54
1.3 Паракринные факторы МСК	55
2. Методы	57
2.1. Модель ожога трихлоруксусной кислотой	57
2.1. Модель механической полнослойной кожной раны	58
2.3. Планиметрические методы исследования	59
2.4. Приготовление парафиновых срезов	60
2.5. Гистологический анализ	60
2.6. Иммуногистохимический анализ	61
2.7. Иммуноферментный анализ	61
2.8. Измерение концентрации оксида азота в сыворотке крови	62
2.9. Определение малонового диальдегида	62
2.10. Биохимический анализ крови	63
2.11. Статистический анализ	63
III РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	64
1. Химический ожог кожи, вызванный трихлоруксусной кислотой	64
1.1. Динамика регенерации химического ожога кожи	64
1.1.1. Морфология раневого процесса при химическом ожоге	64
1.1.2. Уровень клеточного апоптоза в ожоговой ране	66
1.1.3. Уровень клеточной пролиферации в ожоговой ране	67
1.1.4. Степень окислительного стресса в ожоговой ране	68

1.1.5. Интерлейкиновый профиль ожоговой раны	69
1.1.6. Уровень оксида азота в ожоговой ране.....	72
1.1.7. Биохимические показатели крови при химическом ожоге.....	73
1.2. Влияние экзогенного пероксиредоксина 6 (Ргх6) и паракринных факторов МСК (кМСК) на динамику заживления химического ожога кожи	75
1.2.1. Влияние Ргх6 и кМСК на морфологию ожоговой раны	75
1.2.2. Влияние Ргх6 и кМСК на уровень апоптоза в ожоговой ране	78
1.2.3. Влияние Ргх6 и кМСК на уровень пролиферации в ожоговой ране.....	79
1.2.4. Роль Ргх6 в нейтрализации окислительного стресса в ожоговой ране..	81
1.2.5. Влияние Ргх6 и к МСК на интерлейкиновый профиль ожоговой раны	82
1.2.6. Влияние Ргх6 и кМСК на биохимические показатели крови при химическом ожоге кожи	84
1.2.7. Роль пероксидазной активности экзогенного Ргх6 ожоговой ране	85
2. Влияние экзогенного Ргх6 и паракринных факторов МСК (кМСК) на динамику заживления механической полнослойной кожной раны.....	87
2.1. Влияние Ргх6 и кМСК на морфологию механической раны.....	87
2.2. Влияние Ргх6 и кМСК на уровень апоптоза в механической ране	95
2.3. Влияние Ргх6 и кМСК на уровень пролиферации в механической ране .	96
2.4. Влияние Ргх6 и кМСК на биохимические показатели крови после нанесения механической раны.....	97
IV. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	107
ВЫВОДЫ.....	109
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	109
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	114

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- Prx1-6 – пероксиредоксин 1-6
- АФК – активные формы кислорода
- ОС – окислительный стресс
- GPx – глутатионпероксидаза
- GSH – восстановленный глутатион
- GSSG – окисленный глутатион
- SOD – супероксиддисмутаза
- Tx - тиоредоксины
- АТФ – аденозинтрифосфат
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- МДА – малоновый диальдегид
- МСК - мезенхимальные стволовые клетки
- кМСК – кондиционированная культуральная среда МСК (паракринные факторы МСК)
- TNF – фактор некроза опухоли
- EGF - эпидермальный фактор роста
- HGF - фактор роста гепатоцитов
- KGF - фактор роста кератиноцитов
- FGF - фактор роста фибробластов
- IGF - инсулиноподобный фактор роста
- VEGF - фактор роста эндотелия сосудов
- EPO - эритропоэтин
- TPO - тромбопоэтин
- PDGF - тромбоцитарный фактор роста
- NFκB - транскрипционный фактор
- IL 1-10 - интерлейкины 1-10
- ТХУ – трихлоруксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Заживление кожных ран различной этиологии является одним из давно изучаемых разделов медицины. Несмотря на обилие препаратов для местного лечения ожогов и ран, совершенствование методов их лечения по-прежнему остается актуальной задачей [Li Y. et al., 2017; Marshall C.D. et al., 2018; Еськова А. Ю. и др., 2018].

Для эффективного заживления ран кожи необходимо решить две проблемы: уменьшить тяжесть поражения и ускорить процессы восстановления ткани.

1. Одним из факторов, определяющих тяжесть поражения, является мощный окислительный стресс, связанный с гиперпродукцией активных форм кислорода (АФК), который сопровождает большинство патологий [Mathieu D. et al., 2006; Ланкин, В.З. и др., 2001; Han Y. et al., 2018; Li D.J. et al., 2018]. В связи с этим для нейтрализации окислительного стресса обычно используют различные антиоксиданты [Chelombitko M.A. et al., 2017; Pielez A. et al., 2018; Ahmed O.M. et al., 2018]. В этом отношении заслуживают особого внимания ферменты-антиоксиданты класса пероксиредоксинов, которые способны нейтрализовать широкий спектр АФК (неорганические и органические гидропероксиды, пероксинитриты и т. д.). В настоящей работе в качестве антиоксиданта предполагается использовать пероксиредоксин 6 (Prx 6), высокая эффективность которого была показана ранее при лечении ряда патологий [Волкова А.Г. и др., 2014; Гордеева А.Е. и др., 2014; Lee D.H. et al., 2017; Fisher A.V. et al., 2018].

2. В процессе заживления раны перед организмом стоит задача восполнения утраченной целостности кожи в области дефекта, приближенного по строению к первоначальной ее структуре [Velnar T. et al., 2009]. Известно, что процессы регенерации поврежденной ткани регулируются различными эндогенными факторами, такими как VEGF, KGF, FGF, EGF и др. [Maddaluno L. et al., 2017; Xu H.L. et al., 2017; Choi S.M. et al., 2018; Tsui H.Y. et al., 2018]. В данной работе в качестве активатора

регенерационных процессов использовались паракринные факторы мезенхимальных стволовых клеток (МСК), в состав которых входят перечисленные факторы в разном соотношении, в результате чего они обладают прорегенеративным, противовоспалительным и антиапоптотическим действиями [Khubutiya T.S. et al., 2014; Kim J.M. et al., 2018].

Цель исследования: выявить регенеративные и протекторные эффекты экзогенного пероксиредоксина 6 и паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток при лечении химических и механических травм кожи

Задачи исследования:

1. Провести сравнительную характеристику динамики регенерации кожного покрова при химическом ожоге и механической полнослойной кожной ране;
2. Оценить эффективность применения экзогенного пероксиредоксина 6 и паракринных факторов МСК на процессы регенерации тканей при лечении химического ожога и механической полнослойной кожной раны;
3. Оценить эффективность совместного применения экзогенного пероксиредоксина 6 и паракринных факторов МСК в процессе регенерации тканей при лечении химического ожога и механической полнослойной кожной раны.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты проведенных исследований имеют фундаментальное значение для расширения представлений о важности нейтрализации окислительного стресса в минимизации повреждения кожи и ускорения процессов пролиферации в процессе заживления ран различной этиологии.

Результаты данной работы могут быть применены при разработке препаратов для стимуляции процессов регенерации кожных повреждений различной этиологии.

Научная новизна

1. Впервые установлено протекторное и регенеративное действия экзогенного фермента-антиоксиданта пероксиредоксина 6 при заживлении химической и механической кожной раны, при этом антиоксидантный эффект пероксиредоксина 6 в процессе заживления ран кожи определяется его пероксидазной активностью.

2. Впервые выявлено мощное прорегенеративное действие паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток при заживлении как химической, так и механической кожной раны. Использование паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток увеличивало содержание фибробластов в ране и тем самым ускоряло процесс созревания грануляционной ткани, что способствовало сокращению сроков заживления ран.

3. Впервые показан эффект совместного применения фермента-антиоксиданта пероксиредоксина 6 и паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток на заживление химической и механической полнослойной кожной раны. Совместное использование пероксиредоксина 6 и паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток обеспечивает наиболее оптимальные условия для заживления ожоговых и механических ран.

Положения, выносимые на защиту

1. Как химический ожог, так и механическая полнослойная рана кожи в первые сутки вызывает разрушение тканей, которое сопровождается мощным окислительным стрессом, увеличением концентрации оксида азота и увеличением уровня клеточного апоптоза в пораженной коже.

2. Пероксиредоксин 6 в процессе заживления химической и механической кожной раны способствует нейтрализации окислительного

стресса, снижению уровня клеточного апоптоза, уменьшению концентрации воспалительных цитокинов, а также улучшению васкуляризации грануляционной ткани в пораженной коже.

3. Эффект пероксиредоксина 6 определяется его пероксидазной активностью, что показано при использовании его мутантного аналога P₆C47S, не обладающего пероксидазной активностью.

4. Паракринные факторы МСК в процессе заживления химической и механической кожной раны способствуют снижению уровня апоптоза и повышению пролиферации клеток, а также – к уменьшению концентрации провоспалительных цитокинов и увеличению содержания фибробластов в области раневого дефекта.

5. Совместное использование пероксиредоксина 6 и паракринных факторов МСК обеспечивает наиболее оптимальные условия для заживления ожоговых и механических травм кожи, а именно: подавляет окислительный стресс, уменьшает уровень апоптоза, увеличивает пролиферацию клеток, а также уменьшает концентрацию провоспалительных цитокинов в пораженной ткани, способствуя сокращению сроков регенерации в 2–3 раза и оказывая тем самым наилучший терапевтический эффект.

6. Эффективность используемых препаратов зависит от типа поражения кожи: пероксиредоксин 6 – при химическом ожоге кожи, препарат паракринных факторов МСК – при механической полнослойной кожной ране. Третий же препарат – комбинация фермента антиоксиданта пероксиредоксина 6 и паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток, – независимо от этиологии раны оказывает наилучшее терапевтическое действие.

Личный вклад автора

Все экспериментальные исследования, описанные в работе, статистическая обработка результатов, а так же анализ литературных данных выполнены автором самостоятельно.

Апробация диссертации

Материалы диссертации были представлены на конференциях: Всероссийская научная конференция с международным участием «Перспективы развития химических и биологических технологий в 21-м веке». Саранск, 2015; V съезд биофизиков России. Ростов-на-Дону, 2015; Российско-германский форум «Russian-German BioTech-2015». Пущино, 2015; II и III Национальный Конгресс по регенеративной медицине. Москва, 2015, 2017; XV Всероссийское совещание с международным участием и VIII школа по эволюционной физиологии. Санкт-Петербург, 2016; XXIV Международная молодежная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», секция «Физиология человека и животных». Москва, МГУ, 2017; 20 и 21-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пущино, 2016, 2017; V Съезд Российского общества патологоанатомов с международным участием. Челябинск, 2017; XXIII съезд Физиологического общества имени И. П. Павлова. Воронеж, 2017. Апробация диссертации была проведена на совместном заседании ФГБУН «Институт биофизики клетки» РАН и ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет».

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 17 печатных работ, в том числе 6 статей в рецензируемых журналах и 11 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 137 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 3 таблицами, 33 рисунками. Список литературы включает 203 источника (14 отечественных и 189 зарубежных).

I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Морфология, функции и особенности регенерации кожи

Кожа - самый большой орган тела. Она составляет около 15% от общей массы тела взрослого человека и обеспечивает защиту от внешних физических, химических и биологических агентов. Она также играет роль в терморегуляции. Кожа состоит из трех слоев: эпидермиса, дермы и гиподермы (подкожно-жировая клетчатка) (рис. 1).

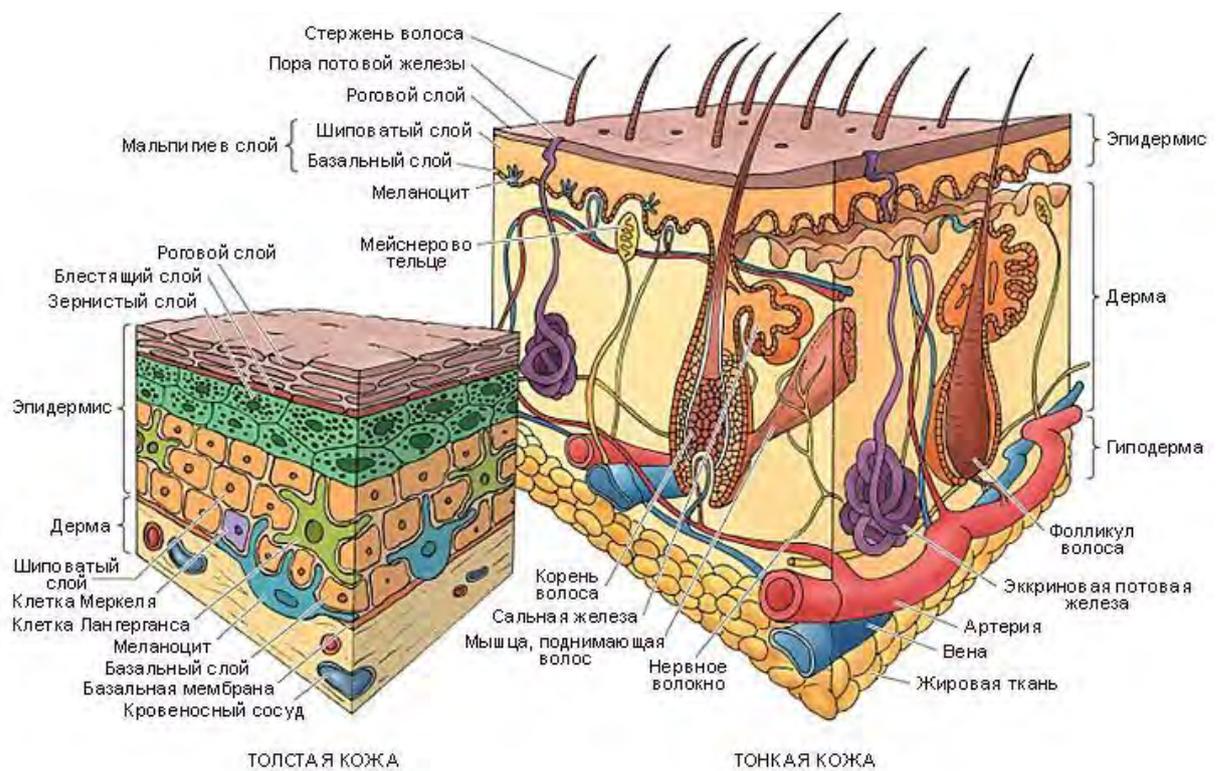


Рис. 1. Строение кожи [Gartner L.P. and Hiatt J.L.; 2007]

1.1. Морфология кожи

Кожа является высоко васкуляризированным органом. Существует обширная сеть кровеносных сосудов и капилляров, которые простираются от региональных отделений системного кровообращения до местных мест по всей кожной подкожной клетке и дерме, соответственно. Кроме того, существует обширная лимфатическая структура, которая протекает вдоль

многих кровеносных сосудов кожи, особенно тех, которые прикреплены к венозному концу капиллярных сетей. [Harvey C., 2005]

Эпидермис состоит из эпителиальных клеток. Среди этих клеток можно найти как живые клетки, так и мертвые (рис.2). Новые клетки на дне эпидермиса быстро делятся и подталкивают старые клетки вверх. В эпидермисе нет прямого источника кровеносных сосудов для обеспечения питания. Питательные вещества поступают в эпидермис за счёт диффузии необходимых молекул из сосудистой сети, лежащей в основе дермы. Эпидермальные клетки связаны десмосомами. Десмосомы находятся в контакте с внутриклеточными кератиновыми пленками, которые производят кератин. Кератиновые клетки накапливаются и сшиваются с другими кератиновыми клетками в цитозоле во время их созревания. После того, как более старые клетки погибают, эта сеть кератиновых фиброзов остается и обеспечивает мощный защитный слой в эпидермисе, называемый защитным ороговевшим слоем. Этот слой водонепроницаем и герметичен. Это предотвращает попадание и вывод большинства веществ. В пораженной коже, особенно ожогах, разрушается эпидермис, приводящий к потенциальной потере жидкости организма и повышению восприимчивости к микробным инфекциям, что приводит к смертельным последствиям [Sherwood L., 2007].

Типы клеток эпидермиса:

- Кератиноциты - это основные типы клеток в эпидермисе (95% клеток)
- Меланоциты - это клетки-пигменты-продуценты, которые обнаружены в базальном слое эпидермиса
- Клетки Лангерганса - эти клетки являются важными иммунологическими клетками, так же могут также находиться в дерме
- Клетки Меркеля - эти клетки находятся в базальном слое эпидермиса и являются частью системы предшественника амина и декарбоксилирования.

Эпидермис состоит из пяти слоев, а именно изнутри наружу: базальный, шиповатый, зернистый, блестящий и роговой слои (рис. 2).

Роговой слой является самым большим слоем эпидермиса и имеет толщину 10-20 мкм (в сухом состоянии) и 40 мкм (при гидратации). Роговой слой имеет структуру «кирпича и раствора». В этой модели кератин-богатые кератиоциты (кирпичи) сидят во внутриклеточной липид-богатой матрице (растворе) [El Maghraby G.M. et al., 2008]. Кератиоциты (кирпичи) создают 85% рогового слоя, а внутриклеточные липиды (15%). Роговой слой состоит из 70% белков, 15% липидов и только 15% воды [Nino M. et al., 2010].

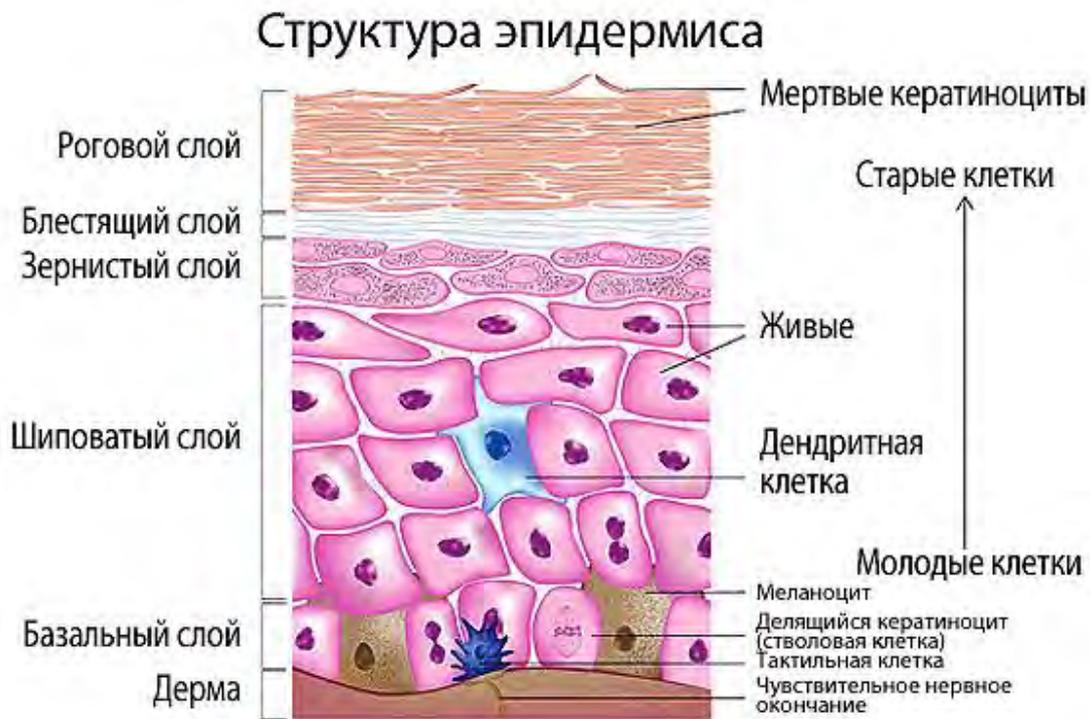


Рис.2. Структура эпидермиса [Бетехтин М.; 2016]

Молекулы могут проникать через кожу двумя разными путями. Первый путь называется трансэпидермальным маршрутом. На этом пути молекулы должны проникать сквозь кожу, проникая сквозь потовые железы и через волосяные фолликулы. Количество молекул, которые могут проникать через этот путь, очень ограничено. Вторым путем проникновения через кожу - это трансдермальным путем. В этом пути молекулы должны проходить через

роговой слой как многослойный барьер двумя способами: внутриклеточным и трансцеллюлярным путем [El Maghraby G.M. et al., 2008].

Базальная мембрана является границей между эпидермисом и дермой. Основными компонентами базальной мембраны являются коллаген типа IV, ламинин, протеогликан сульфата гепарина и энактин. Мезенхимальные и эпителиальные клетки секретируют компоненты базальной мембраны и, таким образом, ответственны за его синтез и развитие [Ko M.S. and Marinkovich M.P., 2010]. Хотя основная функция базальной мембраны заключается в закреплении клеток эпидермиса, лежащих в основе дермы, взаимодействия между компонентами базальной мембраны и эпителиальными клетками оказывают важное влияние на клеточную функцию, включая пролиферацию, миграцию и дифференцировку. Базальная мембрана также является значительным фактором ангиогенеза, и, таким образом, её белки ускоряют дифференцировку эндотелиальных клеток.

Дерма расположена под эпидермисом и характеризуется множеством эластиновых волокон, которые обеспечивают растягивающую способность, а также много коллагена, который обеспечивает прочность кожи. Кровеносные сосуды, обнаруженные в дерме, обеспечивают питательные вещества как для дермы, так и для эпидермиса. Дерма также играет важную роль в регулировании температуры. Нервные окончания, присутствующие там, ответственны за давление и болевые ощущения [Sherwood L., 2007].

Толщина дермы составляет 3-5 мм. Помимо эластиновых волокон, кровеносных сосудов и нервных окончаний, частью дермы также являются межфибриллярный гель гликозаминогликана, соли, воды, лимфатические клетки и потовые железы [El Maghraby G.M. et al., 2008].

Типы клеток дермы:

- Фибробласты - клетки, продуцирующие коллаген
- Макрофаги – защитные клетки
- Тучные клетки - ответственны за иммунологические реакции и взаимодействия с эозинофилами

Дерма играет важную роль по отношению к другим слоям кожи. Изменения в обмене веществ в дерме могут влиять на целостность роста эпидермиса, волосяных фолликулов и кожных желез [Noble W.C., 1993].

Гиподерма - это внутренний слой кожи, контактный слой между кожей и основными тканями тела, такими как мышцы и кости [Sherwood L., 2007].

Экзокринные железы кожи и волосяные фолликулы: потовые железы, сальные железы и волосяные фолликулы охватывают эпидермис, но они происходят из дермы. Потовые железы выпускают разбавленный солевой раствор на поверхность кожи, испарение этого раствора делает кожу прохладной, и это важно для регулирования температуры как тела, так и кожи. Потовые железы присутствуют по всему телу. Количество выделяемого пота зависит от температуры окружающей среды, количества тепловой генерации активности скелетных мышц и различных эмоциональных факторов. Сальные железы производят кожное сало. Кожное сало - жирная жидкость, выделяющаяся в волосяные фолликулы, а оттуда - на поверхность кожи, оно защищает волосы и кожу от высыхания и обеспечивает водонепроницаемый слой [Sherwood L., 2007].

1.2. Основные функции кожи

Основные функции кожи подразделяются на несколько широких категорий:

1. Защитная. Кожа обеспечивает физический барьер против термических и механических оскорблений, таких как силы трения и против большинства потенциальных патогенов и другого материала. Микроорганизмы, которые проникают в живые лимфоциты кожи и антигенпредставляющие клетки кожи и иммунный ответ. Темный пигмент меланин в эпидермисе защищает клетки от ультрафиолетового излучения. Селективная проницаемость кожи позволяет некоторым липофильным

препаратам, таким как определенные стероидные гормоны и лекарства, вводиться через участки кожи.

2. Сенсорная. Многие типы сенсорных рецепторов позволяют коже постоянно контролировать окружающую среду, а различные механорецепторы со специфическими местами кожи важны для взаимодействия организма с физическими объектами.

3. Терморегуляторная. Постоянную температуру тела обычно легче поддерживать благодаря изолирующим компонентам кожи (например, жировому слою и волосам) и его механизмам для ускорения потери тепла (производство пота и плотная поверхностная микроциркуляция).

4. Метаболическая. Клетки кожи синтезируют витамин D₃, необходимый для метаболизма кальция и правильного формирования костей, благодаря локальному воздействию ультрафиолетового света на предшественника витамина. Избыточные электролиты могут быть удалены с потом, а подкожный слой хранит значительное количество энергии в виде жира [Mescher A.L., 2016].

1.3. Особенности физиологической регенерации кожи

Физиологическая регенерация эпидермиса – это естественный процесс обновления клеток. Наружные слои эпидермиса заменяются в тысячу раз в течение человеческой жизни.

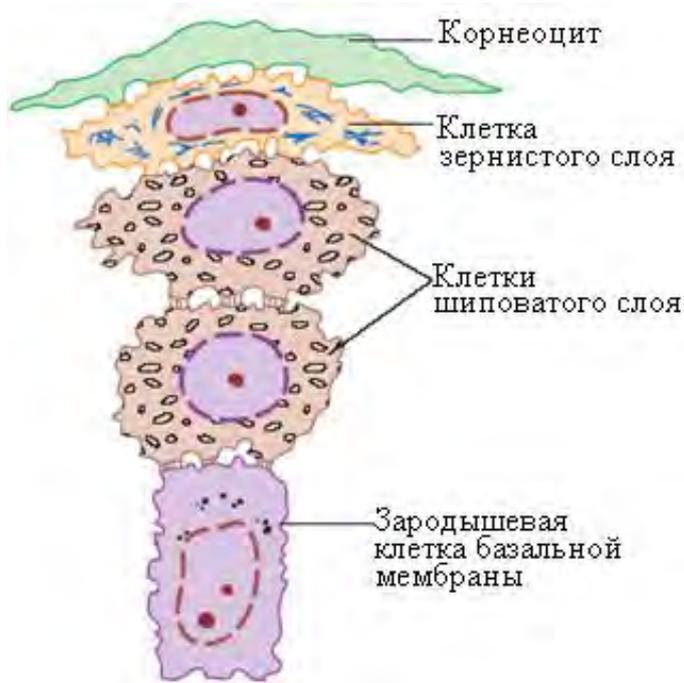


Рис. 3. Жизненный путь кератиноцита [Alberts B. et al., 2002]

Эпидермис постоянно обновляется путем производства новых клеток (кератиноцитов) в базальном слое. Кератиноциты находятся в постоянном движении (рис.3). Юные кератиноциты появляются при делении зародышевых клеток базальной мембраны, расположенной на границе эпидермиса и дермы. По мере взросления, кератиноцит из рогового слоя перемещается в верхние слои, сначала в шиповатый слой, затем в зернистый. При этом в клетке синтезируется и накапливается кератин, особо прочный белок. Достигнув зернистого слоя, кератиноциты начинают терять свое ядро и цитоплазматические органеллы через механизм деградации, который включает частичную активацию аппарата апоптоза; таким образом, клетки превращаются в корнеоциты - плоские чешуйки, образующие роговой слой, отвечающие за барьерную функцию эпидермиса. Корнеоцит, достигнув поверхности кожи, отшелушивается, а его место занимает новый. Обычно жизненный путь кератиноцита длится 2 - 4 недели. В молодом возрасте процесс обновления кератиноцитов идет более активно, а с возрастом замедляется [Alberts B. et al., 2002].

2. Кожные раны и их классификация

2.1. Классификация ран

Классифицировать раны в зависимости от решаемых задач можно по разным признакам. В данной работе раны будут классифицироваться по повреждающему фактору. По повреждающему фактору раны принято разделять на:

Механические (травматические) раны возникают в результате самых различных физических воздействий (операционные раны, раны военного времени и т. д.).

В ране различают края, стенки, дно и полость. Края раны - кожа, стенки - фасция, рыхлая соединительнотканная клетчатка, мышцы и другие тканевые структуры. Дно, в зависимости от глубины и локализации раны, может состоять из мягких тканей или кости.

Термические и химические раны возникают в результате воздействия тепла и холода, повреждающего ткани излучения, действия кислот или щелочей.

Ожоговые раны кожи приводят к потере её защитной функции в качестве барьера для микроорганизмов, приводящих к высокому риску заражения. Таким образом, пациент с ожоговой раной сталкивается с высокой заболеваемостью, чаще всего приводящей летальным исходом. Правильное лечение ожогов важно, поскольку могут возникнуть такие проблемы, как инфекция, электролитный дисбаланс, шок и респираторные заболевания. Лечение ожога включает в себя удаление мертвых тканей, перевязку раны, восстановление жидкости, введение антибиотиков и прививку кожи [Patric R.M. and Gregory R.D., 2012].

Трофические язвы кожи. В отличие от острых ран они обычно возникают не из-за травматических воздействий извне, а из-за локальных нарушений питания кожи, вызванных сосудистыми расстройствами венозной, артериальной природы или воздействием длительного локального давления.

2.2. Химический ожог

Химические ожоги являются одними из тяжелейших травм человека и представляют собой повреждение тканей при непосредственном воздействии агрессивных химических агентов. Основными веществами, вызывающими ожоги, являются химически активные вещества (щёлочи, кислоты, гидроперекиси и т.д.) и тяжесть поражения кожи и слизистых оболочек при химическом ожоге зависит от типа химического агента, его концентрации и длительности его действия на ткани.

По данным Всемирной Организации Здравоохранения термические ожоги занимают третье место среди прочих травм, в Российской Федерации на их долю приходится 10 – 11%. Химические ожоги происходят гораздо реже, чем термические, и составляют по данным разных авторов от 2,4% до 10,7% случаев в общей структуре ожогового травматизма [Hardwicke J. et al., 2012].

При воздействии на кожу концентрированных кислот и щелочей происходит быстрая денатурация белков поверхностных тканей и как следствие — нарушение постоянства внутренней среды клеток и их гибель. Клиническим проявлением химического ожога является некроз, возникающий практически немедленно после попадания кислоты или щелочи на кожу [Cartotto R.C. et al., 1996; Stewart C.E., 1985; Sykes R.A. et al., 1986]. Разрушение ткани под влиянием химического вещества продолжается и после прекращения непосредственного соприкосновения с ним, так как всасывание химического вещества на обожженном участке продолжается еще некоторое время.

При химических ожогах лечение, прежде всего, направлено на возможно быстрое удаление или уменьшение концентрации химического агента и на нейтрализацию его, а в последующем на ускорение регенерации. Один из важных факторов лечения ожога — обеспечение адекватных комфортных условий для собственной регенерации. Повысить качество лечения пациентов с ожогами различной этиологии возможно путем совершенствования методологии местной терапии в зависимости от фазы течения раневого процесса, за счет разработки эффективных антимикробных средств, раневых повязок, [Sterling et al., 2010].

3. Особенности заживления ран и современные препараты

3.1. Механизмы заживления ран

Механизмы заживления ран можно разделить на три категории:

Заживление первичным натяжением является типичным в случаях, когда края раны соприкасаются. Эти раны заживают самостоятельно и приводят к образованию рубцов, ориентированных вдоль линий Лангера (выравнивание коллагеновых волокон внутри дермы) [Atiyeh B.S. et al., 2002]. Заживление первичным натяжением возможно при условиях: небольшой зоне повреждения, плотном соприкосновении краев раны, сохранении их жизнеспособности, отсутствии очагов некроза и гематомы, асептичности раны. Морфологическая картина заживления первичным натяжением сводится к незначительно выраженным гиперемии и отеку тканей в стенках раны, пролиферации фибробластов и новообразованию капилляров путем эндотелизации каналов и щелей в сгущающемся фибрине (аутохтонный механизм) от одного края раны к противоположному. Очень быстро, уже к 6—8-м суткам, грануляционная ткань прочно соединяет стенки раны; к этому времени обычно заканчивается и эпителизация.

Заживление вторичным натяжением. (заживление через нагноение, заживление через гранулирование) происходит в определенных условиях: при ранах с обширной зоной повреждения, наличии в ране нежизнеспособных тканей, гематомы, развитии инфекции. Такие раны заживают естественным репаративным процессом через грануляцию [Atiyeh V.S. et al., 2002]. Фазы заживления обычно более выражены, чем при первичном натяжении, и обычно приводят к увеличению образования рубцов. Механизм заживления раны отражает репаративную регенерацию — биологический процесс восстановления тканей, прерванного внешним воздействием (в отличие от восстановления тканей после физиологических процессов). При вторичном заживлении эпителизация отсутствует до тех пор, пока не завершится полностью замещение раневого дефекта грануляциями до уровня кожи.

Заживление под струпом (третичным натяжением) происходит при незначительных повреждениях типа поверхностных эксфолиаций только кожи или даже эпидермиса, возникающих при ссадинах, потертостях, ожогах I—II степени. Раневой процесс начинается свертыванием излившейся крови, иногда одной лишь лимфы, которая подсыхает с образованием струпа. Первичное или третичное заживление ран предпочтительнее вторичного заживления, поскольку вторичное натяжение предполагает более тяжелое и длительное сокращение раны и образование рубцов.

3.2. Фазы заживления ран и их особенности

Заживление ран в коже инициируют фибробласты, которые образуют временную тканевую матрицу. За этим следует воспаление и повторная эпителизация кератиноцитами. Дальнейшая реваскуляризация раны, наряду с образованием внеклеточного матрикса, ангиогенезом и ремоделированием, завершается заживлением и восстановлением раны [Harvey C., 2005; Wu et al., 2007] (рис.4).

Раны, которые не проходят через упорядоченное и своевременное восстановление структурной и функциональной целостности, часто приводят к хроническим. Как правило, сосудистая недостаточность, влияние местного давления и состояния, такие как сахарный диабет, наряду с нарушением питания или иммунологическим статусом, являются основными причинами незаживающих ран кожи. На заживляющую способность раны влияет старение, что приводит к снижению прочности и эластичности кожи, снижению притока крови к конечностям и психологическому стрессу [Cole-King A. and Harding, K.G., 2001; Walburn J. et al., 2009].

После повреждения кожи поврежденная ткань восстанавливается посредством координированной передачи сигналов, которая представляет собой реакцию кожного заживления. Этот кожный ответ протекает в три этапа: воспалительная фаза, фаза пролиферации и фаза ремоделирования (рис.1).

Воспаление. Воспалительная фаза заживления раны обычно начинается сразу после ранения [Gurtner G.C. et al., 2008] и длится в течение первых четырех дней [Rhett J.M. et. al., 2008]. Данная фаза начинается с коагуляции крови (гемостаза) (рис. 4А), что приводит к образованию сгустка крови, который обеспечивает временный щит против патогенов, а также потерю жидкости. В то время как сгусток крови временно закрывает рану, тромбоциты секретируют цитокины и факторы роста (например, PDGF, EGF, TGF- β 1 и 2), которые инициируют воспалительную реакцию [Diegelmann R.F. and Evans M.C, 2004] (рис.4Б). За этим следует увеличение кровотока в областях, прилегающих к ране, сопровождающееся набуханием и краснотой из-за повышенной проницаемости сосудов местными воспалительными агентами, приводящими к экстравазации плазмы и образованию фибриновой матрицы [Harvey C., 2005]. Из-за накопления воспалительных медиаторов и простагландинов, TNF- α , TNF- β , IL-1, TGF- β инициируют скопление нейтрофильных гранулоцитов и макрофагов в области раны. Моноциты мигрируют в отечную область, и с течением времени

накапливается достаточное количество макрофагов для перехода раны от воспалительной фазы к фазе грануляции. Они стимулируют, с одной стороны, ангиогенез через VEGF, FGF и TNF- α , а также образование соединительной ткани через различные медиаторы и синтезируют оксид азота [Witte M.B. and Barbul A., 2002]. Нейтрофильные гранулоциты являются первыми лейкоцитами в ране. Они удаляют зараженные патогены фагоцитозом и дополнительными провоспалительными цитокинами, например, IL-1 и TNF- α , а также выделяют АФК [Yager D. R. and Nwomeh B. C., 1999; Segal A.W., 2005; Wild T. and Auböck J., 2007]. Моноциты, проникающие в зону ранения, дифференцируются в макрофаги. Эти фагоцитарные патогены, а также мертвые нейтрофильные гранулоциты и инициируют фазу грануляции путем секреции дополнительных цитокинов и факторов роста [Mahdavian Delavary B. et al., 2011].

Пролиферация. После воспалительной фазы, в промежутке между 5-20 сутками, стимулируется пролиферация сосудистых эндотелиальных клеток и фибробластов за счет секреции факторов роста воспалительными клетками (рис. 4В). Матрица фибрина постепенно замещается коллагеном, секретиремым фибробластами. Фибробласты могут дифференцироваться в миофибробласты, экспрессирующие актин, что приводит к сокращению и уменьшению площади раны. Смежные здоровые ткани, а также эндотелиальные предшественники инициируют ангиогенез, что приводит к инвазии в сосудистые эндотелиальные клетки и капилляры и как следствие, к образованию «грануляционной ткани» [Harvey C., 2005]. Гипоксия в ткани вызывает высвобождение оксида азота (NO) из эндотелиальных клеток, которые, в свою очередь, стимулируют их собственное высвобождение VEGF и вызывают расширение кровеносных сосудов с протекторным эффектом для ткани [Goldman и др., 2004; Witte M.B. and Barbul A., 2002]. Затем следует миграция кератиноцитов с краев раны на поверхность грануляционной ткани ниже кровяного сгустка [Usui M.L. et al., 2008; Rhett, J.M. et al., 2008]. Фаза миграции завершается, как только кератиноциты,

мигрирующие с полей раны, касаются центра раны, образуя однослойный клеточный слой. Фибробласты, привлеченные с помощью PDGF и EGF из тромбоцитов и макрофагов в рану, пролиферируют, а также синтезируют временный коллаген типа III (позже также коллаген типа I). Обработанный коллаген накапливается в коллагеновых фибриллах, которые на следующей стадии сшиваются ферментами лизилоксидазой и тем самым значительно стабилизируются [Canty E.G. and Kadler K.E., 2005].

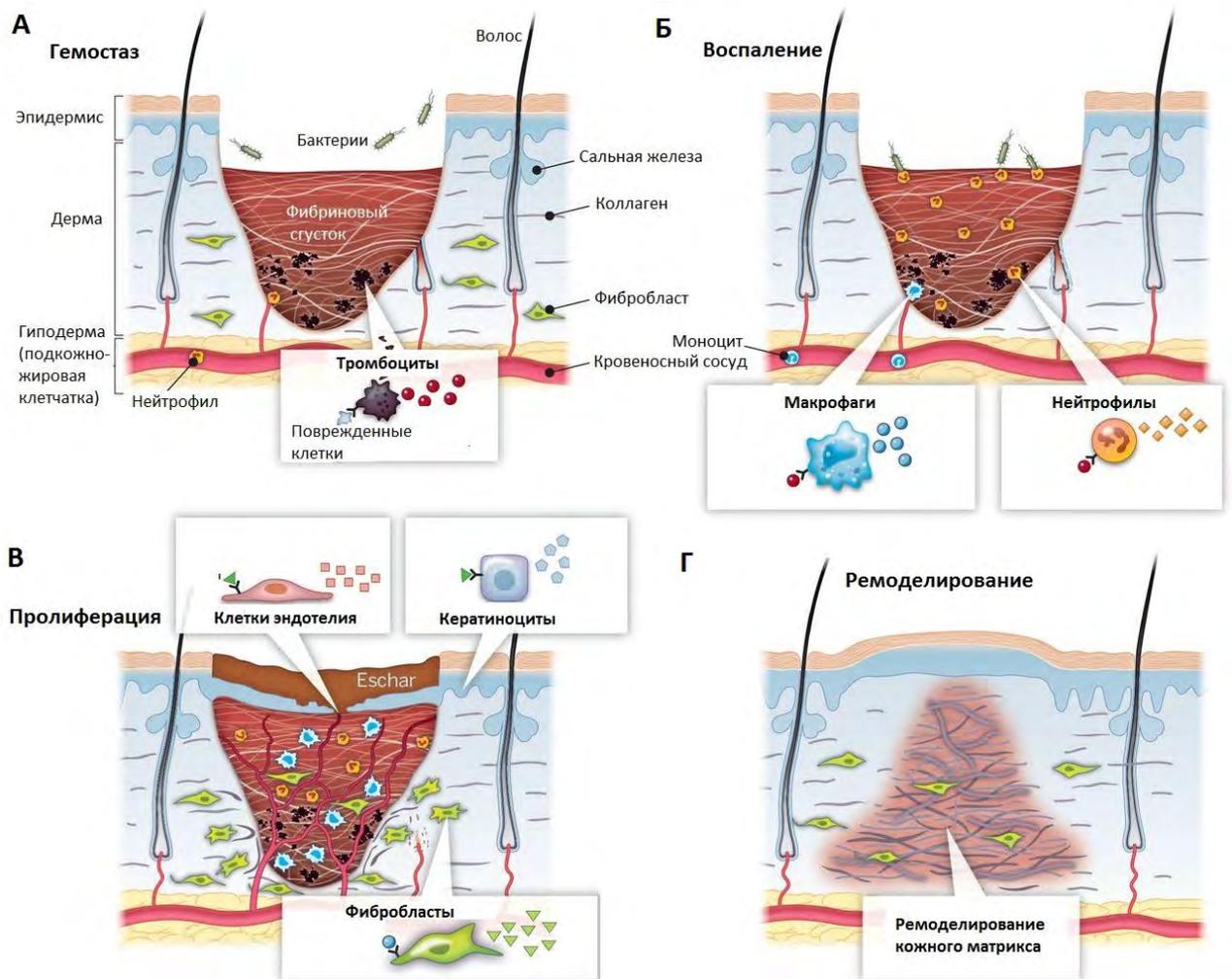


Рис.4. Стадии (фазы) заживления ран [Sun B.K. et al.; 2014]

Лечение ран классически разделяется на четыре стадии: (А) гемостаз, (Б) воспаление, (В) пролиферацию и (Г) ремоделирование. Каждый этап характеризуется ключевыми молекулярными и клеточными механизмами и координируется множеством секретируемых факторов.

Ремоделирование. Так без всякого перехода начинается третья фаза течения раневого процесса фаза реорганизация рубца и эпителизация. В процессе рубцевания коллаген типа 3, преимущественно синтезированный в фазе грануляции, ферментативно деградирует и заменяется коллагеном типа 1 [Li M. et al., 2009; Gurtner G.C. et al., 2008]. Это превращение коллагена с дополнительным переплетанием коллагеновых фибрилл приводит к увеличению механической несущей способности раны. Трансформация ткани осуществляется матричными металлопротеиназами, активность которых контролируется концентрацией факторов, таких как IL-1, PDGF, TGF- β и EGF в ткани. Напротив, IL-6 и TGF- β стимулируют высвобождение металлопротеиназ из фибробластов, что снижает активность протеиназ металлических матриц [Henry G. and Garner W.L., 2003]. Во время последней фазы, ремоделирования, происходит повторная эпителизация раны (рис. 4Г), а дерма восстанавливает свою прочность. Тем не менее, шрам может оставаться от нескольких месяцев до нескольких лет [Harvey C., 2005].

3.3. Митоз и миграция клеток в процессе заживления ран

Метаболически активные клетки базального слоя, способные участвовать в процессе заживления ран, по-видимому, обладают неограниченным потенциалом митотического деления, который в нормальных условиях подавляется тканеспецифическими ингибиторами, так называемыми кейлонами, но в случае повреждения проявляется в полной мере. Таким образом, если после повреждения эпителия внеклеточный уровень кейлонов резко падает в результате потери многочисленных кейлонопродуцирующих клеток в области раны, проявляется соответственно высокая митотическая активность клеток базального слоя и запускается необходимый для закрытия дефекта процесс клеточного размножения.

У миграции клеток тоже есть свои особенности. В то время как при физиологическом созревании эпидермиса клетки мигрируют из базального слоя к поверхности кожи, репаративное замещение клеток происходит путем

перемещения клеток в горизонтальном направлении в сторону противоположного края раны. Эпителизация, идущая от края раны, начинается немедленно с момента нарушения целостности эпидермиса. Оторванные друг от друга эпителиальные клетки за счет активных амебовидных движений, напоминающих движения одноклеточных, ползут навстречу друг другу, пытаясь закрыть разрыв. Однако это удается только в случае поверхностных ран. При всех других ранениях кожи миграция эпителия края раны связана с заполнением тканевого дефекта грануляционной тканью, так как клетки эпителия не проявляют никакой тенденции спускаться в углубление или раневой кратер — они могут ползти только по ровной, плоской поверхности. Миграция расположенных на краю клеток идет не равномерно, а этапами, вероятно связанными с состоянием грануляции в ране. За первоначальным нарастанием краевого эпителия следует фаза утолщения исходного однослойного эпителия за счет надвигания клеток друг на друга. С этого момента быстро становящиеся многослойными эпителиальные покрытия становятся более прочными и плотными.

Заключительная фаза заживления раны в зависимости от морфологии тканей продолжается от нескольких недель до года. Длительность течения фазы созревания зависит от различных факторов, в том числе от генетических особенностей пациента, его возраста, локализации раны, типа травмы, срока существования воспалительного процесса [Бордаков В.Н., 2014].

3.4. Сигнальные пути во время заживления ран

После травмы клетки, участвующие в заживлении ран, взаимодействуют друг с другом для координации самых разнообразных задач. В процессе взаимодействия во время заживления раны преимущественно участвуют два типа клеток: кератиноциты и фибробласты [Werner S. et al., 2007].

На ранних стадиях после травмы провоспалительные медиаторы, такие как IL-1 с кератиноцитом, доминируют в взаимодействиях кератиноцитов и фибробластов. В это время активность TGF- β сильно повышается в кокультурах фибробластов кератиноцитов, но активация NF κ B в фибробластах блокирует передачу сигналов TGF- β . IL-1 реагирующие гены, такие как гены для связывания EGF, KGF, IL-6, эндотелин-1 (ET-1) и гранулоцитарно-макрофагально колониестимулирующий фактор (GM-CSF) активируются в фибробластах. Эти факторы могут затем стимулировать пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов. Субстратные мембранные компоненты экспрессируются как кератиноцитами, так и в меньшей степени фибробластами. В середине фазы взаимодействия кератиноцитов и фибробластов баланс эффектов, вызванных кератиноцитом IL-1 и TGF- β , начинает меняться. Активация NF κ B в фибробластах снижается, и экспрессия гена TGF- β -зависимого гена становится выше. Фибробласты начинают увеличивать синтез компонентов базальной мембраны. Механическое натяжение сильно развито в фибробластах в непосредственной близости к кератиноцитам. IL-1, полученный из кератиноцитов, все еще присутствует, но оставшаяся активация NF κ B в фибробластах, по-видимому, лишь незначительно блокирует передачу сигналов TGF- β . Компоненты базальной мембраны сильно выражены в фибробластах и способствуют образованию организованной зоны базальной мембраны. [Werner S. et al., 2007].

3.5. Окислительный стресс и регенерация раны

Клетки в аэробных организмах постоянно производят активные формы кислорода (АФК) во время нормальных метаболических процессов, и их производство повышается при патологических состояниях. В то время как АФК поддерживают различные физиологические процессы, они часто вызывают опасный для жизни ущерб. В процессе заживления ран физиологическая роль и молекулярные механизмы реакций, связанных с

АФК, были исследованы при различных патологиях [Sen C.K. and Roy S., 2008; Schäfer M. and Werner, S., 2008]. В частности, хорошо изучена патологическая роль АФК в воспалительной фазе. В воспалительной фазе нейтрофилы и макрофаги, достигая раневого поражения, начинают выделять большие количества АФК наряду с провоспалительными цитокинами [Goldman R., 2004] и протеолитическими ферментами, такими как матриксная металлопротеиназа [Gill S.E. and Parks W.C., 2008]. NADPH-оксидаза экспрессируется на высоких уровнях в плазматических мембранах воспалительных клеток и активируется во время фагоцитоза, что приводит к получению большого количества супероксидных радикальных анионов [Bedard K. and Krause K.H., 2007]. Сгенерированные АФК непосредственно атакуют инвазивные патогены и убивают их, чтобы помочь фагоцитозу. Однако чрезмерно продуцируемый супероксид повреждает окружающие ткани. Супероксид дисмутируют до перекиси водорода (H_2O_2) и молекулярного кислорода либо супероксиддисмутазой (SOD), либо спонтанной реакцией. H_2O_2 детоксифицируют пероксидазами, такими как каталаза, глутатионпероксидаза (GPX) и пероксиредоксин (Prx), чтобы избежать реакции Фентона, которая возникает в присутствии ионов переходных металлов, таких как железо или медь, и образует гидроксильные радикалы, наиболее вредные АФК.

По сравнению с иммунными клетками, АФК продуцируются другими клетками на гораздо более низких уровнях. Низкие уровни АФК играют физиологическую роль, в частности, как клеточную сигнализацию [Rhee S.G., 2006; Marinho H.S. et al., 2014]. Роль сигналов АФК в ангиогенезе хорошо изучена [Bretón-Romero, R. and Lamas, S., 2014]. Умеренные уровни H_2O_2 регулируют производство фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), ключевого ангиогенного фактора роста в кератиноцитах и приводят к ускорению ангиогенеза [Roy S. et al., 2006]. Оксиды кислорода играют решающую роль в модулировании пролиферации сосудистых эндотелиальных клеток, но они дифференцируются в васкулогенезе

посредством генерации АФК [Jiang F. et al., 2011]. АФК также участвуют в эпителизации. H_2O_2 запускает активацию рецепторов эпидермального фактора роста (EGF) и фактора роста кератиноцитов (KGF) [Marchese C. et al., 2003] и индуцирует продукцию $TGF\alpha$ (члена EGF) в фибробластах [Vivekananda J., 1994]. Таким образом, H_2O_2 может поддерживать миграцию и пролиферацию эпидермальных клеток. Сигнальная роль H_2O_2 на самом деле демонстрируется *in vivo* [Niethammer P. et al., 2009]. Так, происхождение H_2O_2 объясняется активностью двойной оксидазы (Duox) в эпителиальных клетках. Снижение концентрации Duox1 уменьшает производство H_2O_2 вокруг места раны и одновременно ухудшает поставку лейкоцитов на место раны. Однако чрезмерное количество АФК оказывают замедляющее действие на ангиогенез. В некоторых ферментах, участвующих в сигнальных путях, таких как фосфотирозинфосфатаза, сульфгидрильные остатки, которые действуют как каталитический центр, очень чувствительны к окислительной модификации и имеют тенденцию страдать от окислительной инактивации [Cho S.-H. et al., 2004].

Таким образом, избыточное количество АФК сигнализирует о несбалансированном редокс-гомеостазе, что приводит к нарушению заживления ран. Диабет, старение, иммунодефицит и недоедание являются типичными причинами отсроченного заживления ран. В этих патологических состояниях возникает окислительно-восстановительный дисбаланс и наблюдается повышенное окислительное повреждение [Rasik A.M. and Shukla A., 2000].

3.6. Современные препараты для лечения кожных ран

Чтобы точно выбрать способ лечения той или иной раны, необходимо точно оценить поражение, тщательно идентифицируя стадию заживления [Das S. and Baker A.B., 2016]. Кроме того, оценка преимуществ и затрат является одним из аспектов, которые следует учитывать при выборе типа

лечения, который должен соответствовать характеру, расположению и размеру раны. Несмотря на то, что существует широкий выбор средств для регенерации кожных покровов, ни один тип не соответствует требованиям, предъявляемым ко всем типам кожных поражений. [Brölmann FE. et al., 2012; Dissemond J. et al., 2012; Heyer K. et al., 2013; Klein S. et al., 2013]. Кроме того, обычно возникает необходимость применения дезинфицирующих и антисептических средств для предотвращения бактериального и механического загрязнения раны.

Альгинат (альгинатные повязки) состоят из рыхлой повязки. После контакта с натриевыми солями, присутствующими в крови или в раневых выделениях, альгинатные волокна поглощают выделения для образования влажного гидрофильного геля [Walker M., 2003]. Альгинаты используются для глубоких ран, либо для их очистки или содействия грануляции. Согласно исследованию, ионы кальция, присутствующие в альгинатах, увеличивают пролиферацию фибробластов. Отсутствие кальция в экссудате вызывает быструю деградацию альгинатного геля, в то время как наличие определенной концентрации кальция предотвращает деградацию геля в течение одного месяца [Wang L., 2003].

Гидрогели - это препараты, содержащие до 95% воды, наряду с органическими добавками, такими как пектин и крахмал, или желирующие агенты. Гидрогели могут обеспечивать влагу ране, а также абсорбировать избыточный раневой экссудат. Они особенно подходят для сухих ран, чтобы облегчить аутолитическую деменцию. Гидрогели можно также комбинировать с различными другими перевязочными материалами, чтобы сохранить эти или другие структуры влажными. Однако гидрогели имеют низкую механическую прочность и, следовательно, могут привести к накоплению жидкости и разрушению здоровых тканей [Blair S. D., 1990].

Гидроколлоидные повязки состоят из комбинации гелеобразующих агентов (карбоксиметилцеллюлоза, желатин и пектин), эластомеры и адгезивы. Когда повязка поглощает экссудат раны, гидроколлоидная масса

сжижается с образованием вязкого геля. В форме геля они быстро становятся проницаемые для воздуха и воды. Гидроколлоиды используются главным образом для поверхностных ран с небольшим количеством экссудатов, для содействия гранулированию или эпителизации [Inngjerdigen K., 2004].

Губчатые (абсорбирующие) повязки состоят из полиуретановой пены и имеют клейкие границы. Повязки поддерживают оптимальную влажную среду с теплоизоляцией, обладают хорошими абсорбирующими свойствами и удобны для ношения [Lay-Flurrie K., 2004]. Пористая структура повязок делает их гибкими в использовании. Они могут использоваться для лечения полнослойных кожных ран, также используются для лечения гранулирующих ран [Martin L., 2002]. Из-за влагопоглощающих и изоляционных свойств, они используются в качестве первичных раневых повязок.

Хитозан является биополимером, который получен из хитина. Он доступен в раневых повязках или в виде спрея. Считается, что он способствует различным аспектам заживления ран, учитывая его положительно заряженную поверхность. Продукты хитозана могут использоваться на всех этапах обработки раны после выполнения адекватной оценки. Они также могут быть использованы для достижения гемостаза после хирургического вмешательства. Хитозановые повязки превосходят по свойствам синтетические [Mian M., 1992].

Гиалуроновая кислота образует гидрофильный гель при контакте с раневым экссудатом. Средства, содержащие гиалуроновую кислоту, часто используются для ран с большим количеством экссудатов для содействия грануляции и для очистки раны. В зависимости от типа раны и количества экссудата гиалуроновая кислота может применяться в сухой форме или в сочетании с раствором Рингера; образование геля абсолютно необходимо для высвобождения гиалуроновой кислоты. Также были получены пленки гидрогеля сшитой гиалуроновой кислоты [Ishihara M., 2002].

Гемоглобин (свиной) в форме аэрозоля - инновационный продукт, который может быть нанесен непосредственно на раневую поверхность вместе с обычными продуктами раны. Предполагается, что аэрозоль переносит кислород из воздуха в рану и, следовательно, подходит для всех типов гипоксических ран [Arenbergerova M. et al., 2013].

Протеолитические ферменты безопасны, быстро и легко применяются. Однако лечение может занять очень много времени. В настоящее время доступна мазь с коллагеназой и гель со стрептодормазой / стрептокиназой. Препараты наносят после механической раневой очистки слоем 2-5 мм.

Искусственная кожа заменяет потерянную ткань, а также облегчают заживление ран [Luo Y., 2000]. Сообщается, что использование «умных» полимеров в естественной биологической форме или полусинтетических формах может имитировать нормальные физиологические реакции во время заживления ран [Voinchet V., 2006]. Тканевые синтетические заменители кожи можно классифицировать как бесклеточные и содержащие клетки. Ацеллюлярные производятся либо из синтетического коллагена, либо в сочетании с гиалуроновой кислотой [Pruitt B.A. and Levine N.S., 1984]. Когда они вводятся в организм, начинают разлагаться и оставляют за собой матрицу соединительных тканей, имеющих сходные с кожей свойства [Andreadis S. T., 2006]. Сообщалось о воздействии коллагена на заживление кожной раны и его комбинацию с антимикробными агентами [Horch R.E., 2005]. Было замечено, что оно увеличивало образование грануляционной ткани во время заживления ран. К недостаткам относятся высокие затраты, связанные с производством тканеинженерных заместителей кожи, этические проблемы, касающиеся культур клеток и риск заражения.

Факторы роста играют важную роль в процессе нормального заживления ран [Werner S. and Grose R., 2003]. Таким образом, местное введение ростовых факторов непосредственно в рану интенсивно изучалось как потенциальная регенеративная терапия, особенно для незаживающих ран.

GF, EGF, PDGF, TGF- β и FGF-7 (также называемые фактором роста кератиноцитов, KGF) были рассмотрены как потенциальные агенты для терапии [Hardwicke J. et al., 2008; Mansbridge J., 2008]. Однако для клинического применения имеется только несколько одобренных FDA продуктов. Regranex gel содержит человеческие рекомбинантные PDGF и производится с использованием технологии рекомбинантной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Он способствует ангиогенезу и ускоряет заживление ран при диабетических язвах [Sibbald R.G. et al., 2003]. Другой продукт под названием AutoloGel™ содержит аутологичные PDGF, полученные из собственной крови пациента [Driver V.R. et al., 2006]. В рандомизированном клиническом исследовании было показано, что хронические раны положительно реагируют на лечение AutoloGel™ [Carter M.J. et al.; 2011]. Существуют некоторые ограничения, связанные с терапией факторами роста. Прежде всего, не ясно, эффективно ли применение одного фактора роста или смеси. С другой стороны, производство рекомбинантных ростовых факторов является очень трудоемким и дорогостоящим. Еще одна серьезная проблема заключается в том, что протеолитические ферменты в экссудате раны могут лизировать применяемые белки. Таким образом, количество факторов роста, вводимых в рану, должно быть большим, чтобы получить какой-либо эффект. Например, лечение Regranex требует дозы 100 мкг/см² через день [Niezgoda J.A. et al., 2005].

В настоящее время используемые факторы роста так же включают тромбоцитарный фактор роста (PDGF), который доступен в виде геля (Regranex™, Janssen-Cilag) для лечения синдрома диабетической стопы, а также эпидермального фактора роста (EGF) (Neoderm™, Trimedicales) [Perry V.H. et al., 2002].

Антиоксиданты. Существует ряд исследований, которые показали потенциальное снижение времени заживления ран, связанное с местным применением антиоксидантов. В борьбе с АФК участвуют как неферментативные, так и ферментативные антиоксиданты [Halliwell B., 1996].

Низкомолекулярные соединения, например, глутатион, билирубин, убихинон, витамин С (аскорбиновая кислота), витамин Е, каротиноиды и фенольные соединения, функционируют как неферментативные антиоксиданты. Антиоксидантные ферменты включают SOD, GPX, PRDX и каталазу. Кроме того, гемоксигеназа (HO) также оказывает косвенную защитную роль против окислительного стресса. По сравнению с небольшими антиоксидантными соединениями антиокислительные ферменты обладают следующими преимуществами. Например, эффективность пищевых антиоксидантов в значительной степени зависит от количества потребления и скорости превращения в активную форму в желудочно-кишечном тракте [Ratnam D.V. et al., 2006]. Кроме того, неферментативные антиоксиданты реагируют с ROS стехиометрически и после реакции превращаются в неактивные формы. Действительно, в кожных ранах у грызунов уровни витамина Е, С и глутатиона значительно снижаются по сравнению с здоровой кожей [Shukla A., 1997]. С другой стороны, антиоксидантные ферменты, обильно присутствующие в коже, особенно SOD, PRDX, GPX и каталаза, играют важную роль в детоксикации АФК в коже во время процесса заживления ран.

Другие средства. Цель средств, содержащих коллаген и целлюлозу (Promogran™; Systagenix), нано-олигосахаридный фактор (NOSF, UrgoStart™, Urgo) или полигидратированные ионогены (PHI-5, Tegaderm™ Matrix, 3M), заключается в прямом снижении матричных металлопротеиназ (MMP) [Meaume S. et al., 2012; Weindorf M. et al., 2012]. В настоящее время также предлагается тестовая процедура (Woundchek™; Systagenix) для обнаружения повышенных уровней различных протеаз. Существует также паста, содержащая модифицированный крахмал (полоксамер), который предназначен для снижения уровня pH раны (Cadexomer™, Smith & Nephew) [Körber A., 2006].

Другие средства содержат, например, амелогенин внеклеточного матрикса (Xelma™, Mölnlycke) [Vowden P. et al, 2006], фактор свертывания

XIII (Fibrogrammin™, CSL Behring) [Wozniak G. et al., 2002], анальгетик ибупрофен (Biatain Ibu™, Coloplast) [Gottrup F. et al., 2008], тензиды (Polymem™, Mediset) или отрицательно заряженные микрочастицы (PolyHeal™, Mediowound). Многие из основных идей и терапевтические подходы, связанные с этими продуктами для ухода за ранами, очень интересны. Однако в настоящее время все еще не хватает научных данных, и для подтверждения их клинической эффективности требуются высококачественные и контролируемые клинические испытания [Heyer K. et al., 2013; Klein S. et al., 2013; Palfreyman S.J. et al., 2006].

4. Окислительный стресс и антиоксидантные системы кожи

Взаимодействуя с окружающей средой, кожа постоянно подвергается механическим и химическим повреждениям, которые в свою очередь сопровождается формированием активных форм кислорода (АФК), таких как перекись водорода, оксирадикалы или органические гидропероксиды. Активные формы кислорода – продукты нормального клеточного метаболизма, которые включены в физиологические процессы.

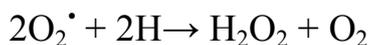
Эндогенные АФК образуются в ходе общих метаболических процессов, например, в дыхательной цепи. Особенно большие количества АФК продуцируются воспалительными клетками в раненых и воспаленных тканях в качестве защиты от бактериальной инфекции [Darr D. and Fridovich I., 1994; Thannickal V.J. and Fanburg B.L., 2000]. Поскольку чрезмерное накопление АФК может привести к старению клеток, тяжелым повреждениям клеток и даже злокачественной трансформации, клетки кожи содержат в себе ряд антиоксидантных ферментов для противодействия окислительному стрессу и поддержания их окислительно-восстановительного баланса. Особое значение имеет экспрессия АФК-детоксицирующих ферментов. К последним относятся, например, различные

типы глутатионпероксидаз, супероксиддисмутаз (SOD), а также пероксиредоксины (Prx).

4.1. Ферменты-антиоксиданты и их роль в заживлении кожных ран

Супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы объединяют в первую линию защиты от АФК. Она предусматривает детоксикацию потенциально опасных АФК: O_2^- и H_2O_2 , что позволяет предотвратить образование гидроксил радикала в реакциях Фентона и Хабера-Вайса [Ланкин В.З. и др., 2001].

Супероксиддисмутаза (SOD) катализирует дисмутацию супероксида в кислород и пероксид водорода (КФ 1.15.1.1).

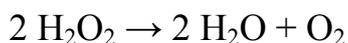


Супероксиддисмутаза среди ферментов обладает самой высокой каталитической скоростью реакции ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), которая лимитирована только частотой столкновения супероксид аниона с ферментом, благодаря чему супероксиддисмутаза эффективно защищает клетку от повреждающего действия супероксида.

Существует три формы супероксиддисмутаз в эукариотических организмах, которые классифицируются в зависимости от типа переходного металла – кофактора активного центра фермента (Cu, Zn, Mn) [Nozik-Grayck E. et al., 2005].

Следует отметить, что при работе SOD образуется H_2O_2 и очень большое значение имеет предотвращение её накопления в организме. Основную роль в этом играют ферменты каталаза и пероксидазы.

Каталаза (КФ 1.11.1.6) разлагает пероксид водорода на воду и газообразный кислород, для этого ей не требуется донор электронов:



В организме млекопитающих максимальное содержание данного фермента обнаружено в печени, почках и эритроцитах, хотя другие органы также экспрессируют данный фермент [Schrader M. et al., 2006]. Одна

молекула каталазы восстанавливает 50000 - 1000000 молекул H_2O_2 за одну секунду (скорость реакции $\sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Отмечается, что такая высокая активность фермента каталазы наблюдается лишь при высоких концентрациях H_2O_2 . [Chelikani P. et al., 2004]. При более низких концентрациях H_2O_2 работают селеновые и неселеновые пероксидазы, а именно глутатионпероксидазы и пероксиредоксины.

Глутатионпероксидаза (GPX) (КФ 1.11.1.9) относится к семейству селеновых пероксидаз. Она катализирует восстановление пероксида водорода, а также гидроперекисей липидов и жирных кислот (LOOH). Скорость реакции $\sim 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. В качестве субстрата выступает глутатион (GSH). Для эффективной работы этого фермента необходимо функционирование глутатион-редокс-цикла. Для восстановления окисленного глутатиона необходимы реакции с участием глутатионредуктаз (GRXs) и систем регенерации НАДФ⁺ [Ланкин В.З. и др., 2001].

Тиоредоксины (Trx) – это дитиоловые оксидоредуктазы, они катализируют восстановление дисульфидов -S-S- в аминокислотных остатках белков до сульфгидрилов -S-H-. При этом собственные тиоловые группы тиоредоксина окисляются до дисульфида, которые далее восстанавливаются тиоредоксин-редуктазой с участием NADPH. Кроме этого, тиоредоксины выступают донорами электронов для рибонуклеотидредуктаз, тиоредоксин-пероксидаз (пероксиредоксинов I - V), метионин-сульфоксид-редуктаз [Arner, S., 2000]. Тиоредоксин-редуктазы млекопитающих – это селен-зависимые димерные флавопротеины с широкой субстратной специфичностью. По сравнению с другими антиоксидантами, концентрация тиоредоксина в клетке низка.

Пероксиредоксины (Prx) разрушают гидропероксиды как органической, так и неорганической природы, в том числе пероксинитриты (КФ 1.11.1.15) [Hofmann B. et al., 2002]. Это наиболее древние пероксидазы, которые по аминокислотной последовательности не проявляют гомологии с другими пероксидазами и SOD. Пероксиредоксины могут иметь различную

локализацию в клетке и составляют до 1% от растворимой формы белка в клетке [Karplus P.A. et al., 2007]. Для катализа эти пероксидазы используют в активном центре консервативный остаток цистеина (Cys), а так же не содержат каких-либо окислительно-восстановительных. Скорость реакции $\sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Кроме пероксидазной активности, некоторые пероксиредоксины проявляют шаперонную и фосфолипазную активность [Fisher A.B., 2011; Chae H.Z. et al., 2012]. Имеется большое количество работ, указывающих на важное место представителей этого семейства в антиоксидантной защитной системе различных органов [Kinnula V.L. et al., 2004; Kümin, A. et al., 2007; Power J. et al., 2008; Volkova A.G. et al., 2014, Gordeeva A.E. et al., 2015; Palutina O.A. et al., 2015; Gordeeva A.E., 2015]. Данный аспект требует рассмотрения этого семейства пероксидаз подробнее.

4.2. Пероксиредоксины

Современная классификация пероксиредоксинов основана на числе цистеинов в активном центре и особенностях механизма катализа и включает три подсемейства: 1Cys (Prx6), типичные 2Cys (Prx 1-4) и атипичные 2Cys (Prx5). Аминокислоты, которые формируют пероксидазный каталитический центр для всех пероксиредоксинов весьма высококонсервативны [Wood Z.A. et al., 2003].

Несмотря на отличия в аминокислотной последовательности, характерной чертой семейства пероксиредоксинов (Prxs) является консервативная тиоредоксиновая укладка, которая включает в себя три α -спирали и четыре β -структуры. Структурные различия между представителями наблюдается на уровне четвертичной структуры. Так 1Cys Prx – это гомодимеры, атипичные 2Cys Prx – мономерные формы фермента, в то время как типичные 2Cys Prx могут быть или гомодимерами, или олигомерами [Karplus P.A. et al., 2007; Ren G. et al., 2009; Chae H.Z. et al., 2012].

Пероксидазная активность Prxs обусловлена наличием консервативных остатков цистеина (Cys) в N-концевом и C-концевом положениях

полипептидной цепи. Ключевым для катализа является N-концевой пероксидазный остаток цистеина (C_p) в положении 47. Однако для «атипичных» Prxs требуется и остаток цистеина в C-концевой области – это дополнительный восстанавливающий остаток цистеина (C_R). Пероксидазный остаток цистеина окружен тремя консервативными для Prxs аминокислотными остатками: Pro44, Thr48 Arg27 (нумерация для 2Cys Prx). Остаток Pro44 прикрывает пероксидазный остаток от растворителя, а Thr48 и Arg127 образуют с атомом серы этого остатка водородные связи, способствуя активации этого цистеина. Таким образом, Thr48 и Arg127 необходимы для пероксидазной активности пероксиредоксина [Wood Z.A. et al., 2003; Perkins A. et al., 2013].

Каталитический цикл, в котором происходит ферментативная деградация органических и неорганических гидропероксидов включает три этапа [Chae H.Z. et al., 2012]. На первом этапе, происходит взаимодействие перекиси с пероксидазным цистеином. При этом в результате восстановления пероксида, тиольная группа ($-SH$) пероксидазного цистеина (C_p) окисляется до сульфеновой кислоты ($-SOH$), возможно и дальнейшее её окисление до сульфиновой (C_p-SO_2H) и сульфоновой (C_p-SO_3H) кислот. При этом только сульфеновая кислота восстанавливается тиолами до реакционноспособной формы C_p-SH , в то время как C_p-SO_3H – это необратимо окисленная форма. Именно восстановление сульфеновой кислоты происходит на втором этапе каталитического цикла, при этом образуется внутри или межмолекулярная дисульфидная связь. Типичные 2Cys Prx образуют дисульфидную связь между цистеинами двух мономеров ($CP-S-S-CR$), атипичные 2Cys Prx образуют внутримолекулярную в пределах одной полипептидной цепи ($CP-S-S-CR$), а 1Cys образуют связь с низкомолекулярными тиолами ($CP-S-S-R$). Наличие этой реакции предохраняет пероксидазный центр Prx от дальнейшего необратимого окисления субстратом, тем самым поддерживая активность фермента. На третьем этапе, дисульфидные связи восстанавливаются тиолами. В случае типичных и атипичных 2Cys Prx для

восстановления связей часто служит тиоредоксин (Trx). В настоящее время процесс восстановления Cr-S-S-R групп для 1Cys Prx недостаточно изучен. Показано, что Cr-SOH, может быть восстановлен некоторыми низкомолекулярными тиолами, например, глутатионом, с помощью глутатион S-трансферазы π .

Это может быть связано с тем, что в результате взаимодействия 1Cys Prx и глутатион S-трансферазы π активный центр 1Cys Prx разворачивается и становится доступным для молекулы глутатиона [Woo H.A. et al., 2003; Manevich Y. et al., 2007; Chen H.Z. et al., 2013].

Подобно перекисям, пероксинитрит является окислителем для белковых SH-групп, и приводит к образованию нитрита и сульфенатов, которое в присутствии конформационно доступных остатков цистеина могут образовывать внутримолекулярные дисульфиды. Пероксинитриредуктазная активность в отличие от пероксидазной, не является характерной для всех представителей семейства. Она была показана для Prx5 и Prx2 человека [Dubuisson H. et al., 2004; Manta B. et al., 2009], для Prx 1 и Prx 2 дрожжей [Ogusucu R. et al., 2007], для Prx6 [Peshenko I.V. et al., 2001].

Активность Prxs регулируется на уровне транскрипции генов для Prx. Основным фактором, который влияет на уровень экспрессии генов - окислительный стресс [Bertoletto P.R. et al, 2012; Tahmasbpour Marzony E et al., 2016]. Показано изменение экспрессии генов Prx при травмах [Huang S. et al, 2015], новообразованиях [Lee E.Y. et al., 2015; Peroja P., 2016] при дифференцировке клеток [Ma Y. et al., 2014; Xi H. et al., 2014].

Регуляция активности Prxs происходит также и на уровне посттрансляционных модификаций, которые включают фосфорилирование, ацетилирование, глутатионилирование и тиольное окисления [Requier S. et al., 2014]. Посттрансляционные модификации связанные с фосфорилированием, приводят к ингибированию активности фермента из-за формирования структуры, неблагоприятной для осуществления ферментативной реакции [Jeon Y.J. et al., 2014]. Пероксиредоксины,

нейтрализуя перекиси и пероксинитриты, проявляют антиоксидантную активность. [Wood Z.A. et al., 2003; Requier S. et al., 2014; Rhee S. G. et al, 2016].

4.2.1. Роль пероксиредоксинов в защите клеток от окислительного стресса

Среди пероксиредоксинов позвоночных наиболее охарактеризованными являются Prxs млекопитающих. У млекопитающих обнаружено 6 представителей этого семейства, которые разделены на три подсемейства: типичные 2Cys (Prx1–4), атипичный 2Cys (Prx5) и 1Cys (Prx6). В настоящее время представителям этого семейства отводится незаменимая роль в защите от окислительного стресса при различных патологиях [Pegoja P. et al, 2016; Knoops B. et al., 2016].

Пероксиредоксин 1 - белок, имеющий молекулярную массу 22 кДа, широко представленный как в норме, так и при различных патологиях практически во всех органах и тканях млекопитающих. В клетках Prx1 локализуется в цитоплазме, ядре, митохондриях и пероксисомах [Immenschuh S. et al., 2003]. Окислительный стресс играет главную роль в усилении экспрессии генов Prx1 [Huang S. et al, 2015; Tahmasbpour Marzony E et al., 2016]. Высокий уровень экспрессии Prx1 в тканях млекопитающих наблюдается при онкологиях: пищевода, поджелудочной железы, легких, щитовидной железы [Ishii T. et al., 2012; Lee E.J. et al., 2015; Park M.H. et al, 2016]. Было показано, что внеклеточная форма Prx1 человека связывается с рецептором TLR4 и стимулирует секрецию TNF α и IL6 макрофагов мыши (или незрелых дендритных клеток), действуя как провоспалительный фактор. Связывание с рецептором TLR4 не зависит от пероксидазной активности Prx1 [Ishii T. et al., 2012].

Пероксиредоксин 2 - состоит из 198 аминокислотных остатков, и в отличие от Prx1 не содержит дополнительного остатка цистеина (Cys83). В клетке имеет цитозольную локализацию. Это основной антиоксидантный

фермент эритроцитов человека [Benfeitás R. et al., 2014]. Большая часть работ по исследованию Prx2 в клетке указывает на его роль в опухолевых процессах. Сверхэкспрессия белка приводит к увеличению устойчивости клеток к действию различных противоопухолевых препаратов и защищает опухолевые клетки от окислительного стресса и апоптоза [Park Y.H. et al., 2015; Kwon T. et al., 2016; Peroja P. et al., 2016].

Пероксиредоксин 3 (с-мус, miR-383 или miR-23b target gene) - состоит из 257 аминокислотных остатков. На N-конце Prx3 имеет сигнальную последовательность для проникновения в митохондрии, где он локализован. Prx3 является незаменимым ферментом для нормального функционирования митохондрий, а уменьшение его уровня вызывает сильные морфологические и функциональные нарушения органелл [Wonsey D.R. et al., 2002]. Экспрессия гена для Prx3 индуцируется окислительным стрессом и защищает клетки от гиперпродукции АФК [Liu M.H., 2015; Tahmasbpour Marzony E. et al, 2016].

Пероксиредоксин 4 – состоит из 271 аминокислотного остатка и доминирует в печени, семенниках, яичниках и мышцах. Prx4 локализуется во внеклеточном пространстве и внутри клеток, например, внутри эндоплазматической сети [Tavender T.J. et al., 2008]. Prx4 играет важную роль в защите организма от окислительного стресса. Показана протекторная роль Prx4 в сперматогенезе/овогенезе и его необходимость для созревания сперматозоидов и фолликул у млекопитающих [Iuchi Y. et al., 2009; Qian Y. et al., 2016]. У трансгенных мышей с гиперэкспрессией Prx4 в модели сахарного диабета 1 типа, β - клетки поджелудочной железы имели низкие показатели апоптоза, что указывало на важную роль Prx4 в снижении их поражения [Ding Y. et al., 2010].

Пероксиредоксин 5 – состоит из 214 аминокислотных остатков и представлен в цитоплазме, митохондриях, пероксисомах и ядре. От других представителей 2 Cys пероксиредоксинов его отличает механизм ферментативной реакции и наименьший молекулярный вес (22кДа - непротессированная форма, а также 17 кДа – форма после отщепления

сигнального пептида). Для ферментативного катализа требуется дополнительный остаток цистеина в С-концевой области – восстанавливающий остаток цистеина (C_R). [Wood Z.A. et al., 2003]. Prx5 восстанавливает пероксид водорода и алкилгидропероксиды, помимо этого также, как Prx2 и Prx6, способен к восстановлению пероксинитрита [Dubuisson H., et al., 2004]. Значительные уровни Prx5 были обнаружены в микроглии при воспалительных процессах. Индуцированная экспрессия белка опосредовала снижение активации микроглии и генерации оксида азота и модулировала АФК-зависимый сигнальный каскад [Sun H.N. et al., 2010].

Пероксиредоксин 6 - представитель 1-Cys Prx, содержащий только один активный остаток цистеина (Cys47). Протекторный эффект пероксиредоксина 6 был показан при патологиях кожи [Kümin A. et al., 2007; Zhang S. et al., 2014], легких [Fisher A.B. et al., 2014] глаз [Tulsawani R. et al., 2010]. Показан нейропротекторный эффект этого белка [Yun H.M. et al., 2015; Buonora J.E. et al., 2015]. Помимо непосредственного участия эндогенного пероксиредоксина 6 в защите клеток от окислительного повреждения, применение экзогенного Prx 6 успешно используется для повышения антиоксидантного статуса в ткани при различных свободно-радикальных патологиях [Novoselov V.I. et al., 2008; Gordeeva A.E. et al., 2015; Palutina O.A. et al., 2015].

4.2.2. Пероксиредоксины и их роль в заживлении кожных ран

Из-за использования ошибочных систем анализа в ранних исследованиях предполагалось, что пероксидазная активность Prx была ниже, чем глутатонпероксидазы и каталазы. Теперь, однако, Prx признаны в качестве преобладающего пероксид-восстанавливающего фермента [Winterbourn C.C.; 2008; Karplus P.A. and Poole L.B., 2012]. Prx1 в основном локализуется в цитозоле и ядре. Уровень белка Prx1 снижается на ранней стадии процесса заживления ран [Iuchi Y. et al., 2010; Woo H.A. et al., 2010].

Между тем тирозиновый остаток Prx1 фосфорилируется, что вызывает переходную инактивацию активности пероксидазы [Woo H.A. et al., 2010]. В результате происходит локальное накопление перекиси и поддерживается сигнализация фосфорилирования из тирозинкиназы для рецептора фактора роста посредством окислительной инактивации фосфотирозинфосфатаз (рис. 2). Следовательно, рост клеток протекает в течение длительного периода в результате повышенного пероксида во время инактивации Prx1. Prx4 уникален среди семейства Prxs, поскольку он обладает гидрофобным N-концевым сигнальным пептидом, который приводит к его секреции из клеток и преобладающей локализации в эндоплазматическом ретикулуме (ER). Небольшая индукция мРНК Prx4, которая возникает во время 5-го дня 8-го дня заживления ран, указывает на то, что Prx4 участвует в заживлении ран [Kümin A. et al., 2007]. Было бы интересно посмотреть, наблюдается ли у мышей с дефицитом Prx1- или Prx4 аномальный фенотип, такой как нарушение заживления ран.

У пожилых трансгенных мышей, сверхэкспрессирующих Prx6 в кератиноцитах, заживление раны усиливается по сравнению со старыми мышами дикого типа [Kümin A. et al., 2006]. У мышей с дефицитом Prx6 грануляционная ткань подвергается тяжелым кровоизлияниям [Kümin A. et al., 2007]. Этот фенотип кровоизлияния, по-видимому, вызван увеличением уровней АФК в воспалительных и эндотелиальных клетках в результате отсутствия Prx6.

На модели повреждений кожи крысы вследствие радиоактивного облучения показано, что стимуляция экспрессии Prx6 приводит к уменьшению апоптоза клеток и способствует сохранению целостности митохондрий после облучения. Трансфекция Prx6 *in vivo* снижает концентрацию малонового диальдегида и уменьшает индуцированные радиацией повреждения кожи у крыс. При этом в присутствии Prx6 наблюдается понижение содержания появившихся в результате облучения

АФК в клетке [Zhang S. et al., 2014]. Таким образом, доказана антиоксидантная эффективность Prx6.

4.3. Пероксиредоксин 6

Среди представителей семейства Prxs особый интерес представляет пероксиредоксин 6 (Prx6). Это полифункциональный фермент. Наряду с пероксидазной активностью он обладает также фосфолипазной активностью и способен восстанавливать гидроперекиси фосфолипидов [Fisher A.V., 2011; Rahaman H. et al., 2012.]. Описана также его пероксинитритредуктазная активность [Peshenko I.V. et al., 2001]

Пероксиредоксин 6 имеет широкое распространение в организме и доминирует в цитоплазме эпителиальных клеток многих тканей. Максимально его содержание отмечается в верхних дыхательных путях и легких, в обонятельном эпителии и эпидермисе кожи [Novoselov S.V. et al., 1999; Liu N.N. et al., 2015]. В коже максимальное содержание белка обнаружено в сальных железах волосяных фолликулов и в слое гранулярных клеток эпидермиса [Novoselov S.V. et al., 1999].

Пероксиредоксин 6 имеет тиоредоксиновую укладку. Пероксидазный каталитический центр формируется тремя высококонсервативными остатками: His39, Cys47 и Arg132, расположенными на N-конце полипептидной цепи (рис. 5). Пероксидазная активность Prx6 проявляется в отношении широкого спектра пероксидов, включая H_2O_2 , органические гидропероксиды, такие как гидропероксид трет-бутила и гидропероксид кумена, гидропероксиды жирных кислот и гидропероксиды фосфолипидов. При этом Prx6 способен восстанавливать свободные молекулы гидропероксидов жирных кислот, в том числе в составе фосфолипидов [Peshenko I.V. et al, 2001].

В то время как Prx 1-5 содержат два реакционноспособных цистеина и используют тиоредоксин и / или глутатион в качестве субстрата [Hofmann B. et al., 2002; Rhee S.G. et al., 2001; Wood Z.A. et al., 2003]. Prx6 или 1-Cys-

пероксиредоксин имеет один окислительно-восстановительный цистеин и использует глутатион для каталитического восстановления пероксида водорода [Manevich Y. et al., 2004] и различных органических пероксидов [Manevich Y. and Fisher A.B., 2005]. Кроме того, показано, что Prx6 обладает фосфолипазной активностью [Chen J.W. et al., 2000; Wu Y.Z. et al., 2005]. Предыдущие исследования показали, что избыточная экспрессия Prx6 в разных типах клеток защищает от цитотоксичности, индуцированной АФК.

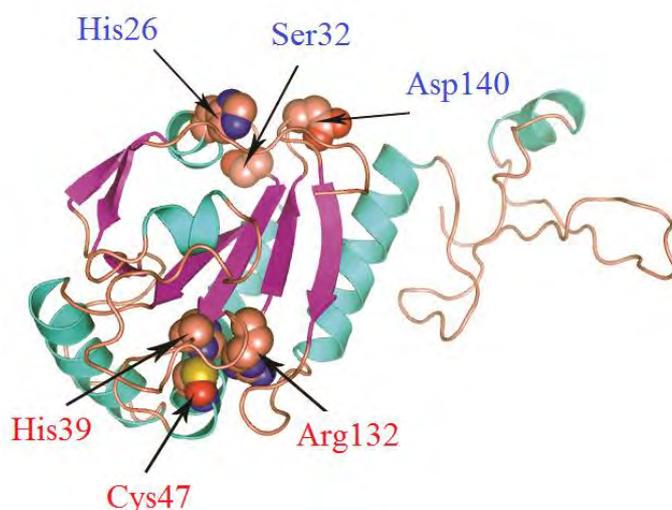


Рис. 5. Тиоредоксиновая укладка пероксиредоксина 6.

Пероксидазный центр сформирован аминокислотами: His39, Cys47, Arg132. Фосфолипазный центр (iPLA2) располагается на поверхности молекулы и включает в себя: His26, Ser32, Asp140.

Следует подчеркнуть, что пероксидазная активность Prx6 эффективно проявляется даже при малых концентрациях перекисей (1–100 мкМ), при которых другие низкомолекулярные антиоксиданты малоэффективны [Fisher A.B., 2011]. Пероксидазная активность человеческого Prx6 в присутствии молекул GSH и π GST составляет 1.8 - 5 мкмоль/мин/мг белка [Manevich Y. et al., 2009].

Наличие дополнительной фосфолипазной активности отличает Prx6 от других представителей семейства. Аминокислоты, отвечающие за фосфолипазную активность, располагаются на N-конце полипептидной цепи (рис. 6). Таким образом, Prx6 – уникальный, бифункциональный фермент,

который может быть так же и пероксидазой, защищая от действия пероксидов, а благодаря активности aiPLA2 способен участвовать и в метаболизме мембранных фосфолипидов [Manevich Y. et al., 2009; Fisher A.B., 2011].

Полифункциональность Ptx6 включается в себя его способность взаимодействовать с рецептором TLR4 плазматической мембраны клетки [Kuang X. et al., 2014; Wang X. et al., 2015]. Показано, что Ptx6 способен формировать в плазматической мембране катион-селективные ионные каналы кластерного типа [Grigoriev P.A. et al., 2016]. Такие особенности пероксиредоксина 6 делают его непосредственным участником клеточной сигнализации.

Однако основной цикл работ по исследованию Ptx6 в функционировании организма указывает на его доминирующую роль в защите от окислительного поражения органов [Volkova A.G. et al., 2014, Gordeeva A.E. et al., 2015; Palutina O.A. et al., 2015].

Применение экзогенного Ptx6 успешно используется для повышения антиоксидантного статуса в ткани при свободно-радикальных патологиях [Novoselov V.I. et al., 2008; Volkova A.G. et al., 2014, Gordeeva A.E. et al., 2015; Palutina O.A. et al., 2015]. Этот аспект применения Ptx6 основан на том, что в условиях гиперпродукции АФК собственная антиоксидантная система, не способна в полной мере справиться с нормализацией свободно-радикальных процессов [Меньщикова Е.Б. и др., 2008]. В этом случае одним из способов снижения избытка АФК является повышение антиоксидантного статуса в повреждаемой ткани, путем применения экзогенных ферментов-антиоксидантов и других агентов, обладающих антиоксидантными свойствами.

Подтверждена высокая эффективность использования экзогенного Ptx6 в терапии целого ряда экспериментальных патологий (химические и термические ожоги органов дыхания, И-Р поражение почек и др.). Кроме

того, Prx6 является мощным природным радиопротектором [Шарапов М.Г. и др., 2016].

При выборе экзогенного фермента-антиоксиданта особую роль играет его субстратная специфичность (способность нейтрализовать различные классы активных форм кислорода). В этом отношении наиболее предпочтительным является пероксиредоксин 6.

Во-первых, по сравнению с обычными низкомолекулярными антиоксидантами он эффективнее нейтрализует АФК. Во-вторых, по сравнению с каталазой пероксиредоксин 6 нейтрализует как неорганические, так и органические гидропероксиды; по сравнению с глутатионпероксидазой Prx6 не требует для своего функционирования систем восстановления, типа глутатиона. В-третьих, это мажорный антиоксидант в большинстве тканей, особенно в верхних дыхательных путях. В-четвертых, в настоящее время существует достаточно много данных, которые дают основания полагать, что пероксиредоксины могут применяться в терапии заболеваний, патогенез которых связан с окислительным стрессом [Новоселов В. И., 2011].

Известно, что при различных травмах кожи наблюдается активация свободнорадикальных реакций, что сопровождается перекисным окислением липидов биологических мембран, снижением их прочности и разрушением [Казимирко В.К и др., 2004]. В результате этого снижается активность ферментных систем, расположенных в мембранах, и, как следствие, наблюдается ослабление синтеза макроэргических соединений, что приводит к торможению процессов синтеза белков, нуклеиновых кислот, и замедлению процессов регенерации. Именно поэтому, снижение активности свободнорадикальных реакций и активация антиоксидантной системы целесообразно в комплексной терапии многих патологических процессов, в том числе и при травмах [Казимирко В.К и др., 2004; Al-Jawad F.H. et al.; 2008]. В связи с этим, наличие антиоксидантной активности у препарата или

фармакологического сочетания, как правило, позитивным образом сказывается на их регенеративном действии.

С нашей точки зрения, выбор в качестве пероксидаз для данного исследования именно пероксиредоксинов (в частности пероксиредоксина 6) является наиболее предпочтительным. Это определяется несколькими факторами:

1. Пероксиредоксин 6 обладает способностью нейтрализовать как неорганические, так и органические гидропероксиды. Каталаза такой способностью не обладает.

2. Кинетические характеристики ферментативных реакций показывают, что при малых концентрациях гидропероксидов пероксиредоксин 6 существенно эффективнее в их нейтрализации, чем каталаза или глутатионпероксидазы, что позволяет Prx6 нейтрализовать гиперпродукцию АФК в начальной стадии их образования [Fisher A.B., 2011].

3. Пероксиредоксин 6 – единственный представитель пероксиредоксинов, который, являясь секреторным белком, способен защищать клетки от внешних источников гидропероксидов.

4. Пероксиредоксин 6 является одним из основных антиоксидантов кожи, локализуясь преимущественно в верхнем слое эпидермиса, волосяных фолликулах и сальных железах.

5. Факторы, регулирующие процессы регенерации в эпителиальных тканях

На разных стадиях дифференцировки клеток эпителия в процессе регенерации активируются рецепторы к различным цитокинам, которые являются основными регуляторами репарации. Цитокины продуцируются альвеолярными макрофагами, нейтрофилами, эпителиальными клетками,

лимфоцитами и фибробластами. К фиброгенным цитокинам относятся трансформирующий фактор роста бета (TGF- β), фактор роста тромбоцитарного происхождения (PDGF), гранулоцитарно-макрофагально колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и основной фактор роста фибробластов (FGF). Альвеолоциты II типа могут пролиферировать и генерировать как себе подобные клетки, так и альвеолоциты I типа, а также факторы роста, такие как фибропластический фактор роста (FGF) и его семейство (FGF1), фактор роста кератиноцитов (KGF или FGF7), фактор роста гепатоцитов (HGF), эпителиальный фактор роста (EGF) [Чучалин А. Г., 2007].

Прогенераторное влияние экзогенного эпидермального фактора роста (EGF) на эпителий показано, например, на модели раны (царапины) слизистой оболочки голосовой складки. В присутствии экзогенного EGF скорость регенерации эпителия увеличилась в два раза по сравнению с контролем. Кроме этого, при использовании EGF в прилегающих к ране тканях обнаружено увеличение концентрации белка Ki67, что свидетельствует об интенсификации пролиферации клеток эпителия [Palencia L. et al., 2015].

Таким образом, в регуляции репарационных процессов в эпителии ключевое значение имеют такие факторы роста, как эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста кератиноцитов (KGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), факторы роста фибробластов (FGF).

5.1. Паракринные факторы мезенхимальных стволовых клеток

На сегодняшний день существует много работ, посвящённых использованию мезенхимальных стволовых клеток (МСК) для регуляции воспалительных процессов при повреждениях тканей, в послеоперационном периоде и в других случаях. Как правило, эффективность применения МСК подтверждается на примерах различных тканей: при почечной, печёночной и

лёгочной патологиях, рассеянном склерозе, инфаркте миокарда. При этом было показано, что использование кондиционированной среды МСК при лечении острых патологических состояний не уступает применению самих МСК. Например, Deng и группа исследовали терапевтический эффект применяемых отдельно МСК и кондиционированной среды, в которой культивировались эти клетки, при лечении тех мышц и нервов крыс, которые чаще всего повреждаются при родах. Результаты позволили авторам сделать вывод о равнозначном позитивном эффекте этих препаратов. Авторы пришли к заключению о том, что эффективность МСК при таком типе повреждений полностью определяется эффективностью их паракринных факторов [Deng K. et al., 2015]. К аналогичному выводу пришла группа, изучавшая эффект МСК костного мозга человека и их паракринных факторов на модели кишечной невропатии у морских свинок. При ректальном введении этих препаратов в обоих случаях наблюдается уменьшение потерь нейронов мышечной оболочки кишечника, снижение нарушений моторики толстой кишки и предотвращение значительной потери в весе животного [Robinson A.M. et al., 2014].

Таким образом, можно говорить о паракринном терапевтическом эффекте МСК, который подразделяют на три аспекта: противовоспалительное, антиапоптотическое и прогенеративное действия [Temnov A. A. et al., 2010]. Прогенераторный эффект паракринных факторов МСК связан с высокой концентрацией среди них факторов роста, таких, как HGF, VEGF, KGF, FGF, EGF. Интенсивность секреции этих факторов повышается в ответ на повреждение. Например, показано, что паракринный эффект МСК можно усилить путём предварительного воздействия на стволовые клетки ФНО α , IL-1 β и оксидом азота. Усиление паракринного терапевтического эффекта в этом случае проявляется в увеличении продолжительности жизни крыс, подвергнутых радиоактивному облучению [Chen H. et al., 2015]. По сравнению с фибробластами кожи, МСК костного мозга более обильно секретируют EGF, KGF, IGF-1, VEGF- α , PDGF-BB, EPO

и ТРО, но менее обильно – IL-6 и остеопротегин [Chen L. et al., 2008]. Создавая вокруг себя среду, насыщенную факторами роста, МСК создают хорошие условия для пролиферации клеток.

Противовоспалительный эффект связан со снижением концентрации провоспалительных цитокинов: IL1, IL6 и TNF- α [Rawlins E.L. et al., 2007].

Антивоспалительное действие белков кондиционированной среды МСК костного мозга было продемонстрировано на примере фиброза лёгких, сопровождающегося воспалением лёгких, отложением коллагена и клеточным апоптозом [Shen Q. et al., 2014]. В *in vitro* модели диабета, при АФК-опосредованном угнетении миграции и пролиферации кератиноцитов глюкозой и липополисахаридами, использование белков среды МСК также имело положительный эффект. Под воздействием паракринных факторов была снижена продукция АФК, что привело к восстановлению нормальной функции кератиноцитов. Авторы исследования пришли к выводу о том, что белки среды МСК могут лечь в основу новой стратегии по ускорению заживления ран кожных покровов [Li M. et al., 2015].

Антиапоптотические свойства паракринных факторов МСК были показаны Huang и его группой. Астроциты головного мозга, подвергнутые *in vitro* кислородно-глюкозному голоданию, были, в одном случае, реперфузированы кондиционированной средой МСК, в другом – культивировались вместе с МСК в течение 24 часов. В обоих случаях наблюдается уменьшение апоптоза астроцитов, повышение активности клеточного метаболизма и снижение сверхэкспрессии глиального фибриллярного кислого белка. Эффект от совместной культивации оказался выше эффекта от реперфузии [Huang W. et al., 2015].

Эмбриональные человеческие МСК секретируют белок, связывающий инсулин-подобный фактор роста (IGFBP), которые уменьшают количество свободного инсулин-подобного фактора роста, что приводит к ингибированию роста клеток гепатоцеллюлярной карциномы. Таким образом, белки кондиционированной среды МСК могут оказывать

специфический антипролиферативный эффект на опухолевые клетки
[Yulyana Y. et al., 2015].

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Материалы

1.1. Животные и этика

Исследования были проведены на белых крысах-самцах линии Wistar массой 250 – 300 г, возрастом 8-10 недель, 80 особей, полученных из вивария ИБК РАН г. Пущино. Работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для эксперимента и других научных целей, 1986» и руководством по работе с лабораторными животными ИБК РАН №57.30.12.2011.

Протокол эксперимента включал введение животного в длительный наркоз смесью растворов Zoletil® 100, «Virbac Sante Animale» (Франция) и Rometar, «Bioveta» (Чехия). Наркоз вводился внутримышечно.

1.2. Рекомбинантный человеческий пероксиредоксин 6

Рекомбинантный пероксиредоксин 6 был получен в лаборатории механизмов рецепции Института биофизики клетки РАН.

Рекомбинантный пероксиредоксин 6 (Prx6), содержащий His-tag домен на карбоксильном конце, получен в лаборатории с помощью стандартных генно-инженерных методик. Конструкция, содержащая белок-кодирующие последовательности пероксиредоксина 6 человека экспрессирована в клетках E.coli. Выделение и очистка фермента проводилась стандартными биохимическими методами (аффинная хроматография) до высокой степени чистоты (не менее 95% согласно SDS-электрофорезу) [Шарапов М.Г. и др., 2009].

Удельные активность Prx6 - His-tag составляют: пероксидазная – 90-120 нмоль/мг/мин по H_2O_2 и 60-80 нмоль/мг/мин по трет-бутил-гидропероксиду.

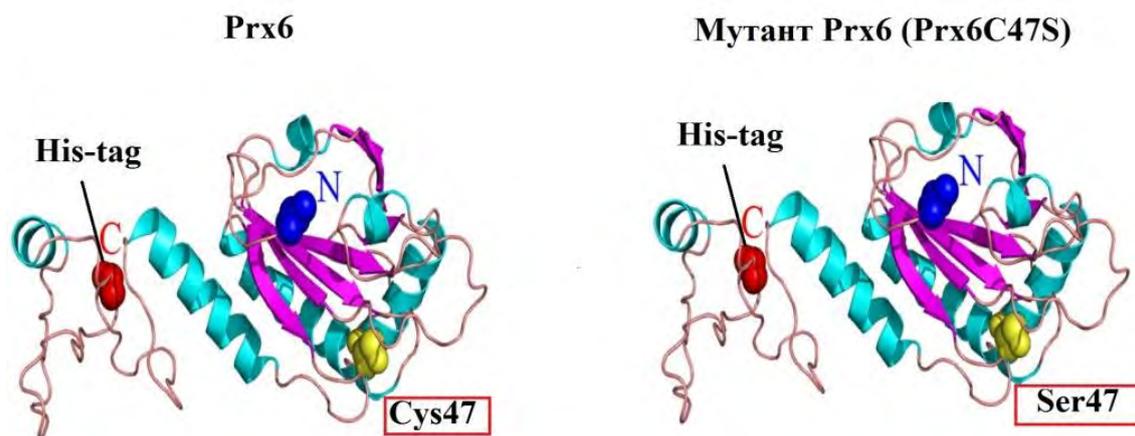


Рис. 6. Структура пероксиредоксина 6 и его мутанта (Prx6C47S)

В качестве контроля использовали мутантный Prx6 (Prx6C47S) (рис. 6), в котором проведена точечная замена в активном центре рекомбинантного Prx6 человека, а именно цистеин в 47 положении замещен на серин. Данная мутация C47S полностью ингибирует пероксидазную активность Prx6, но не приводит к структурным изменениям белка [Wood Z.A. et al., 2003]. Мутантная форма Prx6 также содержала His-tag на карбоксильном конце. Мутантный белок очищали по аналогичной схеме для Prx6.

Минимальная концентрация, которую возможно использовать в случае лечения кожных ран 100 мкг/мл, что соответствует диапазону максимальной эффективности белка *in vivo* (20-200 мкг/мл). Учитывая возможные потери белка и предыдущие опыты *in vitro* [Волкова А.Г. и др., 2014; Гордеева А.Е. и др., 2014] для лечения ран кожи была выбрана концентрация белка 1 мг/мл, которая не вызывает токсического эффекта у животных.

Основные реактивы для биохимических, гистологических, иммунохимических и др. исследований указаны в соответствующих разделах методов.

1.3 Паракринные факторы МСК

Получение стволовых клеток костного мозга

Для выделения МСК костный мозг получали из бедренной кости крыс линии Wistar, находящихся под общим наркозом. Мононуклеарную фракцию

клеток костного мозга выделяли на градиенте плотности с использованием стандартного раствора Lympholyte-H (Cedarlane, Канада). После получения суспензии мононуклеарных клеток их высевали на чашки Петри и культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки.

Для подтверждения свойств получаемых клеток были проведены тесты по остеогенной, хондрогенной и адипогенной дифференцировке по стандартной методике [Владимиров Ю.А., 2000]. Остеогенная дифференцировка (с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 мкМ дексаметазона, 0,1 мМ аскорбиновой кислоты и 10 нМ β -глицерофосфата), была подтверждена наличием щелочной фосфатазы в культуре клеток с использованием стандартных реактивов (Sigma-Aldrich, USA). Хондрогенная дифференцировка (с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 мкМ дексаметазона и 0,1 мкг / мл TGF- β), была подтверждена с использованием окраски альциановым голубым. Адипогенная дифференцировка (с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 10 мкМ дексаметазон, 10 мкг/мл инсулина, и 100 мкг/мл IBMX) была подтверждена окрашиванием с использованием Oil Red-O.

После получения клеточного монослоя проводили полную смену культуральной среды и через 3 суток кондиционированную культуральную среду объединяли с лизатом МСК. Клетки разрушали, используя метод замораживания-оттаивания. Содержание белка в кондиционированной среде МСК составила $10,0 \pm 0,3$ мг/мл. Пероксидазные удельные активности – 40 мкм/мг/мин по H_2O_2 и 25 мкм/мг/мин по трет-бутил гидропероксиду.

Получение кондиционированной среды МСК

После получения клеточного монослоя проводили полную смену культуральной среды и через 3 суток кондиционированную культуральную среду (кМСК) объединяли с лизатом МСК, которые использовали

непосредственно в экспериментах. Клетки разрушали, используя метод замораживания-оттаивания.

Полученный препарат смешивали в стерильных условиях с метилцеллюлозой для получения стерильного геля.

2. Методы

2.1. Модель ожога трихлоруксусной кислотой

После депиляции паравертебральной области спины, создавали контактный ожог II-IIIa степени, который сопровождается повреждением эпидермиса и подлежащего слоя с сохранением сальных и потовых желёз (данный ожог не требует хирургического вмешательства, например, пересадки кожи). Контактный ожог осуществляли пропитанной в 50% трихлоруксусной кислоте фильтровальной бумагой. Площадь ожога составляла $10 \times 10 \text{ мм}^2$ (рис. 8А). Время экспозиции пропитанной бумаги составило 3 минуты, после чего место нанесения ожога промывалось проточной водой 15 секунд.



Рис. 8. Модель химического ожога ТХУ

После нанесения ожога через 2 часа в депилированную паравертебральную область спины внутрикожно были введены препараты (300 мкл, 10 введений по 30 мкл), площадь обкалывания 15×15 мм². Подопытных животных разделили на контрольную и 3-и опытные группы в зависимости от исследуемого препарата (рис.8Б).

В контрольной группе, в область вокруг раны вводили физиологический раствор (300 мкл). 1-й группе - Prx 6 (2 мг/мл, 300 мкл). Во 2-й группе - кондиционированная среда МСК (раствор, 10мг/мл, 300мкл). В 3-й группе –кМСК (10 мг/мл, 150 мкл) + Prx 6 (4 мг/мл, 150 мкл).

2.1. Модель механической полнослойной кожной раны

Моделирование раневого процесса кожи предусматривало иссечение полнослойного кожного лоскута до фасции (диаметр 10 мм) в свободной от шерсти межлопаточной области (рис.7). Так же производилось вшивание под кожу интактной области пластикового кольца для предотвращения контракции краевого эпителия, которое помещалось между фасцией и кожным лоскутом [Galiano R.D. et al., 2004; Heidari F. et al., 2016; Du H.C. et al., 2017; Lee J.W. and Song K.Y., 2018]. Кольцо было извлечено на 14-е сутки эксперимента.

Подопытных животных разделили на контрольную и 3-и опытные группы в зависимости от исследуемого раневого препарата. Для предотвращения бактериального заражения в ранах во всех группах в исследуемые растворы был добавлен антибиотик гентамицин (1 мг/мл). В контрольной группе, на рану капали физиологический раствор (200 мкл). 1-й группе - Prx 6 (1 мг/мл, 200 мкл). В 2-й группе на рану наносили метилцеллюлозный гидрофильный гель, содержащий кондиционированную среду (кМСК) 200мкл. В 3-й группе – гель с кМСК (100 мкл) + Prx 6 (1 мг/мл, 100 мкл).

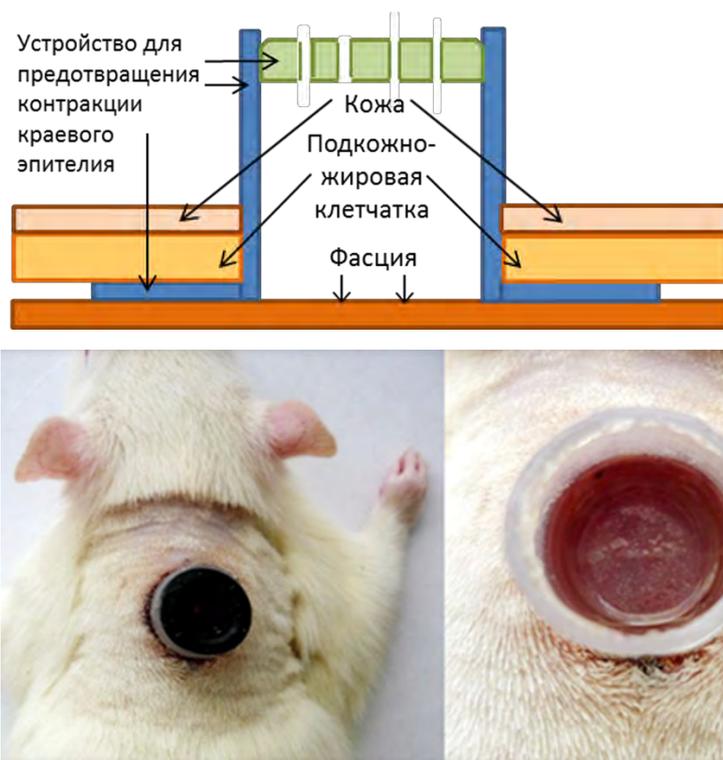


Рис. 7. Модель раневого дефекта (механическая рана)

Далее, во всех четырех группах, поверх препарата, накладывали вырезанную по форме раны коллагеновую пленку и закрывали трубку резиновой пробкой для предотвращения механического загрязнения раны.

Нанесение препаратов производилось ежедневно в течение 14 суток после нанесения травмы (до снятия кольца).

2.3. Планиметрические методы исследования

Восстановление целостности кожного покрова определяется сроками заживления раны, что связано со скоростью течения фаз раневого процесса. Скорость заживления представляет собой величину, характеризующую изменение площади раны за единицу времени. Проведение планиметрического исследования осуществлялось по фотографиям экспериментальных ран в масштабе 1:1. Количественные исследования проводили с помощью программы Image Tool for Windows, v. 3.0 («UTHSCSA», США).

2.4. Приготовление парафиновых срезов

Для проведения морфологических исследований вывод животных из эксперимента осуществляли на 3, 7, 10-е сутки методом декапитации. Производили полное иссечение раны с захватом интактных тканей. Полученный материал фиксировали в фиксаторе Myrsky's Fixative («Merck», USA) 24 часа, промывали проточной водой и отмывали в PBS.

Затем образцы для обезвоживания проводили через батарею растворов этилового спирта (70% – 2 раза, 80%, 96%, 100% – 2 раза; в течение 1 часа) при $t = 37^{\circ}\text{C}$ в термостате. После образцы проводили через смесь этиловый спирт – ксилол (в соотношении 1:1), ксилол (2 раза) в течение 1 часа при $t = 37^{\circ}\text{C}$ в термостате. Затем через смесь ксилол – парафин (в соотношении 1:1), парафин (2 раза) в течение 1 часа при $t = 56^{\circ}\text{C}$ в термостате, после чего заливали в парафин в специальные формочки.

Полученные блоки резали на микротоме («Thermo Electron Corporation», USA), толщина срезов 10 мкм. Далее образцы помещали на стекла с адгезивным покрытием HistoBond («Marienfeld Laboratory Glassware», Germany), расправляли на термостолике OTS 40 («SMT», Germany) при $t = 42^{\circ}\text{C}$ и высушивали в термостате при $t = 37^{\circ}\text{C}$ в течение 1 часа (для надежной фиксации на стеклах).

Депарафинизация срезов: стекла с фиксированными срезами проводили через ксилол (2 раза), этиловый спирт – ксилол, этиловый спирт (100% – 2 раза, 96%, 70%), дистиллированная вода.

2.5. Гистологический анализ

Срезы окрашивали гематоксилин-эозином (Hematoxylin-Eozin according to Ehrlich, «Fluka», USA), просветляли и заключали в смолу Histofluid («Marienfeld Laboratory Glassware», Germany), затем накрывали покровными стеклами («Menzel-Glaser», Germany).

Микроскопический анализ проводили на микроскопе Leica DM 6000, фотографии получали с помощью цифровой камеры для микроскопии Leica

DFC 490. Количественные исследования проводили с помощью программы Image Tool for Windows, v. 3.0 («UTHSCSA», США).

2.6. Иммуногистохимический анализ

Для ИГХ-исследований использовались парафиновые срезы толщиной 10 мкм, полученные стандартным методом. В качестве первичных антител использовались моноклональные антитела против Ki-67, в качестве вторичных антител – антикроличий конъюгат с щелочной фосфотазой. Для правильной постановки ИГХ реакций ставили положительные и отрицательные контроли. В качестве отрицательных контролей брали образцы исследуемых срезов, которые подвергались стандартной процедуре иммуногистохимической реакции, но без добавления первичных антител. Положительные контроли для каждого антитела выбирали в соответствии со спецификациями от фирмы-производителя. Микроскопический анализ проводили на микроскопе Leica DM 6000, фотографии получали с помощью цифровой камеры для микроскопии Leica DFC 490.

2.7. Иммуноферментный анализ

Цитокины определяли через 24 часа после нанесения ожога. Кусочки ткани раны замораживали при $t=-40^{\circ}\text{C}$. В день определения активности ткань размораживали и гомогенизировали на холоде в PMSF (фенилметилсульфонилфторид), 0.2 мМ. Затем гомогенаты тканей центрифугировали при 40°C и 14 000 об/мин 15 минут. В надосадочной жидкости проводили стандартный иммуноферментный анализ (ИФА). Образцы сорбировали на 96-луночный планшет в течение 1 часа при 37°C . После четырехкратного промывания PBS, блокировали сайты неспецифического связывания 2% фетальной сывороткой, разведённой в PBS в течение 30 мин при 37°C . Затем в лунки вносили кроличьи антитела к IL-1, IL-8, IL-10, Cas3 и Ki-67, а также мышинные антитела к интерлейкину 6 (IL 6) с разведением 1:500 в 2% растворе фетальной сыворотки в PBS. Планшет с

первичными антителами оставляли на ночь при температуре +4° С. Затем лунки промывали фосфатным буфером и наносили раствор антител к иммуноглобулинам мыши и кролика, конъюгированных с пероксидазой хрена в разведении 1:1000 и инкубировали в термостате при 37°С в течение трёх часов. Планшет промывали, связавшиеся антитела детектировали с помощью субстрата для пероксидазы хрена – АВТС (2,2'-азинобис(3-этилбензиазолин-6-сульфоная кислота)), растворённого в цитратно-фосфатном буфере с добавлением перекиси водорода. Затем измеряли оптическую плотность на мультискане при 450 нм (Labsystems Multiskan Plus, Финляндия). Концентрацию интерлейкинов, Cas 3 и Ki-67 рассчитывали на мг белка. Концентрацию белка в ткани определяли методом Бредфорда.

2.8. Измерение концентрации оксида азота в сыворотке крови

Продукцию NO в поврежденной коже крысы измеряли по концентрации нитритов, являющихся конечным продуктом метаболизма короткоживущего соединения NO. Количество нитритов измеряли с использованием реактива Грисса, содержащего 0,1% раствора N-нафтилэтилендиамин дигидрохлорида в 2,5% растворе фосфорной кислоты и 1% раствора сульфаниламида в 2,5% фосфорной кислоты в соотношении 1:1. Кусочки ткани размораживали и гомогенизировали на холоде в PMS, 0.2 mM. Затем гомогенаты тканей центрифугировали при 40°С и 14 000 об/мин 15 минут. Образец надосадочной жидкости помещали в 96-луночный планшет (100 мкл на лунку), добавляли 100 мкл свежеприготовленного реактива Грисса и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Оптическую плотность измеряли на приборе Multiscan (Labsystem Plus, Финляндия) при длине волны 546 нм.

2.9. Определение малонового диальдегида

Предварительно замороженную в кельвинаторе (-80°С) ткань (кожу) размалывали до пылеобразного состояния (с использованием жидкого азота).

К 100 мг образца добавляли 3 мл 1% H_3PO_4 и 1 мл 0,8% водного раствора тиобарбитуровой кислоты (ТБК), нагревали смесь на кипящей водяной бане в течение 45 мин. После охлаждения добавляли 4 мл н-бутанола и отделяли слой бутанола путем центрифугирования. Оптическую плотность определяли при длине волны 535 нм относительно контроля без добавления ткани.

2.10. Биохимический анализ крови

Взятие образцов крови для биохимического анализа проводили через 24 часа после нанесения ожога. Взятие крови производилось после выведения животного из эксперимента методом декапитации. Полученный биологический материал центрифугировали в течение 5 минут, 14000 об./мин., для проведения биохимического теста отбирали сыворотку крови (30мкл), помещали на специализированные тест-полоски с соответствующей маркировкой (Тест-полоски Рефлотрон®-плюс, «Roche», USA).

Биохимический анализ проводили на биохимическом экспресс-анализаторе Reflotron Plus («Roche Diagnostics», Switz.) в течение 2 минут. Измеряли активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ).

2.11. Статистический анализ

Статистический анализ выполняли с использованием программы Microsoft Excel 2010. После проверки выборки на нормальность распределения вычислялась средняя арифметическая величина (M) и стандартное отклонение средней арифметической (m). Данные выражали как $M \pm m$ с указанием количества экспериментов (N). Проверка достоверности различий осуществлялась по критерию Стьюдента (t -критерий). Математическая обработка морфометрических данных гистологических срезов проводилась с использованием метода непараметрической статистики (U -критерий Манна-Уитни для малых выборок).

III РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Химический ожог кожи, вызванный трихлоруксусной кислотой

1.1. Динамика регенерации химического ожога кожи (без использования каких-либо препаратов)

В данной работе был исследован химический ожог II и IIIa степени, который сопровождается повреждением эпидермиса и подлежащего слоя с сохранением сальных и потовых желёз (данный ожог не требует хирургического вмешательства, например, пересадки кожи). Оценку динамики регенерации ожоговой раны производили на 1, 3, 7, 10, 14 и 21 сутки. Полное закрытие ожоговой раны наблюдалось на 20-24 сутки.

1.1.1. Морфология раневого процесса при химическом ожоге

Визуальная оценка состояния зоны химического ожога у животного показала, что первые сутки наблюдается отделение пораженного слоя эпидермиса, визуально ожог в течение 24 часов практически не изменяется. Так как ожог был сделан трихлоруксусной кислотой, которая на месте контакта с тканями вызывает денатурацию белков с развитием коагуляционного некроза и обезвоживания тканей, в третьи сутки, на месте ожога сформировался плотный, темный, поверхностный струп, при котором некроз не распространяется вглубь. Степень оволосенения зависит от возраста экспериментальных животных. Так, у более молодых особей рост волос происходит намного быстрее, чем у более взрослых. К десятым суткам в контрольной группе наблюдается частичное отшелушивание струпа (рис.9), к двадцать первым суткам практически полная эпителизация (Таблица 1).

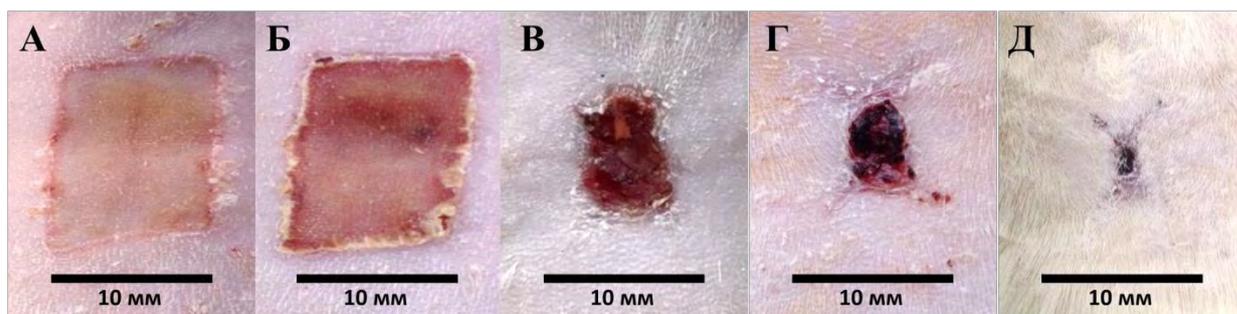


Рис. 9. Динамика заживления химического ожога

А – 3 сутки; Б – 7 сутки; В – 10 сутки; Г – 14 сутки; Д – 21 сутки

Таблица 1

Динамика изменения площади ожоговой раны ($M \pm m$, мм²)

время, сутки	1	3	5	7	9	10	12	14	21
площ, мм ²	92,1±17,4	91,7±12,0	89,3±9,7	88,8±10,1	80,6±9,9	64,9±14,4	49,5±18,3	27,1±9,0	6,3±2,1

Через 24 часа в ожоговой ране наблюдается язвенный дефект (рис. 10А). Дно пораженной ткани представлено молодой грануляционной тканью с микроабсцессами, очагами некроза и явлениями отека.

На 3 сутки после нанесения ожоговой раны на дне раны наблюдается диффузно-очаговая макрофагальная инфильтрация с очагами некроза и формированием молодой грануляционной ткани. Поверхность раны представлена струпом (рис. 10Б).

На 10 сутки после нанесения ожога (рис. 10В) дно поверхностного язвенного дефекта представлено молодой фиброзной тканью с диффузно-очаговой лимфоцитарной инфильтрацией, на которую наплзает с краев новообразованный эпидермис.

На 21 сутки (рис. 10Г) эпителизация полностью завершена, эпидермис покрыт роговым слоем.

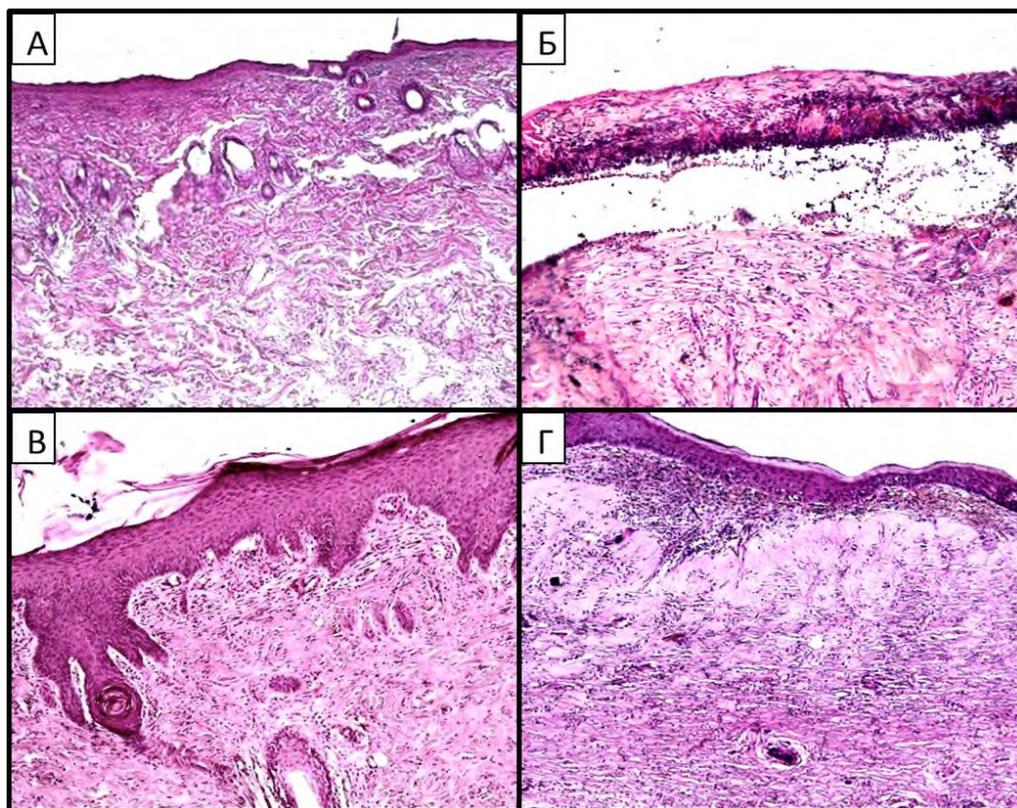


Рис. 10. Морфологическая картина динамики заживления ожоговой раны

А – 1 сутки после ожога; Б – 3 сутки; В - 10 сутки; Г - 21 сутки.

Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$, N=15

1.1.2. Уровень клеточного апоптоза в ожоговой ране

Каспазы играют важную роль в процессах апоптоза, некроза и воспалительных процессах. При стрессовых условиях и воздействии на клетку повреждающих веществ активируется процесс контролируемой клеточной гибели – апоптоз. Результатом апоптоза является постепенное и медленное избавление от «ненужных» в функциональном отношении на данный момент клеток, например, с серьезными нарушениями структуры или функции генетического аппарата. Когда же на клетку оказывают воздействия повреждающие факторы в чрезмерных дозах, апоптоз переходит в стадию неконтролируемой клеточной гибели, т. е. некроз. Так, вследствие химического ожога сначала в ткани происходит процесс энергезависимого

апоптоза, когда же концентрация повреждающего химического агента воздействующего на ткань увеличивается, и количество разрушенных клеток начинает превышать количество пролиферирующих, происходит нарушение гомеостаза клеточных популяций и в организме наступает стадия некроза.

Так как каспаза 3 (Cas 3) является ключевой эффекторной каспазой, в процессе апоптоза, её можно использовать в качестве основного маркера клеточной гибели.

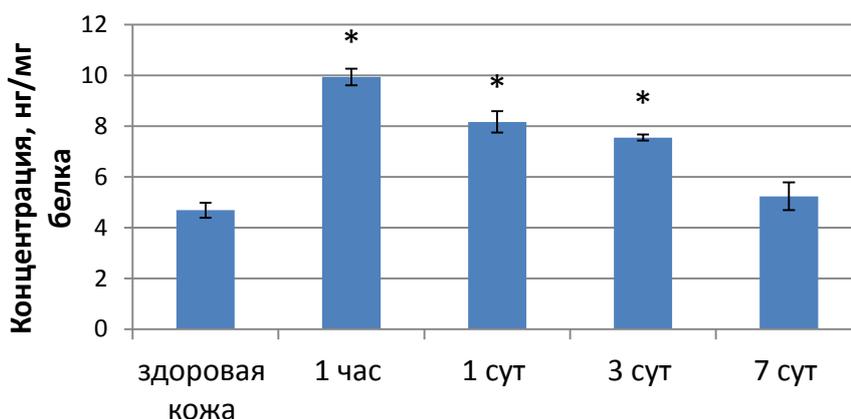


Рис. 11. Концентрация Cas 3 в пораженной коже в разные сроки после нанесения химического ожога

*- достоверно по отношению к контролю (здоровая кожа) ($p < 0,05$), $N=15$

В данной работе показано (рис. 11), что концентрация Cas 3 через 1 час после нанесения ожоговой раны в 2,3 раза выше, чем в здоровой коже и составляет $10,9 \pm 0,3$ нг/мг белка. Через 24 часа (1 сутки) после нанесения ожога концентрация Cas 3 составляет $8,2 \pm 0,4$ нг/мг белка и к третьим суткам падает незначительно. Через неделю после нанесения ожога концентрация Cas 3 в ожоговой ране падает до уровня достоверно незначимого относительно концентрации Cas 3 здоровой кожи крысы.

1.1.3. Уровень клеточной пролиферации в ожоговой ране

Универсальным маркером для оценки клеточного цикла является ядерный белок – антиген Ki-67, по экспрессии которого можно исследовать

пролиферативную активность клеток. Ki-67 – белок, который синтезируется в ядрах только тех клеток, которые находятся в процессе деления.

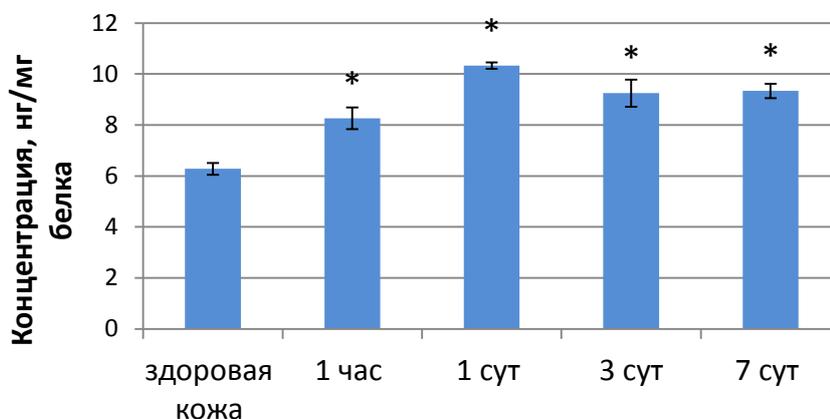


Рис. 12. Концентрация Ki-67 в ожоговой ране в разные сроки после нанесения химического ожога

*- достоверно по отношению к контролю (здоровая кожа) ($p < 0,05$), $N=15$

Концентрация Ki-67 в здоровой коже (рис.12) составляет $6,3 \pm 0,2$ нг/мг белка. Через 1 час после нанесения ожоговой раны уровень Ki-67 повышается и становится равен $8,3 \pm 0,4$ нг/мг белка, а через 24 часа - $10,3 \pm 0,1$ нг/мг белка, что в 1,6 раз больше, чем в здоровой коже. К третьим и седьмым суткам концентрация маркера пролиферации незначительно падает и составляет $9,3 \pm 0,5$ нг/мг белка и $9,3 \pm 0,3$ нг/мг белка соответственно.

1.1.4. Степень окислительного стресса в ожоговой ране

Малоновый диальдегид (МДА) — один из продуктов свободнорадикального окисления липидов, накопление которого отражает степень окислительного стресса в организме. Оценка этого показателя необходима для определения динамики развития того или иного патологического процесса.

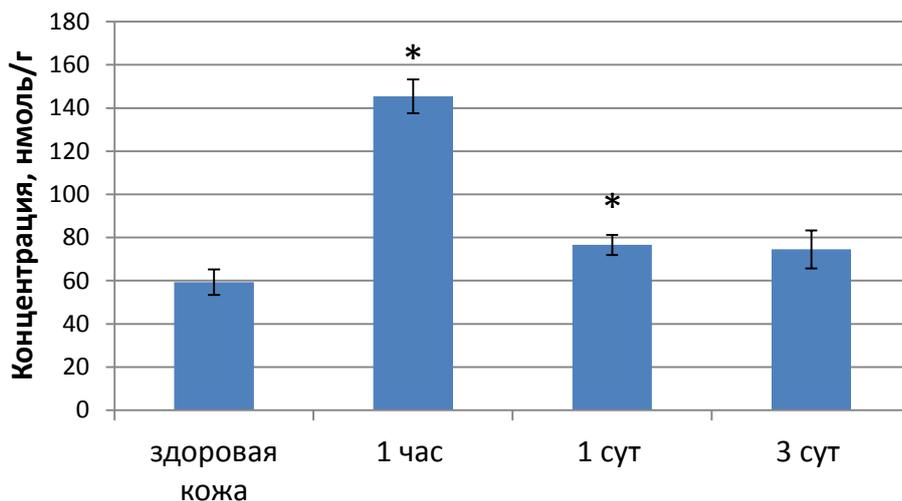


Рис.13. Концентрация малонового диальдегида в пораженной коже в разные сроки после нанесения химического ожога

*- достоверно по отношению к контролю (здоровая кожа) ($p < 0,05$), $N=15$

Исследование показало (рис. 13), что концентрация МДА в здоровой коже крысы находится на уровне $59,3 \pm 6,0$ нмоль/г ткани. Через 1 час после нанесения ожога концентрация МДА в коже возросла в 2,5 раза и составила $145,4 \pm 7,8$ нмоль/г. Через сутки концентрация в ожоговой ране уменьшилась и составила $76,6 \pm 4,6$ нмоль/г. На третьи сутки концентрация МДА в ране составляла $74,5 \pm 8,9$ нмоль/г, что статистически незначимо по сравнению со здоровой кожей крысы.

Таким образом, химический ожог на первом этапе сопровождается мощным окислительным стрессом, который, по-видимому, увеличивает тяжесть поражения ткани и, соответственно, приводит к увеличению сроков заживления раны [Soneja, A. et al., 2005].

1.1.5. Интерлейкиновый профиль ожоговой раны

В результате ожога в пораженной области возникает процесс воспаления, при котором белки плазмы и лейкоциты крови переходят из микроциркуляторных сосудов в очаг воспаления. Ход воспалительного процесса управляется медиаторами воспаления – эндогенными веществами,

которые появляются в очаге воспаления. Одним из важнейших медиаторов воспаления является ИЛ-6. Он продуцируется фибробластами, активированными моноцитами, нейтрофилами и макрофагами. Уровень ИЛ6 коррелирует с глубиной поражения площадью ожога. Иммунологическое действие ИЛ-6 включает увеличение В-клеточной пролиферации и продукции иммуноглобулинов [Kita M. et al., 1992]. Синтез ИЛ-6 повышается под влиянием ИЛ-1. В свою очередь, ИЛ-6 тормозит образование ИЛ-1. ИЛ-1 и ИЛ-3 запускают синтез ИЛ-8, основная функция которого выступать в качестве хемоаттрактанта, т. е. обеспечивать хемотаксис в зону воспаления различных типов клеток: нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов, Т-клеток и лимфоцитов. ИЛ-8 способен вызывать миграцию клеток участвующих в воспалении и способствовать их адгезии делают его активным участником острой воспалительной реакции в местах поражения ткани.

Кроме цитокинов, стимулирующих воспаление, существуют цитокины, действующие в противовоспалительном направлении. В качестве такого цитокина выступает ИЛ-10. Секреция этого цитокина не позволяет воспалению приобрести неконтролируемый характер. ИЛ-10 продуцируется Т-клетками, моноцитами, макрофагами и В-клетками. Как противовоспалительный цитокин, ИЛ-10 угнетает продукцию провоспалительных цитокинов ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8. ИЛ-10, в присутствии ИЛ-3 и ИЛ-4, может оказывать иммуностимулирующие эффекты через инициализацию роста тучных клеток и других клеток-предшественников. В то же время ИЛ10 усиливает пролиферацию В-клеток, защищает их от апоптоза, повышает синтез IgM и IgA, стимулирует IgE.

Таким образом, проанализировав цитокиновый профиль химического ожога кожи можно сделать вывод об интенсивности процессов воспаления и заживления в поврежденной ткани и проследить динамику регенерации ткани в целом.

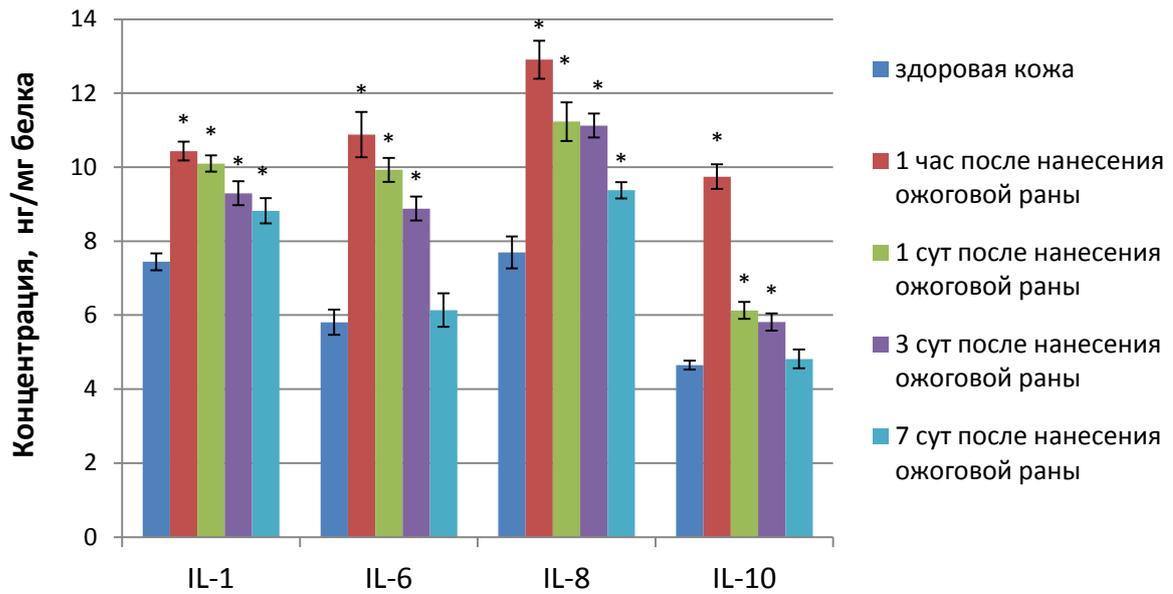


Рис. 14. Концентрация цитокинов в ожоговой ране в разные сроки после нанесения ожоговой раны

*- достоверно по отношению к контролю (здоровая кожа) ($p < 0,05$), $N=15$

Концентрация провоспалительных цитокинов (рис. 14) в здоровой коже IL-1, IL-6 и IL-10 равен $7,4 \pm 0,2$; $5,8 \pm 0,3$ и $7,7 \pm 0,4$ нг/мг белка соответственно. Через один час после нанесения ожога уровень провоспалительных цитокинов увеличивается в 1,5-2 раза: IL-1 в 1,4 раза ($10,4 \pm 0,3$ нг/мг белка); IL-6 в 1,9 раз ($10,8 \pm 0,6$ нг/мг белка); IL-8 в 1,7 раз ($12,9 \pm 0,5$ нг/мг белка). Далее уровень провоспалительных цитокинов уменьшается. В первые сутки после ожога уровень IL-1 равен $10,1 \pm 0,2$ нг/мг белка; IL-6 – $9,9 \pm 0,3$ нг/мг белка; IL-8 – $11,2 \pm 0,5$ нг/мг белка. В третьи сутки: IL-1 – $9,3 \pm 0,3$ нг/мг белка; IL-6 – $8,9 \pm 0,3$ нг/мг белка; IL-8 – $11,1 \pm 0,3$ нг/мг белка. На седьмые сутки: IL-1 – $8,8 \pm 0,3$ нг/мг белка; IL-6 – $6,1 \pm 0,4$ нг/мг белка; IL-8 – $9,4 \pm 0,2$ нг/мг белка.

Концентрация противовоспалительного цитокина IL-10 в коже здоровой крысы составляет $4,6 \pm 0,1$ нг/мг белка. В первые сутки после ожога уровень IL-10 возрастает в 2,1 раза и составляет $9,7 \pm 0,3$ нг/мг белка. Далее уровень противовоспалительного цитокина резко снижается и составляет в

первые сутки после нанесения ожога $6,1 \pm 0,2$ нг/мг белка; в третьи сутки $5,8 \pm 0,2$ нг/мг белка; на седьмые сутки $4,8 \pm 0,3$ нг/мг белка.

Концентрация IL-6 и IL-10 значительно увеличивается в первый час после нанесения ожоговой травмы, через неделю после нанесения химического ожога соответствует здоровой коже, что говорит об уменьшении интенсивности процесса воспаления.

1.1.6. Уровень оксида азота в ожоговой ране

Оксид азота (NO) — эффективный регулятор систем кровообращения в организме человека на всех его уровнях, от центральной системы до микроциркуляции в кожных тканях. Низкий уровень конституциональной генерации NO играет роль оптимального регулятора и поддерживает близкую к физиологической норме скорость микроциркуляции.

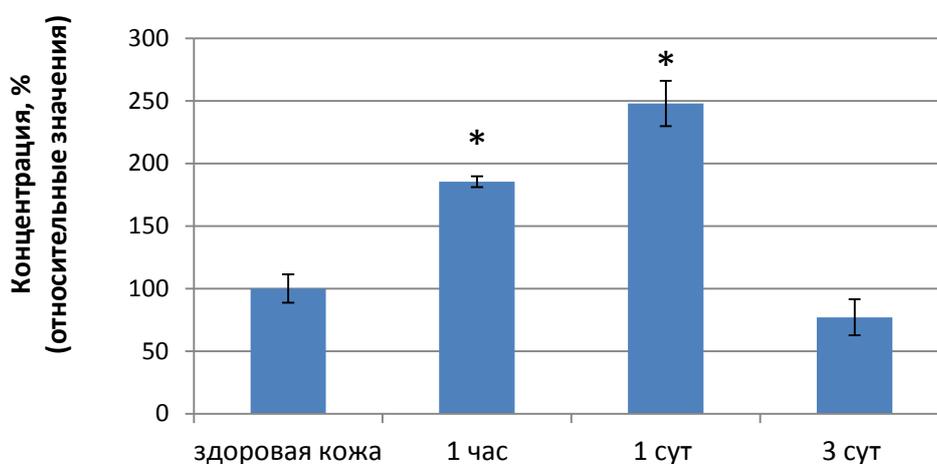


Рис. 15. Концентрация оксида азота в пораженной коже в разные сроки после нанесения химического ожога

Данные выражены в процентах (среднее значение) относительно контроля (здоровая кожа) \pm SE (стандартная ошибка). N=15. Контроль принят за 100%.

*- достоверно по отношению к контролю ($p < 0,05$)

В коже NO активно участвует в синтезе коллагена. При воспалительных процессах в коже, воздействии УФ, инфекциях или при повреждениях кожи происходит интенсивное выделение NO и его генерация превышает нормальный функциональный уровень.

В нашем исследовании было показано (рис. 15), что концентрация оксида азота через 1 час после нанесения химического ожога увеличивается на 85,3%, относительно здоровой кожи. Через сутки после нанесения ожога уровень оксида азота в ране увеличивается еще на 62,5%, что на 147,8% (в 2,5 раза) выше, чем в здоровой коже. К третьим суткам уровень оксида азота в ране понизился и достоверно не отличался от здоровой кожи здоровой коже.

Поскольку резкое повышение уровня оксида азота свидетельствует о воспалительном процессе, можно сделать вывод о том, что пик фазы воспаления в разы происходит в первые сутки после нанесения ожоговой раны. Далее, уровень оксида азота в ране снижается.

1.1.7. Биохимические показатели крови при химическом ожоге

Для получения более информативной картины общего состояния организма после химического ожога, были получены результаты активности цитолитических ферментов АЛТ и АСТ в сыворотке крови. Известно, что повышение концентраций АЛТ и АСТ в крови может происходить в результате различных повреждений тканей, приводящих к острому воспалению и некрозу клеток, в том числе и при химических ожогах.

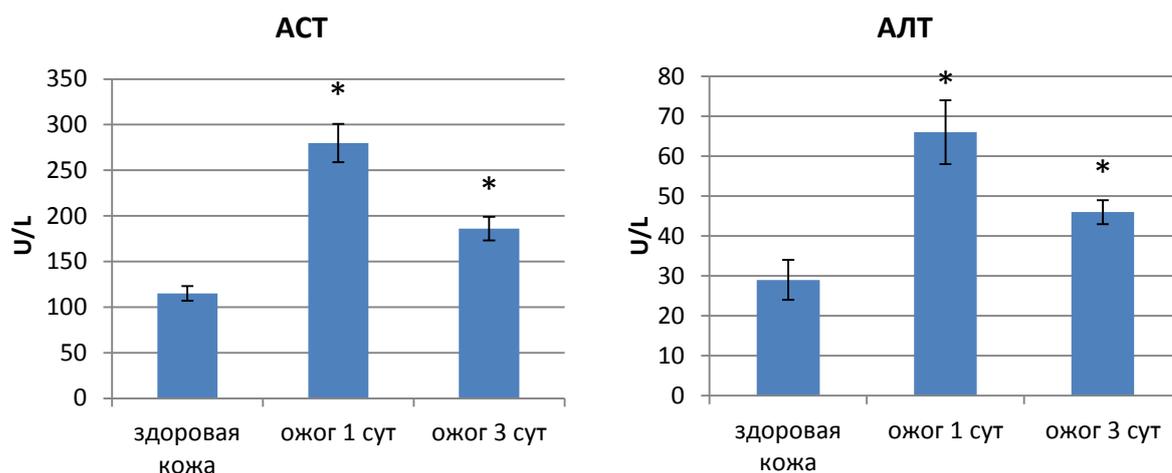


Рис. 16. Активность ферментов АСТ и АЛТ в сыворотке крови крысы после нанесения химического ожога кожи

*- достоверно по отношению к контролю (здоровая кожа) ($p < 0,05$), $N=15$

Экспериментально было показано (рис.16), что ферментативная активность АЛТ и АСТ в крови здоровой крысы составляет 29 ± 5 U/L и 115 ± 8 U/L соответственно. В первые сутки после нанесения химического ожога активность АЛТ увеличивается в 2,3 раза и составляет 66 ± 8 U/L, активность АСТ увеличивается в 2,4 раза и составляет 280 ± 21 U/L. К третьим суткам ферментативная активность АЛТ и АСТ в крови падает и составляет 46 ± 3 U/L и 186 ± 13 U/L соответственно.

1.2. Влияние экзогенного пероксиредоксина 6 (Prx6) и паракринных факторов МСК (кМСК) на динамику заживления химического ожога кожи

В данной модели исследуемые препараты вводились внутрикожно в прилегающий к ожогу участок здоровой кожи, поскольку образование достаточно твёрдого струпа при ожоге препятствует проникновению в кожу и под кожу лекарственных веществ.

1.2.1. Влияние Prx6 и кМСК на морфологию ожоговой раны

Оценка состояния зоны химического ожога показала, что в первые и третьи сутки визуальное и морфологическое различие от использования различных препаратов по сравнению с контрольной группой (физиологический раствор) не наблюдается. К десятым суткам в контрольной группе наблюдается частичное отшелушивание струпа (рис.17), однако процесс регенерации протекает достаточно медленно. В группах с введением исследуемых препаратов наблюдается практически полное очищение ожоговой раны от струпа (табл.2).

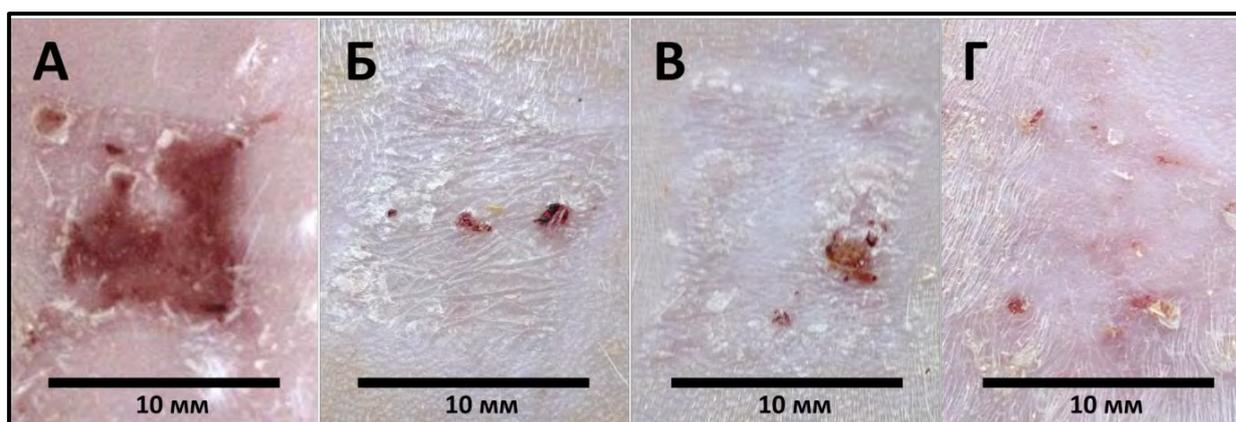


Рис. 17. Внешний вид ожоговой раны на 10 сутки при использовании Prx 6 и кМСК

А – физ. р-р (контроль); Б – Prx 6, В – кМСК, Г – Prx 6 + кМСК

Таблица 2

Динамика изменения площади ожоговой раны ($M \pm m$, мм²)

Сутки после нанесения ожога	Контроль (физ. раствор)	Rrx 6 (группа 1)	факторы МСК (группа 2)	Rrx6+ факторы МСК (группа 3)
3	93,4±4,0	94,2±3,9	95,8±4,1	95,1±2,5
4	91,6±4,7	88,9±3,2	89,3±2,9	90,7±3,7
5	88,8±6,5	86,2±5,2	85,4±3,6	84,6±4,8
6	88,0±6,9	80,8±5,9	82,5±5,1	80,1±6,7
7	85,8±8,6	72,6±7,1	79,8±5,9	71,3±7,5
8	85,1±8,8	57,1±7,7*x	77,9±6,8##	55,8±9,1*x
9	83,8±7,1	46,1±8,9*x	69,7±7,5*‡	39,7±8,9*x
10	81,6±7,6	38,6±7,1*x	66,8±9,7*x‡	34,3±9,5*x

* – достоверно по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

– достоверно по сравнению с группой 1, $p < 0,05$.

x – достоверно по сравнению с группой 2, $p < 0,05$.

‡ – достоверно по сравнению с группой 3; $p < 0,05$.

В группе с применением физиологического раствора (рис. 18А) дно поверхностного язвенного дефекта подрыто и представлено молодой фиброзной тканью с диффузно-очаговой лимфоцитарной инфильтрацией, на которую наплзает с краев новообразованный эпидермис. В прилежащих участках резкие новообразованные волосяные фолликулы с пролиферацией липоцитов в шеечных отделах.

В группе с применением Rrx 6 (рис. 18Б) дно поверхностного язвенного дефекта подрыто наплзающим эпидермисом. В дне молодая фиброзная ткань, инфильтрированная лимфоцитами с примесью макрофагов. В прилежащих участках наблюдается новообразование немногочисленных волосяных фолликулов с пролиферацией липоцитов.

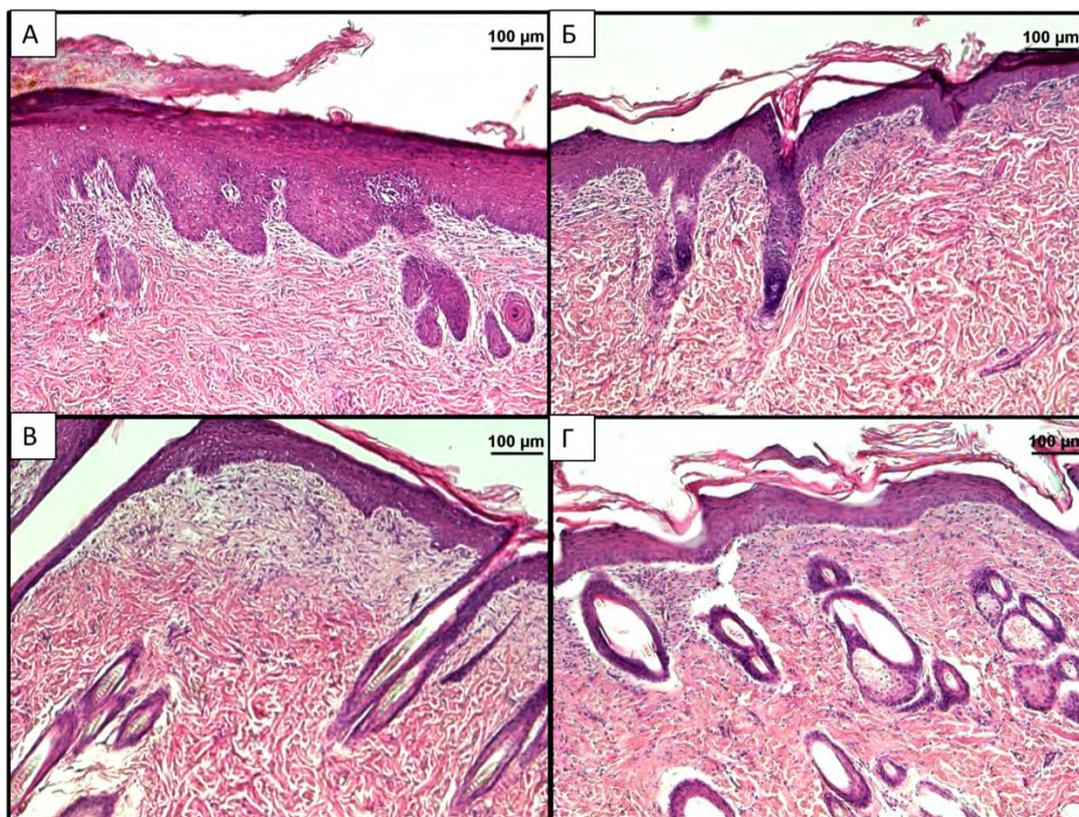


Рис. 18. Морфологическая картина состояния ожоговой раны на 10 суток при использовании Prx 6 и кМСК

А – физ. раствор (контроль), Б – Prx 6, В – кМСК, Г – Prx 6 + кМСК

Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$, N=15

Использование паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток показало (рис. 18В), что дно язвенного дефекта эпидермизировано, с роговым слоем. Под эпидермисом наблюдается узкий слой фиброзной ткани, инфильтрированный лимфоцитами, волосяных фолликулов достаточно много.

При совместном использовании Prx 6 и паракринных факторов МСК (рис. 18Г) дно язвы не прослеживается. Поверхность препарата на всем протяжении эпителизирована, эпидермис покрыт роговым слоем. Субэпителиальные участки дермы в виде узкой полоски склерозированы. Волосяных фолликулов много (существенно больше, чем контроле и с применением препаратов по отдельности). В шейчных отделах фолликулов наблюдается пролиферация липоцитов.

1.2.2. Влияние Prx6 и кМСК на уровень апоптоза в ожоговой ране

В анализе на наличие фермента Cas 3, индуцирующего процессы апоптоза (рис. 19), было отмечено, что в группах, где после ожога использовались препараты пероксиредоксина 6 и паракринных факторов МСК, относительная концентрация Cas 3 была ниже, по сравнению с группой, где использовался физиологический раствор более, чем в 2 раза и был достоверно значим уровню Cas 3 в здоровой коже.

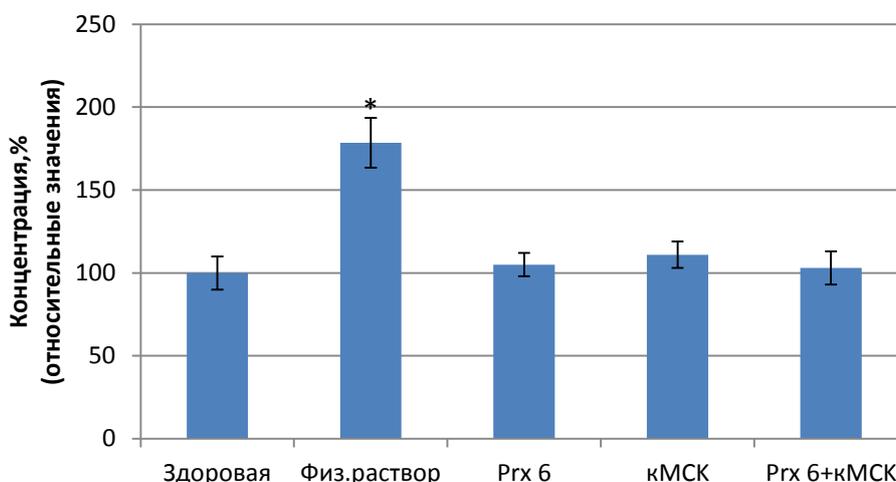


Рис. 19. Концентрация Cas 3 в ожоговой ране при использовании Prx 6 и кМСК

Относительная концентрация Cas 3 в ране через 24 часа после нанесения ожога ТХУ. Данные рассчитаны относительно контроля (здоровая кожа) \pm SE (стандартная ошибка). N=15. Контроль принят за 100%.

*- достоверно по отношению к контролю ($p < 0,05$)

Из этого можно сделать вывод, что препараты с Prx 6 и факторами МСК уменьшают содержание Cas 3 в клетках поражённой ткани, что означает снижение уровня апоптоза.

Кроме того, можно отметить, что наименьшее количество Cas 3 содержится в коже животных, в которой присутствует экзогенный фермент-антиоксидант Prx6.

1.2.3. Влияние Prx6 и кМСК на уровень пролиферации в ожоговой ране

Сравнивая эффект применения препаратов на основе фермента-антиоксиданта Prx 6, паракринных факторов МСК, а также совместного применения двух препаратов при химическом ожоге кожи, заметим, что во всех трех группах наблюдается повышение концентрации Ki-67 в 2 раза, относительно группы с применением физиологического раствора (рис. 20).

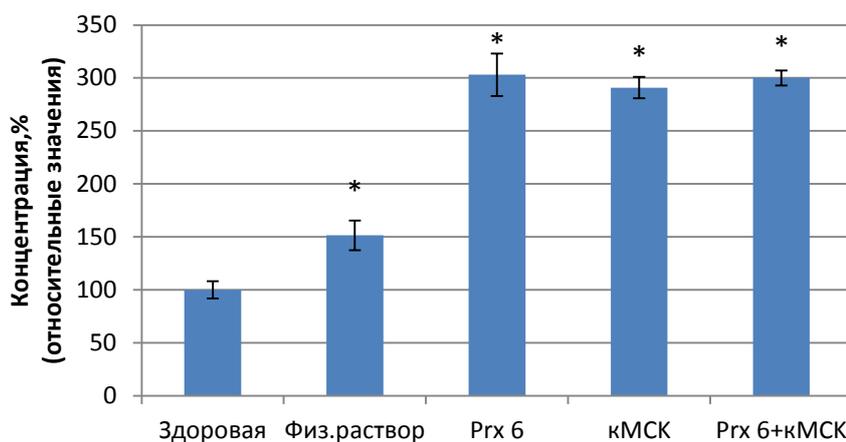


Рис. 20. Концентрация Ki-67 в ожоговой ране при использовании Prx 6 и кМСК

Относительная концентрация Ki-67 в ране через 24 часа после нанесения ожога ТХУ. Данные рассчитаны относительно контроля (здоровая кожа) \pm SE (стандартная ошибка). N=15. Контроль принят за 100%.

*- достоверно по отношению к контролю ($p < 0,05$)

По иммуногистохимическому анализу на выявление Ki-67 можно сделать выводы о пролиферативной активности клеток эпидермиса и дермы кожи на третьи сутки после ожога. Так как наличие Ki-67 в клетках ткани свидетельствует об интенсивности пролиферации, в тканях, где наблюдается повышенная экспрессия Ki-67, присутствует интенсивная синяя окраска, окрашивающая клетки, находящиеся в фазе деления.

Результаты иммуноферментного анализа подтверждаются данными иммуногистохимического анализа на маркер клеточной пролиферации Ki-67 (рис.21).

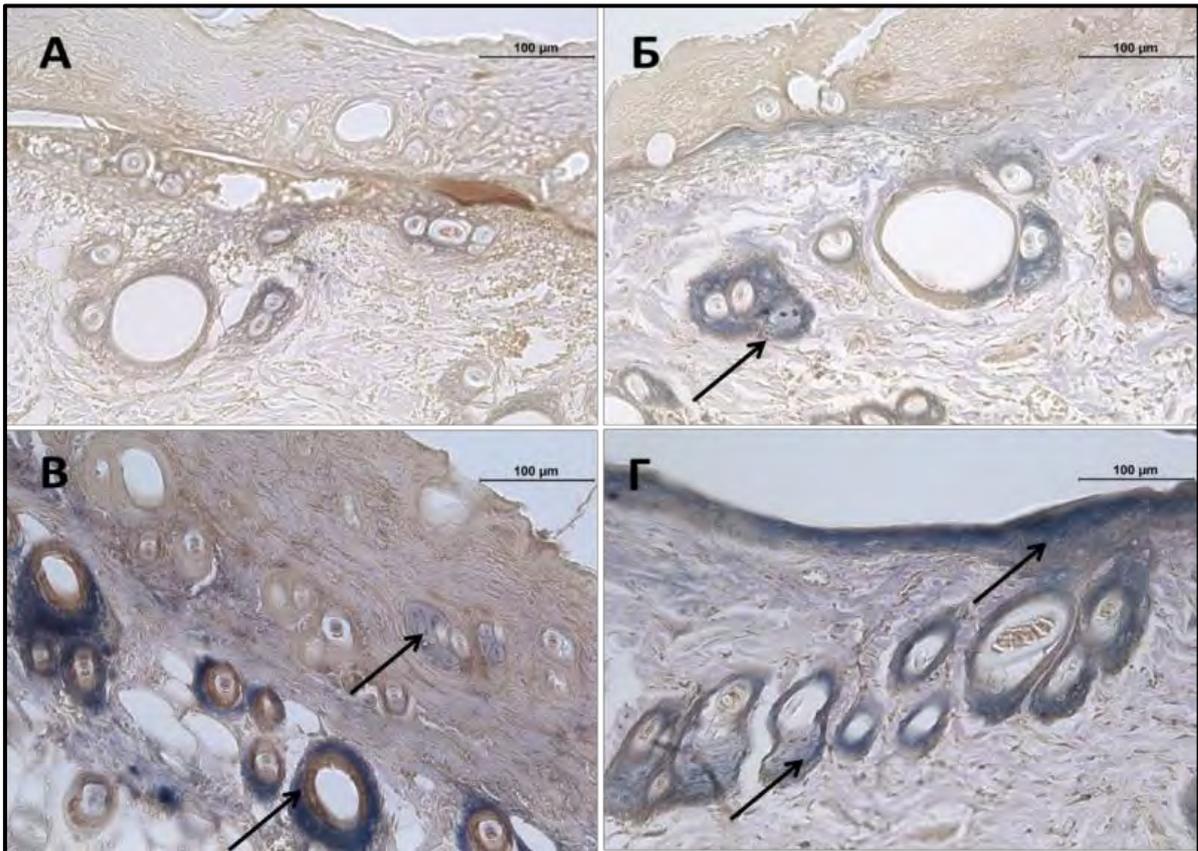


Рис. 21. Распределение Ki-67 в ожоговой ране

Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Ki-67 в ране через 24 часа после нанесения ожога ТХУ. x200

А – физ. раствор (контроль), **Б** – Ргх 6, **В** –кМСК, **Г** – Ргх 6 + кМСК

Области интенсивного иммунного сигнала отмечены стрелками.

В контрольной группе (рис. 21А) синяя окраска наблюдается в области волосяных фолликулов, где большинство клеток наружного и внутреннего корневых эпителиальных влагалищ волосяных фолликулов проявляли слабую реакцию на наличие Ki-67 - позитивных клеток, что свидетельствует об их нахождении в состоянии замедленной пролиферации. Напротив, в группах, где использовались помогающие заживлению ожога препараты, отмечается повышение интенсивности окраски не только клеток волосяного фолликула, но и клеток базального и шиповатого слоев эпидермиса кожи. Наибольшую пролиферативную активность проявляют клетки кожи в группе, где использовался препарат Ргх 6 с факторами МСК. В этой группе в

состоянии активного деления кроме клеток волосяного фолликула находятся также клетки верхнего слоя дермы и клетки базального и шиповатого слоёв эпидермиса, где идёт активная пролиферация кератиноцитов и нарастание эпителия. За счёт высокой пролиферации клеток эпидермиса в данной группе область нарастания эпителиального клина (регенерата) больше, по сравнению с другими группами.

В группе с Ргх 6 (рис. 21Б) также наблюдается повышение интенсивности пролиферации эпителиальных клеток влагалищ волосяных фолликулов, по сравнению с контрольной группой. В области эпидермиса и дермы отмечается равномерное распределение делящихся клеток, особые локации с активно пролиферирующими клетками выделить нельзя. Область нарастания эпидермиса выражена слабо.

В группе с факторами МСК (рис. 21В, 21Г) реакция на наличие Ki-67 - позитивных клеток активно выражена также в областях волосяных фолликулов, также можно отметить наличие пролиферирующих клеток в сосочковом слое дермы и нижних слоях эпидермиса.

В целом, исходя из иммуногистохимического анализа ожога кожи, можно сделать вывод о том, что вводимые препараты положительно влияют на регенеративные процессы в ткани. Наибольшая пролиферативная активность клеток и нарастание массы эпидермиса было отмечено в препарате с Ргх 6 и факторами МСК, следовательно, нейтрализация окислительного стресса в ткани с помощью пероксиредоксина 6 и последующее стимулирование клеток к делению факторами МСК лучше всего подходит для регенерации кожи после химического ожога.

1.2.4. Роль Ргх6 в нейтрализации окислительного стресса в ожоговой ране

Через 1 час после ожога при использовании Ргх 6 концентрация МДА в ожоговой ране уменьшается в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой

(физический раствор). К третьим суткам концентрация МДА в контрольной и опытной группе одинакова и соответствует концентрации МДА в здоровой коже (рис. 22).

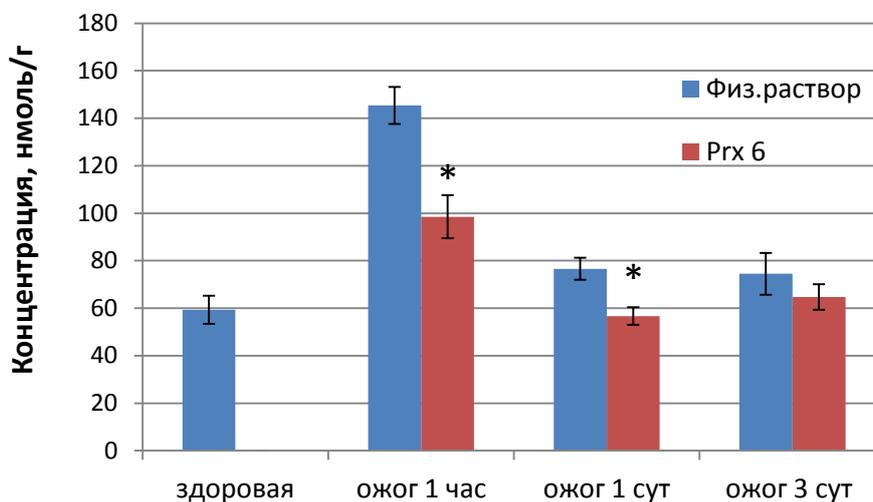


Рис. 22. Концентрация малонового диальдегида в ожоговой ране при лечении Prx 6 (уровень перекисного окисления)

*- достоверно по отношению к контролю (здоровая кожа) ($p < 0,05$), $N=15$

Таким образом, нейтрализация окислительного стресса с помощью ферментов-антиоксидантов в начальной стадии заживления полнослойной механической раны также является важным фактором для ускорения их заживления.

1.2.5. Влияние Prx6 и к МСК на интерлейкиновый профиль ожоговой раны

Анализ цитокинового профиля (рис. 23) показал, что в группе с препаратом Prx 6 относительное содержание всех исследуемых цитокинов была ниже, чем в группе с применением физиологического раствора.

Наблюдается меньший рост концентрации интерлейкинов IL 6 и IL 10 в группе с препаратом паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток.

В группе с препаратом фермента-антиоксиданта Prx6 совместно с паракринными факторами МСК, можно наблюдать динамику снижения относительной концентрации цитокинов, уровень цитокинов при этом достоверно значим относительно контроля (здоровая кожа). При этом концентрация противовоспалительного цитокина IL-10 выше, чем провоспалительного IL-6.

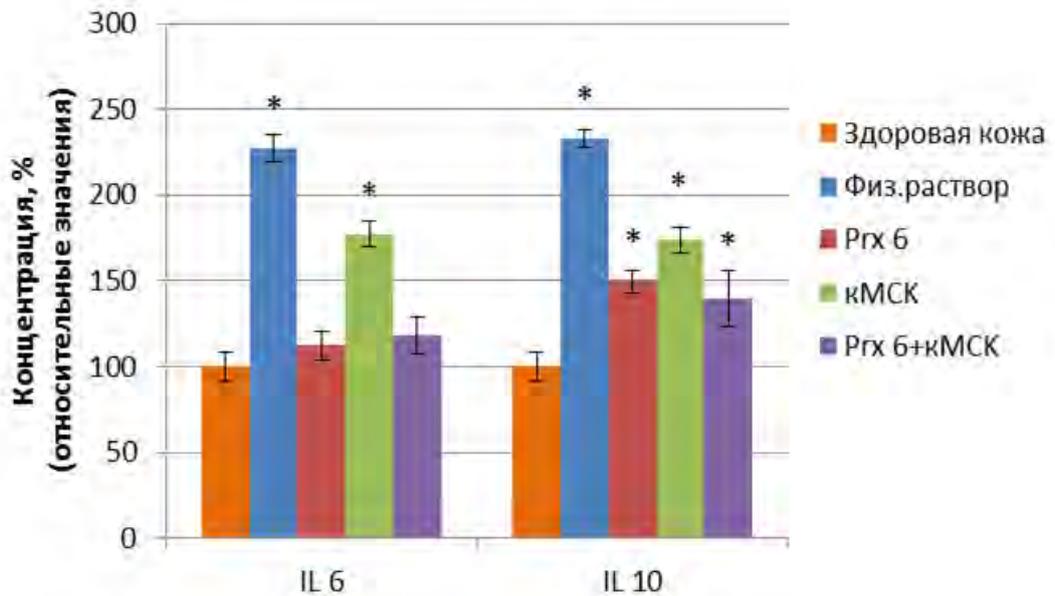


Рис 23. Концентрация интерлейкинов в ожоговой ране при использовании Prx 6 и кМСК

Относительная концентрация интерлейкинов в ране через 24 часа после нанесения ожога ТХУ. Данные рассчитаны относительно контроля (здоровая кожа) \pm SE (стандартная ошибка). N=15. Контроль принят за 100%.

*- достоверно по отношению к контролю ($p < 0,05$)

Исходя из результатов анализа профиля цитокинов, также можно сделать вывод о том, что в группе с препаратом Prx6 и паракринными факторами МСК активнее всего проходят процессы клеточной пролиферации и заживления ткани, так как общий уровень цитокинов, стимулирующих воспаление, в данной группе снижен. Данный вывод также подтверждает уровень относительной концентрации противовоспалительного IL-10,

который повышен в тканях, где наблюдается активный процесс воспаления и некроз.

1.2.6. Влияние Ргх6 и кМСК на биохимические показатели крови при химическом ожоге кожи

Поскольку активность ферментов АЛТ и АСТ в крови бывает повышена из-за различных физических травм, включая ожоговые и иные раны, то снижение активности данных ферментов может свидетельствовать об уменьшении воспаления в очаге поражения.

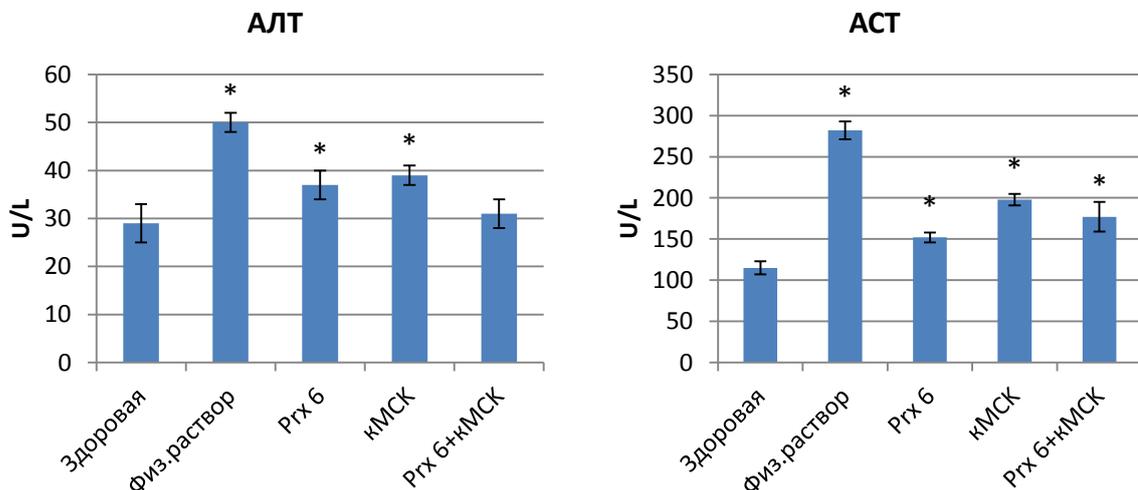


Рис 24. Активность ферментов АСТ и АЛТ в сыворотке крови крысы при химическом ожоге через 24 часа после нанесения ожога ТХУ

*- достоверно по отношению к контролю (здоровая кожа) ($p < 0,05$), $N=15$

Было показано, что активность ферментов АЛТ и АСТ в сыворотке крови здоровой крысы составляют 29 ± 5 U/L и 115 ± 8 U/L соответственно. При химическом ожоге (рис. 24) в группе с физиологическим раствором активность АЛТ и АСТ составляла 50 ± 2 U/L и 282 ± 21 U/L соответственно.

Во всех группах, где проводилось введение препаратов, активность АЛТ и АСТ сильно снижена, по сравнению с группой, в которой лечение

ожога проводилось физиологическим раствором. Так, активность АЛТ в опытных группах снижена более чем в 2,5 раза (P_{rx} 6 - 19±5 U/L; кМСК - 14±2 U/L; P_{rx} 6 +кМСК - 17±3 U/L). Применение исследуемых препаратов при химическом ожоге кожи ведет к нормализации показателей активности АСТ в крови крысы, причём он ниже активности АСТ здоровой крысы.

Исходя из результатов биохимического анализа крови, применение P_{rx} 6 и паракринных факторов МСК способствует снижению ферментативной активности АЛТ и АСТ, что указывает на положительный эффект применения данных препаратов на заживление ожоговой раны и организма в целом.

1.2.7. Роль пероксидазной активности экзогенного P_{rx}6 при химическом ожоге кожи

В связи с тем, что P_{rx}6 является полифункциональным ферментом, (обладает как пероксидазной, так и фосфолипазной активностями, и способен взаимодействовать с Toll-подобными рецепторами) [Fisher A.B., 2011] был исследован эффект мутантного P_{rx}6, не обладающего пероксидазной активностью, (с сохранением фосфолипазной активности и взаимодействием с TLR4-рецептором). В работе был использован P_{rx}6C47S (мутантный P_{rx}6), в котором проведена точечная замена в активном центре P_{rx}6 человека цистеина в 47 положении на серин. Данная мутация C47S полностью ингибирует пероксидазную активность P_{rx}6, но не приводит к структурным изменениям белка.

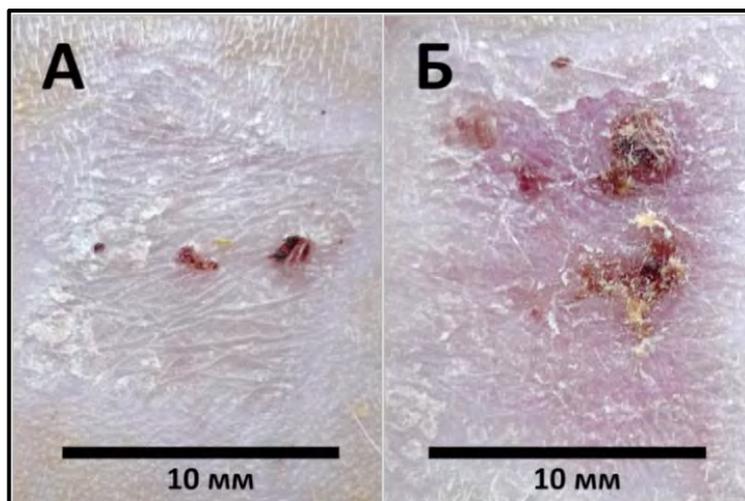


Рис. 25. Внешний вид ожога на 10 сутки после применения Prx 6 и Prx6C47S А –Prx 6; Б – Prx6C47S

Применение мутантного белка Prx6C47S, который не обладает пероксидазной активностью, не оказывает положительного влияния на процесс заживления ожоговой раны. Так, ожоговая рана на 10 сутки с использованием Prx 6 практически полностью эпителизирована, в то время как использование Prx6(C47S) не даёт значимых результатов (рис.25).

Поскольку мутантный Prx6, не обладающий пероксидазной активностью, не влиял никаким образом на процессы заживления кожных ран, именно пероксидазная активность Prx6 является основной в данном процессе.

2. Влияние экзогенного P_{гх6} и паракринных факторов МСК (кМСК) на динамику заживления механической полнослойной кожной раны

Оценка влияния экзогенного P_{гх6} и паракринных факторов МСК была так же проведена на модели механической полнослойной кожной раны. Данная модель отличается от модели химического ожога в первую очередь по механизму заживления раны. Механическая рана заживает посредством вторичного натяжения, а химический ожог – под струпом.

2.1. Влияние P_{гх6} и кМСК на морфологию механической раны

В контрольной группе отмечается минимальная динамика образования грануляционной ткани в первые 14 дней (в присутствии антиконтракционного кольца) и низкая скорость уменьшения площади раны в последующие дни (после удаления кольца) (рис. 26А). Следует отметить, что после извлечения устройства из раны, ее заживление происходило от краев раны к центру (рис. 1А).

Применение P_{гх 6} позволило сократить время заживления раны. В первые дни наблюдалось обилие гнойного экссудата, от которого рана очищалась к 4–5 суткам. Активировались репаративно-регенераторные процессы и возросла скорость образования грануляционной ткани. Замещение раневого дефекта после удаления кольца из раны произошло в меньшие сроки (рис. 26Б) по сравнению с контролем.

Кондиционированная среда МСК благотворно влияла на ход процесса регенерации, увеличивая скорость образования грануляционной ткани. При этом следует отметить, что закрытие раневого дефекта после удаления кольца происходило посредством контракции, что характерно для заживления ран первичным натяжением (рис. 26В).

Комбинированное использование двух компонентов достоверно ускорило заживление раны, как относительно контроля, так и по сравнению с опытными группами 1 и 2 (рис.26Г).



Рис.26. Заживление механической полнослойной раны при использовании Rgx 6 и кМСК

Верхний ряд – вид раны сверху после удаления антиконтрационного кольца (14 дней после травмы); нижний ряд – вид раны сверху через 14 дней после удаления антиконтрационного кольца (28 дней после травмы).

А – физ. р-р (контроль); Б – Rgx 6, В – кМСК, Г – Rgx 6 + кМСК

Таблица 3

Динамика изменения площади ожоговой раны ($M \pm m$, мм²)

Сутки после травмы	Контроль (физ.раствор)	Rgx 6 (группа 1)	кМСК (группа 2)	Rgx 6 + кМСК (группа3)
14	78,6±1,0	78,5±0,9	77,5±1,2	78,1±0,3
16	78,1±1,3	76,1±1,9*	74,0±3,4*	75,5±1,8*
18	70,5±3,1	63,4±3,6*	59,8±2,4*	58,6±3,1*
20	58,9±4,5	53,0±5,6*	42,9±3,3* [#]	38,4±3,7* [#]
22	47,1±4,1	38,3±2,7*	26,2±4,5* [#]	18,3±4,1* [#]
24	34,0±4,1	21,4±2,3*	14,2±2,0* [#]	9,2±1,3* ^{#x}
26	24,7±4,4	12,2±2,8*	9,8±1,0*	5,3±0,9* ^{#x}
28	18,2±1,0	9,6±1,8*	5,4±0,6* [#]	2,3±0,5* ^{#x}

* – достоверно по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

– достоверно по сравнению с группой 1, $p < 0,05$.

x – достоверно по сравнению с группой 2, $p < 0,05$.

† – достоверно по сравнению с группой 3; $p < 0,05$.

Результаты количественных исследований (таблица 3) показали, что после снятия устройства, в результате совместного применения кМСК и Pгх 6 площадь раны на 28 сутки значительно уменьшилась, регенерация практически завершена. Применение Pгх 6 и кМСК так же оказывает положительное действие, по сравнению с контрольной группой.

Заживление травматических повреждений мягких тканей – хорошо организованный процесс, который принято разделять на 4 фазы, характеризующие стадию заживления дефекта, что позволяет судить об эффективности применения препарата. Первой фазой течения раневого процесса считают фазу воспаления, ее пик приходится на 3 сутки.

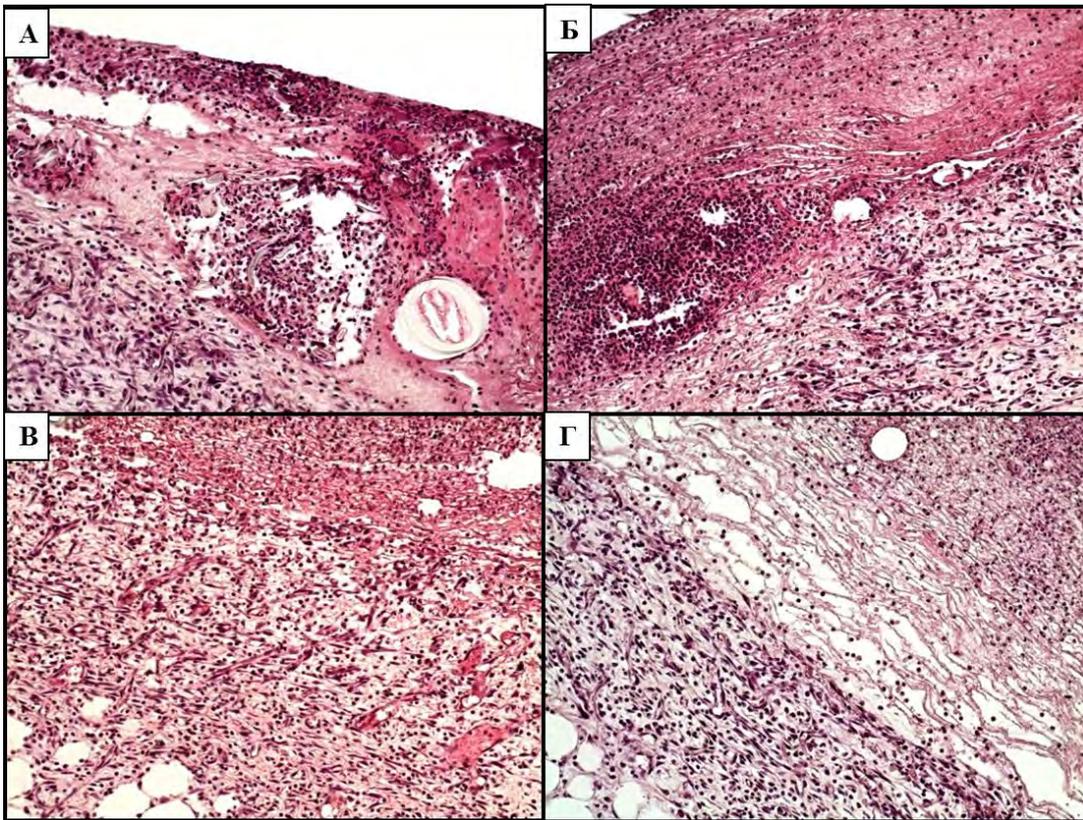


Рис.27. Морфологическая картина состояния механической полнослойной раны на 3 сутки при использовании Pгх 6 и кМСК

Окраска гематоксилином и эозином. Дно раны (x200) , N=15

А – физ. р-р (контроль); Б – Pгх 6, В – кМСК, Г – Pгх 6 + кМСК

На 3 сутки в контрольной группе дно язвенного дефекта представлено молодой грануляционной тканью с микроабсцессами, очагами некроза и явлениями отека (рис.27А). Поверхность грануляционной ткани покрыта слоем тканевого детрита с примесью гнойного экссудата.

В группе животных, где применялся Pгх 6 дно язвенного дефекта представлено грануляционной тканью с наличием микроабсцессов и покрыто тканевым детритом и гнойным экссудатом (рис.27Б). Более зрелая грануляционная ткань определяется в глубоких отделах (среди мышечной ткани), где также встречаются участки абсцедирования.

В группе, где применялись паракринные факторы МСК дно язвенного дефекта алогично контрольной группе и группе с использованием Pгх 6 (рис.27В). Грануляционная ткань представляется в этой зоне более зрелой (больше фибробластов, меньше явления отека).

В группе, где совместно применялись Pгх 6 и кМСК дно язвы представлено молодой грануляционной тканью (рис.27Г). В глубоких отделах наблюдается отек, по краям язвенного дефекта – новообразование эпидермиса. В глубоких отделах более зрелая грануляционная ткань, степень зрелости соответствует группе, где применяли Pгх 6.

После заполнения дна раны грануляционной тканью начинается этап эпителизации. Для оценки влияния препаратов в фазу ремоделирования животных выводили из эксперимента на 14 сутки.

В контрольной группе дно раны представлено грануляционной тканью, богатой мелкими сосудами в поверхностных участках (рис. 28А). Некротического слоя не наблюдается. Присутствует новообразованный эпидермис с явлениями акантоза и обилием новообразованных волосяных фолликулов.

В группе, где применялся Pгх 6 дно раны представлено созревающей грануляционной тканью, богатой сосудами, без некротического слоя (рис. 28Б).

В группе, где использовали кМСК дно язвы представлено созревающей грануляционной тканью без некротического слоя на поверхности грануляций (рис. 28В).

В группе с использованием комбинации Ргх 6 и кМСК дно язвы представлено созревающей грануляционной тканью, богатой новообразованными мелким сосудами в поверхностных участках (рис. 28Г). Некротического слоя не наблюдается.

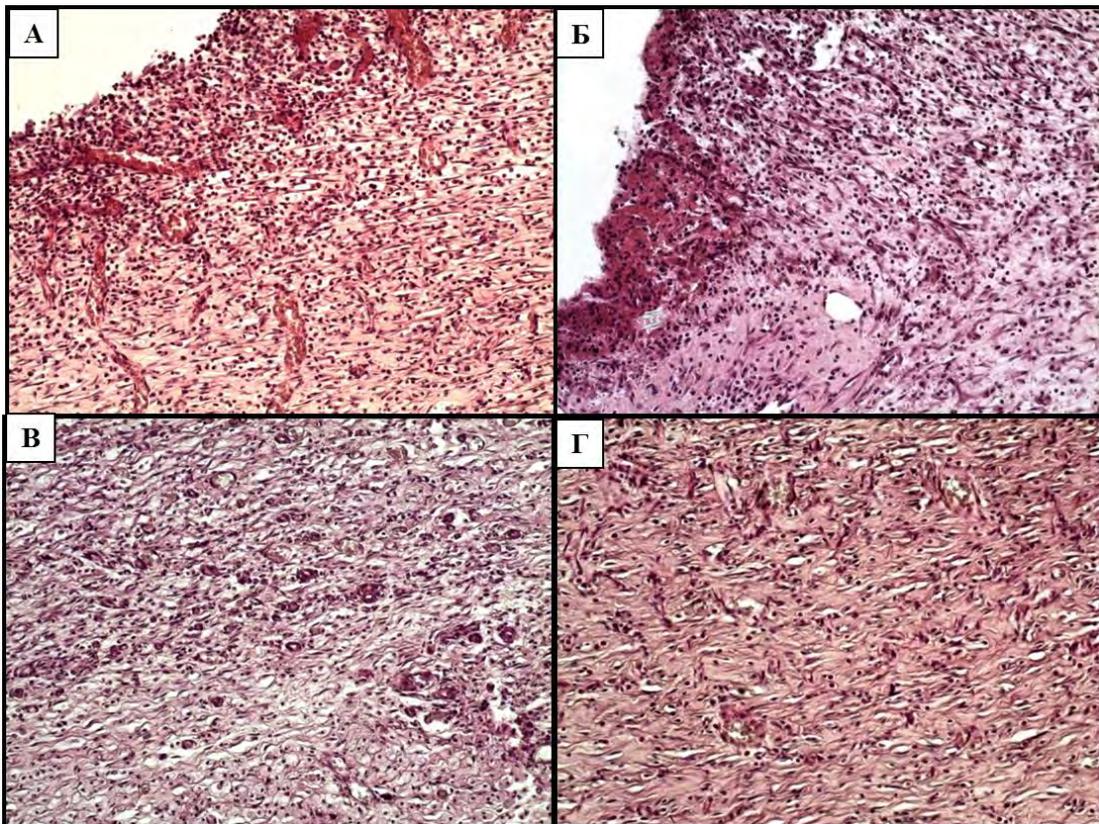


Рис. 28. Морфологическая картина состояния механической полнослойной раны на 14 сутки при использовании Ргх 6 и кМСК

Окраска гематоксилином и эозином. Дно раны (x200) , N=15

А – физ. р-р (контроль); Б – Ргх 6, В – кМСК, Г – Ргх 6 + кМСК.

Таким образом, на 3 и 14 сутки во всех исследованных группах вблизи краев антиконтракционного кольца под узким воспалительно-некротическим слоем отмечено большее по сравнению с центральными отделами раны скопление полиморфноядерных лейкоцитов (ПЯЛ). После удаления

антиконтракционного кольца количество ПЯЛ снижалось и соответствовало центральным отделам раны. Другая особенность заживления кожных ран, выявленная в группах с использованием кМСК – диффузно-очаговая макрофагальная реакция. Преимущественно в поверхностных участках раны отмечены скопления макрофагов, наиболее отчетливо макрофагальная реакция была отмечена на 14 сутки применения препаратов.

В краях раневого дефекта кожи отмечена пролиферация клеток базального слоя эпидермиса, наплывающего, по мере формирования и созревания грануляционной ткани, на её поверхность. В участках кожи краевой зоны во всех группах отмечена пролиферация липоцитов шеек волосяных фолликулов. Наиболее отчетливо пролиферативная активность липоцитов отмечена в группе с применением паракринных факторов МСК и совместном использовании кМСК и P_{гх} 6.

В опытных группах к 28 суткам эпителизация полностью завершена, эпидермис покрыт роговым слоем. Раневой дефект замещен созревающей фиброзной тканью. В группах, где применялись паракринные факторы МСК фиброзная ткань представляется более зрелой, её разрастания полностью достигают высоты предсуществующей кожи (рис. 29В, 29Г). В краевой зоне кожи выявлены новообразованные волосяные фолликулы с пролиферирующими шеечными липоцитами и новообразованием волос. Наибольшее их количество обнаружено так же в группах, где применяли кМСК. При комбинированном использовании P_{гх} 6 и кМСК к 28 суткам отмечено более активное новообразование волосяных луковиц в пограничной зоне кожных краев.

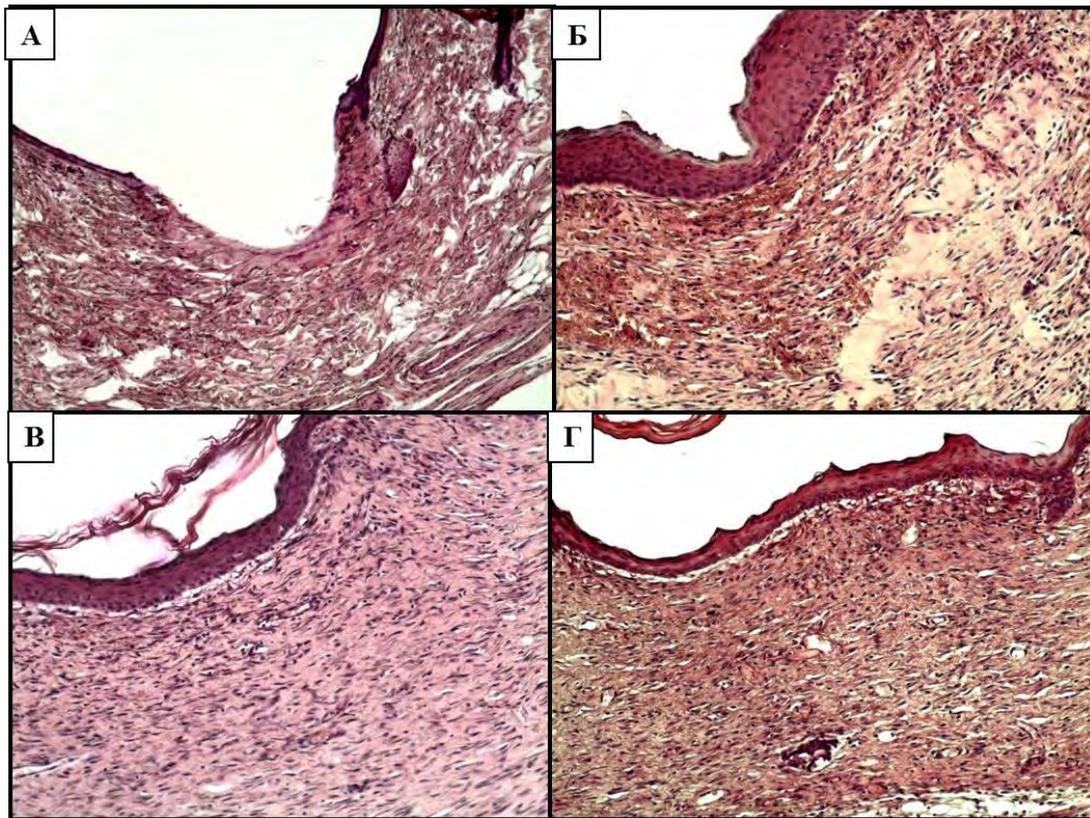


Рис. 29. Морфологическая картина состояния механической полнослойной раны на 28 сутки при использовании Prx 6 и κМСК

Окраска гематоксилином и эозином. Дно раны (x200) , N=15

А – физ. р-р (контроль); Б – Prx 6, В –κМСК, Г– Prx 6 + κМСК

Для объективизации степени созревания грануляционной ткани мы провели количественные исследования центральных участков кожных ран. В ходе исследования фиксировали общее количество клеток, появление рассеянных фибробластов, врастание в поверхностный слой новообразованных сосудов, развитие вертикальных сосудов и формирование слоя горизонтальных фибробластов глубокого слоя, а также пролиферативная активность эпителия в краях кожной раны. Было отмечено, что созревание грануляционной ткани в экспериментальных группах происходит быстрее, а сама ткань выглядит более зрелой, особенно через 28 суток после нанесения повреждения. Полученные результаты приведены в таблицах 4 и 5.

Таблица 4

**Количество клеточных элементов и сосудов грануляционной ткани
в единице площади препарата, М±m**

Группы исследования	Общее количество клеток	Количество фибробластов и фиброцитов	Количество сосудов
14 сутки			
Контроль (физ.р-р)	452±55	107±48	15±5
Группа 1 (Pгх6)	453±59	112±11	19±6
Группа 2 (кМСК)	568±92	201±54*‡	17±5
Группа 3 (Pгх6+кМСК)	516±84	161±21‡	20±8
28 сутки			
Контроль (физ.р-р)	371±64	128±33	11±3
Группа 1 (Pгх6)	385±99	184±62	21±7*
Группа 2 (кМСК)	328±51	258±50*‡	11±2‡
Группа 3 (Pгх6+кМСК)	314±93	217±61*‡	12±5

*- достоверно по отношению к контролю ($p < 0,05$)

‡- достоверно по отношению к группе 1 ($p < 0,05$)

Индекс созревания грануляционной ткани выявил наибольший эффект при использовании паракринных факторов МСК (таблица 5).

Таблица 5

Индекс созревания грануляционной ткани в кожной ране

Группы исследования	Индекс созревания грануляционной ткани	
	14 суток	28 суток
Контроль (физ.р-р)	0,24	0,35
Группа 1 (Pгх6)	0,25	0,48
Группа 2 (кМСК)	0,35	0,79
Группа 3 (Pгх6+кМСК)	0,31	0,79

Коэффициент (индекс) созревания грануляционной ткани - отношение количества фибробластов/ к общему количеству клеток в единице препарата.

Таким образом, применение P_{rx} 6 улучшало васкуляризацию грануляционной ткани, через 14 и 28 суток (таблица 5), что свидетельствует о благоприятном действии данного фермента на заживление ран. Наибольший эффект наблюдается в первые дни, что, по-видимому, связано с нейтрализацией окислительного стресса. Использование паракринных факторов МСК увеличивало процентное содержание фибробластов в ране и тем самым ускоряло процесс созревания грануляционной ткани.

2.2. Влияние P_{rx}6 и кМСК на уровень апоптоза в механической ране

Сравнивая эффект применения P_{rx} 6, паракринных факторов МСК, а так же их совместного применения на механической кожной ране во всех трех группах наблюдается понижение относительной концентрации Cas 3 в 2 раза, относительно группы с применением физиологического раствора (рис. 30).

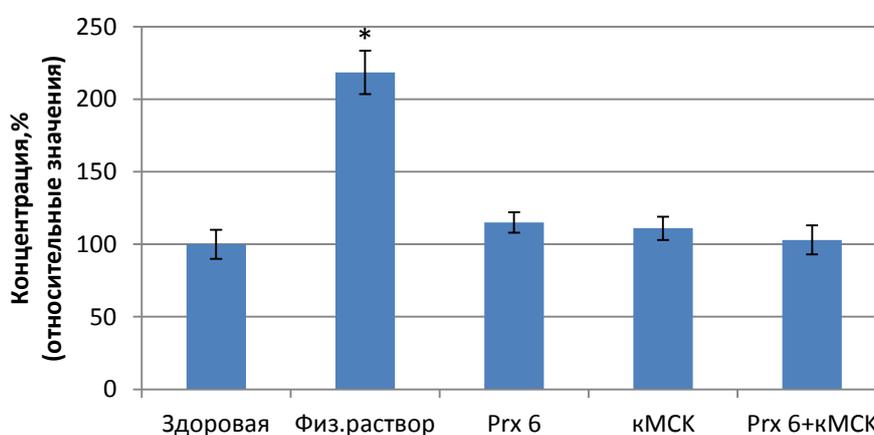


Рис. 30. Концентрация Cas-3 в механической ране при использовании P_{rx} 6 и кМСК

Относительная концентрация Cas-3 в ране через 24 часа после нанесения ожога ТХУ. Данные рассчитаны относительно контроля (здоровая кожа) \pm SE (стандартная ошибка). N=15. Контроль принят за 100%.

*- достоверно по отношению к контролю ($p < 0,05$)

Концентрация Cas 3 в группах с использованием препаратов P_{rx}6 и кМСК достоверно незначима относительно контрольной группы (здоровая кожа).

Таким образом, P_{rx} 6 и паракринные факторы МСК уменьшают выделение Cas 3 в клетках поражённой ткани, а следственно снижают интенсивность апоптоза.

2.3. Влияние P_{rx}6 и кМСК на уровень пролиферации в механической ране

Концентрация Ki-67 позволяет судить о процессе пролиферации, который происходит на краях раны.

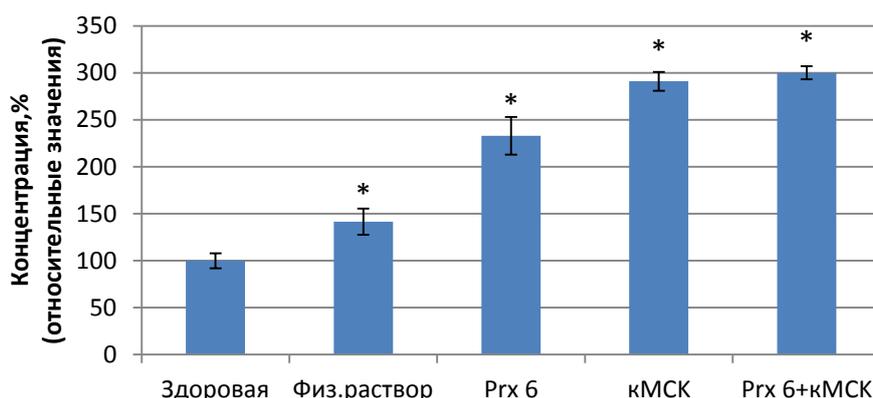


Рис. 31. Концентрация Ki-67 в механической ране при использовании P_{rx} 6 и кМСК

Относительная концентрация Ki-67 в ране через 24 часа после нанесения ожога ТХУ. Данные рассчитаны относительно контроля (здоровая кожа) \pm SE (стандартная ошибка). N=15. Контроль принят за 100%.

*- достоверно по отношению к контролю ($p < 0,05$)

В анализе на наличие Ki-67 было отмечено, что в группах, где после нанесения раны использовались P_{rx} 6 паракринные факторы МСК и сочетание P_{rx}6 и паракринных факторов МСК, относительная концентрация была выше в 2 раза по сравнению с группой, где применялся

физиологический раствор. Применение Prx 6 так же ведёт к увеличению Ki-67 в ране (рис. 31). Таким образом, Prx 6 и паракринные факторы МСК увеличивают степень пролиферации, причём наибольший эффект наблюдается при их совместном применении.

2.4. Влияние Prx6 и кМСК на биохимические показатели крови после нанесения механической раны

После нанесения механической полнослойной кожной раны, в контрольной группе (физиологический раствор) через 24 часа активность АЛТ и АСТ составляла 59 ± 5 U/L и 361 ± 14 U/L соответственно (рис. 32).

Во всех группах, где проводилось нанесение препаратов на зону поражения, активность ферментов АЛТ и АСТ сильно снижены, по сравнению с группой, где применялся физиологический раствор. Активность АЛТ в группах с применением препаратов снижена в 3 и более раза (Prx 6 - 24 ± 4 U/L; кМСК - 15 ± 2 U/L; Prx 6 +кМСК - 17 ± 2 U/L). Применение исследуемых препаратов так же ведет к значительному снижению активности АСТ в крови (Prx 6 - 138 ± 10 U/L; кМСК - 111 ± 6 U/L; Prx 6 +кМСК - 129 ± 7 U/L).

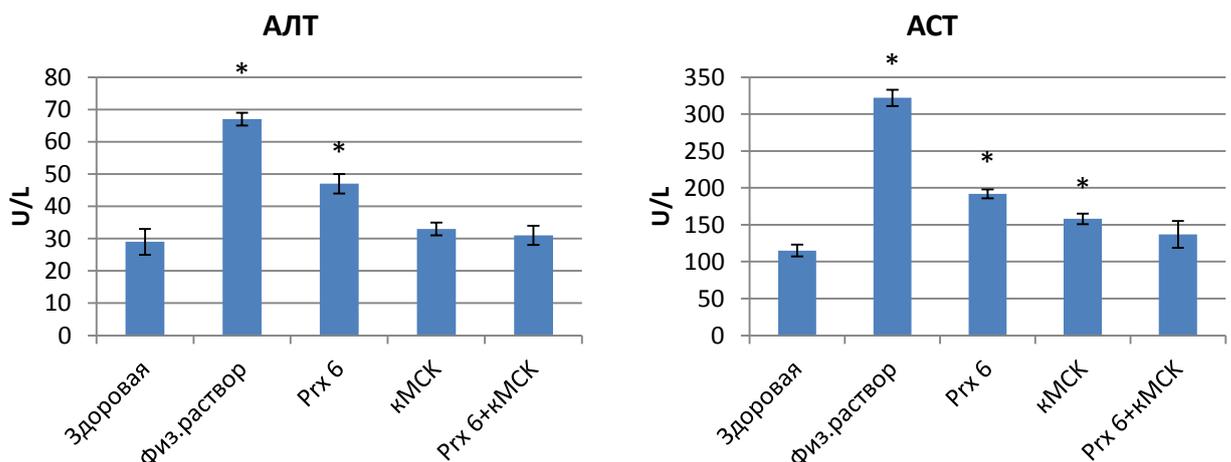


Рис 32. Активность ферментов АСТ и АЛТ в сыворотке крови крысы после нанесения механической раны при использовании Prx 6 и кМСК через 24 часа

*- достоверно по отношению к контролю ($p < 0,05$), $N=15$

Исходя из результатов биохимического анализа крови, применение Prx 6 и паракринных факторов МСК способствует снижению активности ферментов АЛТ и АСТ, что свидетельствует о положительном влиянии данных препаратов на общее состояние организма в целом, и как следствие на улучшение процессов регенерации в поражённой ткани. Эти данные соотносятся с данными, полученными для модели химического ожога кожи.

IV. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной работе для ускорения заживления ран были исследованы (1) вклад экзогенных ферментов-антиоксидантов в нейтрализацию окислительного стресса и (2) вклад паракринных факторов мезинхимальных клеток в ускорение процессов пролиферации клеток. Как упоминалось ранее, в работе были использованы две принципиальные модели заживления раны: заживление раны проходило под струпом (химический ожог) и путем вторичного натяжения (механическая рана).

Оценка динамики регенерации кожи при химическом ожоге показала, что окислительный стресс наблюдался в течение первых 7 дней после нанесения ожога. Эти результаты согласуются с другими исследованиями, в которых сообщается об увеличении перекисного окисления липидов в течение первых двух недель после нанесения ожоговых травм [Дубинина Е.Е. и др.; 2001]. Более того наблюдалось снижение активности антиоксидантных ферментов, связанных с нарушением микроциркуляции, истощением антиоксидантной системы и, соответственно, усугублением степени поражения ткани вследствие окислительного стресса.

Концентрация одного из продуктов свободно-радикального окисления липидов, малонового диальдегида (МДА), накопление которого отражает степень окислительного стресса в организме, в коже через 1 час после нанесения химического ожога вырос в 2,5 раза. Через сутки концентрация МДА в ожоговой ране уменьшилась, а к третьим суткам была статистически незначимой по сравнению со здоровой кожей. Оценка данного показателя в ожоговой ране показала, что при химическом ожоге в коже возникает мощный окислительный стресс, который губительно действует на клетки, препятствуя нормальному течению процесса заживления кожной раны.

Таким образом, химический ожог на первом этапе сопровождается мощным окислительным стрессом, который увеличивает тяжесть

поражения ткани, и соответственно, приводит к удлинению сроков заживления раны.

В частности, химический ожог сопровождается увеличением уровня основного маркера клеточной гибели каспазы 3 и незначительным увеличением фактора пролиферации Ki-67. Это приводит к увеличению сроков регенерации кожных ран, а так же большой вероятности образования большого рубца. Концентрация каспазы 3, основного маркера клеточной гибели, в коже крысы через 1 час после нанесения ожоговой раны в 2,3 раза выше, чем в здоровой коже, к седьмым суткам уровень каспазы 3 в пораженной коже падает. Уровень Ki-67 в поражённой коже достигает максимума лишь через 24 часа, а далее постепенно уменьшается по мере заживления раны.

Уровень провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6, которые высвобождаются тканевыми макрофагами и моноцитами в ответ на любое повреждение, и противовоспалительного цитокина IL-10 в коже увеличивается в 1,5-2 раза после нанесения химического ожога. Цитокин IL-1 способствует активации фагоцитов и их миграции в очаг воспаления, участвует в индукции апоптоза. Под влиянием IL-1 повышается синтез IL-6, важнейшего медиатора острой фазы воспаления, который продуцируется фибробластами, активированными моноцитами и макрофагами. Цитокин IL-10 функционирует в противовоспалительном ключе, секреция этого цитокина не позволяет воспалению приобрести неконтролируемый характер. При воспалительных процессах в коже помимо выделения цитокинов, происходит интенсивное выделение NO и его генерация превышает нормальный функциональный уровень, что подтвердилось в данном исследовании на модели химического ожога кожи.

В данном исследовании в качестве фермента-антиоксиданта для нейтрализации окислительного стресса был выбран экзогенный человеческий рекомбинантный Ptx 6. Визуальная и гистологическая оценка эффективности

применения P_{rx} 6 при химическом ожоге показала, что использование данных препаратов значительно увеличивает скорость регенерации поражённой кожи, чем в контрольной группе (в 2-3 раза). Это обусловлено нейтрализацией окислительного стресса (по малоновому диальдегиду), уменьшением апоптоза (по каспазе 3), увеличением пролиферации клеток (по Ki-67) в ткани раны при применении фермента-антиоксиданта, уменьшением уровней провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8, IL-10).

Для выявления роли именно пероксидазной активности P_{rx}6) [Fisher A.V., 2011] в прорегенеративных и протекторных эффектах был использован мутантный P_{rx}6, который не обладает пероксидазной активностью (P_{rx}6C47S). Было показано, что использование P_{rx}6C47S не оказывало никакого влияния на регенерацию ожоговой раны. Именно это указывает на основную роль пероксидазной активности в протекторных и прорегенеративных свойствах фермента P_{rx}6, а так же говорит о том, что чрезмерное формирование АФК является одной из основных причин для массивного повреждения клеток при травме кожи. Аналогичные результаты были получены ранее при ожоге трахеи [Volkova A.G. et al., 2014]. Следует отметить, что P_{rx}6, взаимодействуя с рецептором TLR4, может влиять на различные внутриклеточные процессы. Однако, мутантный P_{rx}6, не обладающий пероксидазной активностью, не влиял никаким образом на процессы заживления кожных ран, именно пероксидазная активность P_{rx}6 является основной в данном процессе.

Аналогичный эффект экзогенного P_{rx}6 был так же показан на модели механической полнослойной кожной раны. Гистологический анализ показал, что в механической полнослойной ране на 14 сутки на краях раневого дефекта кожи отмечена пролиферация клеток базального слоя эпидермиса, наползающего, по мере формирования и созревания грануляционной ткани, на её поверхность. В участках кожи краевой зоны отмечена пролиферация липоцитов шеек волосяных фолликулов.

В механической ране Ptx 6 уменьшает выделение Cas 3 в клетках поражённой ткани, а следственно снижают интенсивность апоптоза, а так же увеличивают степень пролиферации. Применение Ptx 6 улучшало васкуляризацию грануляционной ткани, через 14 и 28 суток, что свидетельствует о благоприятном действии данного фермента на заживление ран. Наибольший эффект наблюдается в первые дни, что, вероятнее всего, связано с нейтрализацией окислительного стресса.

Действительно, нейтрализация окислительного стресса с помощью ферментов-антиоксидантов в начальной стадии заживления полнослойной механической раны также является важным фактором для ускорения их заживления. Следует отметить, что поскольку Ptxб является белковой молекулой, то соответственно, по-видимому, он не может проникать через клеточную мембрану. Отсюда следует, что Ptxб нейтрализует, в первую очередь, избыточные формы кислорода в межклеточном пространстве, защищая мембраны клеток от ПОЛ.

Оценка эффективности применения паракринных факторов МСК при химическом ожоге показала, что использование данных препаратов значительно увеличивает скорость регенерации поражённой кожи, чем в контрольной группе (в 1,5-2,5 раза). Это обусловлено уменьшением апоптоза (по каспазе 3) и увеличением пролиферации клеток (по Ki-67) в ране, уменьшением уровней провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (IL6, IL8, IL10).

Эффект паракринных факторов МСК был так же показан на модели механической полнослойной кожной раны. паракринные факторы МСК снижают интенсивность апоптоза, а также увеличивают степень пролиферации. Наиболее отчетливо пролиферативная активность липоцитов отмечена в группе с применением паракринных факторов МСК. Использование паракринных факторов МСК увеличивало процентное содержание фибробластов в ране и тем самым ускоряло процесс созревания грануляционной ткани.

Таким образом, паракринные факторы МСК показали свою эффективность на обеих моделях заживления ран, при этом наибольший эффект наблюдался при их использовании при заживлении механической полнослойной раны. По-видимому, это связано с тем, паракринные факторы МСК способствуют миграции фибробластов в зону поражения, которые, в свою очередь, синтезируют коллаген, что играет ведущую роль в заживлении механической полнослойной раны.

Если в случае Rrxб его эффект связан с пероксидазной активностью, то в случае с паракринными факторами МСК этот вопрос по-прежнему остается открытым. Это объясняется тем, что в культуральной среде МСК содержатся различные факторы, в частности, HGF, VEGF, KGF, FGF, EGF и др. Поэтому, в настоящее время трудно объяснить, какие из факторов МСК являются ведущими при заживлении ран.

Поскольку и Rrxб, и паракринные факторы МСК проявляли положительный эффект при заживлении ран, и при этом они имели, по-видимому, разный механизм действия, то целесообразно было рассмотреть их совместный эффект на обеих моделях кожных ран. Действительно, совместное использование Rrx б и паракринных факторов МСК при химическом ожоге значительно увеличивает скорость регенерации поражённой кожи (в 2-3 раза), что обусловлено нейтрализацией окислительного стресса, уменьшением апоптоза, увеличением пролиферации клеток. Анализ профиля противовоспалительных и провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8, IL-10 в поражённой ткани также свидетельствует, что в группе с применением Rrxб и паракринными факторами МСК активнее всего проходят процессы клеточной пролиферации и заживления ткани.

В механической ране совместное применение Rrx б и паракринных факторов МСК уменьшает выделение Cas 3 в клетках поражённой ткани, а следовательно снижают интенсивность апоптоза, а также увеличивают степень пролиферации. При совместном использовании паракринных факторов МСК и Rrx б при наиболее отчетливо отмечена пролиферативная активность

липоцитов, к 28 суткам фиброзная ткань представляется более зрелой, её разрастания полностью достигают высоты предсуществующей кожи. В краевой зоне кожи выявлены новообразованные волосяные фолликулы с пролиферирующими шеечными липоцитами и новообразованием волос.

Таким образом, совместный эффект пероксиредоксина β и паракринных факторов МСК не является синергетическим, однако данный эффект приводит к наилучшему терапевтическому результату при лечении как химического ожога, так и механической полнослойной кожной раны.

На основании полученных данных предлагается схема, демонстрирующая механизм протекторного действия $\text{Ptx}\beta$ и прорегенеративного действия паракринных факторов МСК при механических и химических травмах кожи (рис. 33).

Воспаление является ключевым процессом, который может определить не только скорость заживления раны, но и степень фиброза. Воспалительная фаза начинается с коагуляции крови, за этим следует увеличение кровотока в областях, прилегающих к ране, сопровождающееся набуханием и краснотой из-за повышенной проницаемости сосудов местными воспалительными агентами (в том числе IL-1) [Harvey C., 2005], которые в свою очередь инициируют скопление нейтрофилов и макрофагов в области раны. Моноциты, проникающие в зону ранения, дифференцируются в макрофаги и стимулируют ангиогенез и синтезируют оксид азота (NO) [Witte M.B. and Barbul A., 2002]. Нейтрофилы удаляют зараженные патогены фагоцитозом, а так же выделяют АФК [Segal A.W., 2005; Wild T. and Auböck J., 2007]. Однако чрезмерное накопление АФК приводит к окислительному стрессу, который, в свою очередь, замедляет процесс ангиогенеза и усиливает апоптоз (рис. 30А).

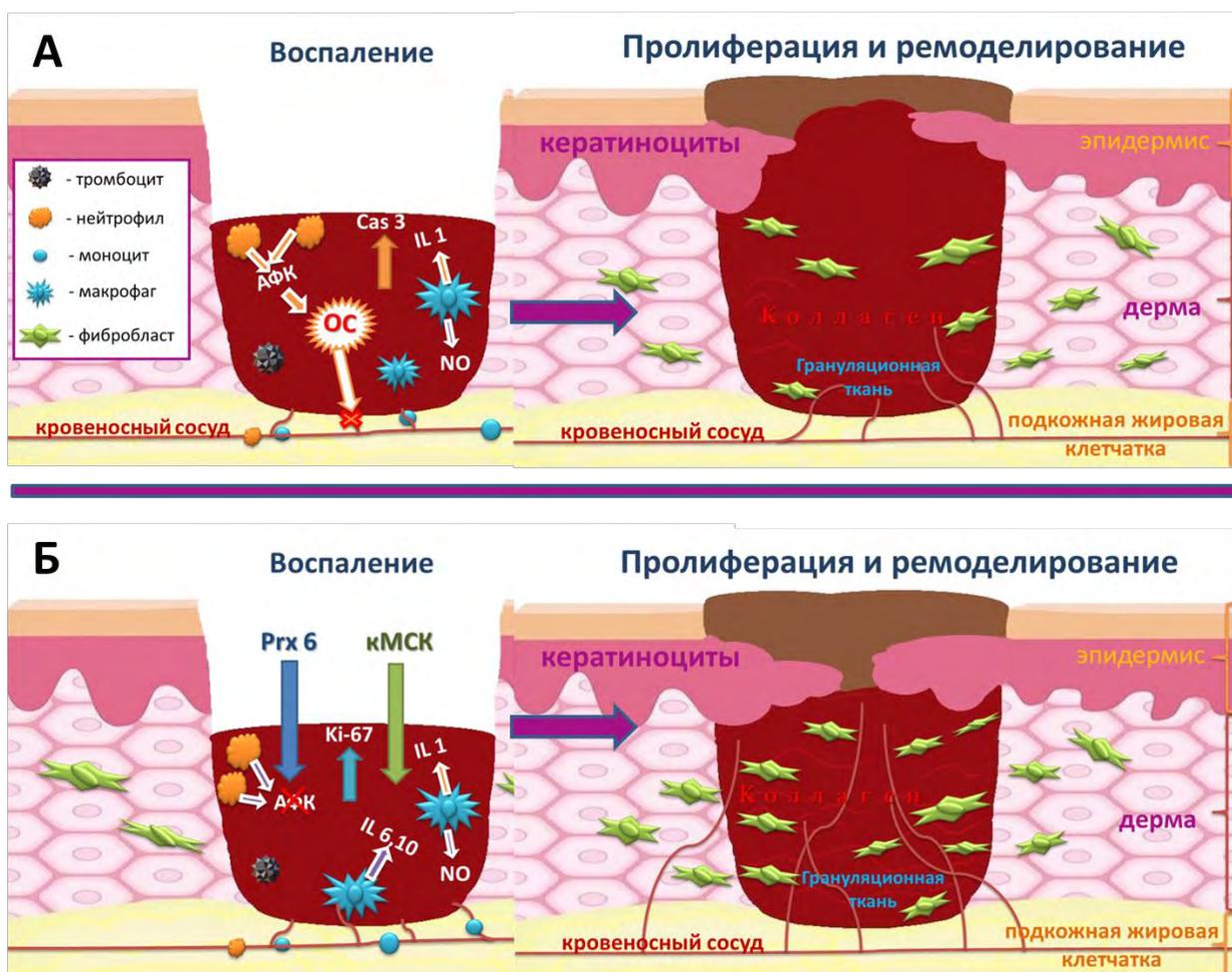


рис. 33. Особенности заживления кожной раны при использовании Prx 6 и паракринных факторов МСК (кМСК). А – заживление раны без использования Prx 6 и кМСК; Б – заживление раны с применением Prx 6 и кМСК.

Условные обозначения: АФК – активные формы кислорода; ОС – окислительный стресс; NO – оксид азота; Cas 3 – Caspase 3 (маркер апоптоза); Ki 67 – маркер клеточной пролиферации; IL 1 – интерлейкин 1 (провоспалительный интерлейкин); IL 6, 10 – интерлейкины 6, 10 (противовоспалительные интерлейкины).

После воспалительной фазы стимулируется пролиферация сосудистых эндотелиальных клеток и фибробластов. Смежные здоровые ткани, а также эндотелиальные предшественники инициируют ангиогенез, что приводит к образованию «грануляционной ткани» [Harvey С., 2005]. Затем следует миграция кератиноцитов с краев раны на поверхность грануляционной ткани [Rhett, J.M. et. al., 2008]. Фибробласты синтезируют коллаген. Во время последней фазы, ремоделирования, происходит повторная эпителизация

раны, а дерма восстанавливает свою прочность. Тем не менее, шрам может оставаться от нескольких месяцев до нескольких лет [Harvey C., 2005] (рис. 30А).

R α 6 нейтрализует окислительный стресс в ране. Снижение гиперпродукции АФК опосредует уменьшение апоптоза, увеличение регенеративной способности ткани, а также увеличению васкуляризации сосудов (рис.30Б). Паракринные факторы МСК, в свою очередь, способствуют выработке большего количества противовоспалительных цитокинов, таких как IL-6 и IL-10, снижению концентрации воспалительных цитокинов, регулируя тем самым процесс воспаления. Совместное применение как R α 6, так и паракринных факторов МСК способствовало сокращению сроков закрытия раневой поверхности. Фермент-антиоксидант R α 6 стимулировал ангиогенез, а паракринные факторы МСК способствовали миграции фибробластов в зону поражения, тем самым, регулируя выработку коллагена. Таким образом, совместное действие R α 6 и паракринных факторов МСК на этапе пролиферации направлено на стимуляцию образования грануляционной ткани, способствуя сокращению сроков регенерации поврежденной ткани.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что и химическое, и механическое повреждение кожи сопровождается окислительным стрессом и увеличением уровня провоспалительных биомаркеров в поражённом участке кожи.

Применение пероксиредоксина β улучшало васкуляризацию грануляционной ткани, что свидетельствует о благоприятном действии данного фермента на заживление ран. Таким образом, нейтрализация окислительного стресса с помощью ферментов-антиоксидантов в начальной стадии заживления полнослойной механической раны является важным фактором для ускорения их заживления. Следует отметить, что поскольку пероксиредоксин β является белковой молекулой, то, по-видимому, он не может проникнуть в клеточную мембрану. Отсюда следует, что пероксиредоксин β нейтрализует, в первую очередь, избыточные формы кислорода в межклеточном пространстве, защищая мембраны клеток от перекисного окисления липидов.

Паракринные факторы МСК также показали свою эффективность на обеих моделях заживления ран, при этом наибольший эффект наблюдался при их использовании при заживлении механической полнослойной раны. По-видимому, это связано с тем, что паракринные факторы МСК способствуют миграции фибробластов в зону поражения, которые, в свою очередь, синтезируют коллаген, что играет ведущую роль в заживлении механической полнослойной раны.

Установлено, что эффект пероксиредоксина β связан с пероксидазной активностью, тогда как механизм действия паракринных факторов МСК пока не выяснен из-за многочисленных регуляторных факторов в культуральной среде МСК.

Совместное использование пероксиредоксина β и паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток, благодаря их протекторному и

прорегенеративному эффекту вызывает наилучший терапевтический эффект, ускоряя процесс заживления ран.

Таким образом, в данной работе показано действие трех разных типов препаратов для заживления кожных ран. Было показано, что в зависимости от типа поражения, целесообразно использование того или иного препарата: пероксиредоксина б – при химическом ожоге кожи, препарата паракринных факторов МСК – при механической полнослойной кожной ране. Третий же препарат – комбинация фермента антиоксиданта пероксиредоксина б и паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток, оказывает наилучшее терапевтическое действие, независимо от этиологии раны, являясь наиболее перспективным средством для заживления кожных ран.

ВЫВОДЫ

1. Как химический ожог, так и механическая полнослойная рана кожи в первые сутки вызывает разрушение тканей, которое сопровождается окислительным стрессом (увеличение концентрации МДА в 2,5 раза), увеличением уровня оксида азота в 2,5 раза, увеличением уровня клеточного апоптоза (по Cas 3 в 2,3 раза) в пораженной коже.

2. Внутрикожное введение Prx 6 при химическом ожоге уменьшает концентрацию МДА в 1,5 раза, снижает уровень клеточного апоптоза более чем в 2 раза (по Cas 3) и повышает пролиферацию клеток в 2 раза (по Ki-67); уменьшает уровни провоспалительных цитокинов в 2 раза в пораженной ткани. Аппликации Prx 6 в процессе заживления механической раны способствуют снижению уровня апоптоза в 2 раза (по Cas 3) и повышению пролиферации в 1,5 раза (по Ki-67), а также улучшают васкуляризацию грануляционной ткани в пораженной коже. Эффект пероксиредоксина 6 определяется его пероксидазной активностью, что показано при использовании его мутантного аналога Prx6C47S, не обладающего пероксидазной активностью.

3. Применение паракринных факторов МСК при химическом ожоге кожи приводит к снижению в 2 раза уровня апоптоза (по Cas 3) и повышению пролиферации клеток в 2 раза (по Ki-67), а также к уменьшению уровней провоспалительных цитокинов в пораженной ткани. Использование паракринных факторов МСК при заживлении полнослойной механической кожной раны в 2 раза снижает уровень апоптоза (по Cas 3) и в 2 раза повышает пролиферацию клеток (по Ki-67), а также увеличивает содержание фибробластов в ране в 2 раза, ускоряя процесс созревания грануляционной ткани в области раневого дефекта.

4. Совместное использование Prx 6 и паракринных факторов МСК обеспечивает наиболее оптимальные условия для заживления ожоговых и механических ран, а именно: подавляет окислительный стресс, уменьшает в 2 раза уровень апоптоза (по Cas 3), в 2 раза увеличивает пролиферацию клеток

(по Ki-67), а также уменьшает уровни провоспалительных цитокинов в пораженной ткани, способствуя сокращению сроков регенерации в 2–3 раза и оказывая тем самым наилучший терапевтический эффект.

5. Эффективность того или иного препарата зависит от типа поражения: пероксиредоксин 6 – при химическом ожоге кожи, препарат паракринных факторов МСК – при механической полнослойной кожной ране. Комбинация пероксиредоксина 6 и паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток, – независимо от этиологии раны оказывает наилучшее терапевтическое действие.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Кочкина А. В. Влияние пероксиредоксина 6 и паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток на заживление полнослойной кожной раны / А. В. Кочкина, К. А. Рогов, М. Г. Шарапов, В.А. Евдокимов, Е.Н. Музафаров, В.И. Новоселов, А.В. Мелерзанов, А.А. Темнов // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2017. – № 2 (22). – С. 52–58.

2. Кочкина А. В. Влияние пероксиредоксина 6 и паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток на цитокиновый профиль кожи крысы при химическом ожоге / А. В. Кочкина // Вестник новых медицинских технологий. – 2017. – Т. 24, № 1. – С. 65–70.

3. Кочкина А. В. Экспрессия каспазы-3 и уровень цитокинов при экспериментальном реперфузионном синдроме на фоне применения пероксиредоксина 6 / А. В. Кубышкин, С. В. Новоселов, И. И. Фомочкина, В. З. Харченко, А. А. Писарев, А. Е. Гордеева, А. А. Бекетов, А. В. Кочкина, М. И. Федосов, Л. В. Анисимова, Р. Г. Гончаров // Биофизика. – 2017. – Том 62, вып.5. – С.1030–1035.

4. Кочкина А. В. Исследование эффективности и ингаляционной токсичности средства для обеззараживания воздуха в зоне дыхания человека для неспецифической профилактики воздушно-капельных инфекций / А. Ю. Скопин, Л. С. Федорова, Е. В. Карадулева, Р. Г. Гончаров, А. В. Кочкина, А. Е. Гордеева, В. А. Евдокимов, Р. В. Разживин, Д. Л. Виноградов, В. И. Новоселов // Эпидемия и инфекционные болезни. – 2017. – №4. – С. 4–11.

5. Кочкина А. В. Распределение экзогенных ферментов-антиоксидантов в организме при свободно-радикальных патологиях / А. Е. Гордеева, А. В. Кочкина, Е. В. Карадулева, В. И. Новоселов // Международный научно-исследовательский журнал. – 2015. – № 9 (40). – С. 6–10.

6. Потапова А. В. Эффективность введения в кожу пероксиредоксина 6 и паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток перед

нанесением химического ожога / А. В. Потапова // Естественные и Технические науки. – 2017. – № 12. – С. 106–109.

Тезисы конференций:

7. Кочкина А. В. Эффект пероксиредоксина 6 и паракринных факторов на заживление открытых ран / А. В. Кочкина, А. А. Темнов, В. И. Новоселов, Е. Н. Музафаров // Материалы всероссийской научной конференции с международным участием «Перспективы развития химических и биологических технологий в 21-м веке». – Саранск, 2015. – С. 198–203.

8. Кочкина А. В. Распределение эндогенного и экзогенного пероксиредоксинов в тканях и органах крыс / А. В. Кочкина, Э. К. Мубаракшина, Е. В. Карадулева, А. Г. Волкова, В. И. Новоселов // Материалы докладов V съезда биофизиков России, Ростов-на-Дону, 2015. – Том 2. – С. 242.

9. Kochkina A. V. Effect of peroxiredoxin 6 and paracrine factors in wounded skin / A. V. Kochkina, A. A. Temnov, V. I. Novoselov, M. G. Sharapov // Programme and Abstracts collection of Russian-German BioTech-2015. – Russia, Pushchino, 2015. – P. 27–29.

10. Кочкина А. В. Влияние пероксиредоксина 6 и паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток на регенерацию кожных покровов / А. В. Кочкина, А. А. Темнов, В. И. Новоселов // Материалы II Национального Конгресса по регенеративной медицине. – М., 2015. – С. 90–91.

11. Кочкина А. В. Влияние пероксиредоксина 6 и ростовых факторов на скорость регенерации эпителия в открытых ранах / А. В. Кочкина, В. И. Новоселов, Е. Н. Музафаров, А. А. Темнов // Биология – наука XXI века: 20-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. – Пущино, 2016. – С. 270–271.

12. Кочкина А. В. Эффекты паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток и пероксиредоксина 6 на динамику регенерации кожи при обширном раневом дефекте / А. В. Кочкина, Е. Н. Музафаров, А. А. Темнов, В. И. Новоселов // XV Всероссийское совещание с международным участием

и VIII школа по эволюционной физиологии. Сборник материалов. Санкт-Петербург, 17–22 октября 2016 года, с. 122–123

13. Кочкина А. В. Влияние паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток и пероксиредоксина β на процесс регенерации кожного раневого дефекта / А. В. Кочкина, Е. Н. Музафаров, А. А. Темнов, В. И. Новоселов // Материалы XXIV Международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов». Секция «Физиология человека и животных». – М., 2017.

14. Кочкина А. В. Эффекты пероксиредоксина β и паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток на динамику регенерации кожи при химическом ожоге / А. В. Кочкина, А. А. Темнов, В. И. Новоселов // 21-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2017. – С. 197–198.

15. Кочкина А. В. Комбинация фермента-антиоксиданта пероксиредоксина β и паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток ускоряет заживления кожной раны / А. В. Кочкина, К. А. Рогов, М. Г. Шарапов, Е. Н. Музафаров, В. И. Новоселов, А. В. Мелерзанов, А. А. Темнов // Материалы V Съезда Российского общества патологоанатомов с международным участием. – Челябинск, 2017. – С.164–165.

16. Кочкина А. В. Влияние пероксиредоксина β и паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток на процесс регенерации кожного покрова при раневых дефектах различной этиологии / А. В. Кочкина, Е. Н. Музафаров, В. И. Новоселов, А. А. Темнов // Материалы XXIII съезда Физиологического общества имени И. П. Павлова. – Воронеж, 2017. – С. 2529–2530.

17. Кочкина А. В. Влияние пероксиредоксина β и паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток на процесс регенерации кожи при механических и химических травмах / А. В. Кочкина, А. А. Темнов // Гены и клетки. Материалы III Национального Конгресса по регенеративной медицине. – М., 2017. – С. 134.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бетехтин, М. Псориаз: Т-хелперы, цитокины и молекулярные шрамы [Электронный ресурс] / М. Бетехтин // Биомолекула. – 2016. – Режим доступа: <https://biomolecula.ru/articles/psoriaz-t-khelfery-tsitokiny-i-molekuliarnye-shramy>
2. Бордаков, В. Н. Рана. Раневой процесс. Принципы лечения ран: учебно-методическое пособие / В. Н. Бордаков. – Минск: БГМУ, 2014. – 31 с.
3. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах /Ю.А. Владимиров // Соросовский Образовательный Журнал. – 2000. – Т.6. – №12. – С. 13-19.
4. Волкова, А.Г. Эффект различных ферментов-антиоксидантов на регенеративные процессы в эпителии трахеи после химического ожога / А.Г. Волкова, М.Г. Шарапов, В.К. Равин, А.Е. Гордеева, Е.А. Карадулева, Э.К. Мубаракшина, А.А. Темнов, Е.Е. Фесенко, В.И. Новоселов // Пульмонология. – 2014. – №12 (2). – С. 84-90.
5. Гордеева, А.Е. Влияние пероксиредоксина VI на сохранение тонкой кишки при ишемии/реперфузии / А.Е.Гордеева, М.Г. Шарапов, В.И. Новоселов, Е.Е. Фесенко, А.А. Темнов, М.Ш. Хубутия // Трансплантология. – 2014. – Т.8. – №4. – С. 21-27.
6. Дубинина, Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса / Е.Е. Дубинина // Вопросы медицинской химии. – 2001. – № 47(6). – С. 561-581.
7. Казимирко, В.К. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия / В.К. Казимирко, В.И. Мальцев, В.Ю. Бутылин, Н.И. Горобец // Морион. – 2004. – 160 с.
8. Ланкин, В.З. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях / В.З. Ланкин. А.К. Тихазе, Ю.Н. Беленков. Пособие для врачей. – М.: РКНПК МЗ РФ, 2001. – 78 с.

9. Менщикова, Е.Б. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания / Е. Б. Менщикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, И.А. Бондарь, В.А. Труфакин. – Новосибирск: АРТА, 2008. 284 с.
10. Новоселов, В.И. Влияние пероксиредоксина VI на заживление резаной раны / В.И. Новоселов, Л.М. Барышникова, С.Е. Амелина, Е.Е. Фесенко // Докл.Акад.Наук. – 2003. – Т. 393. – С. 412-414.
11. Новоселов, В.И. Модифицированные пероксиредоксины как прототипы лекарственных препаратов мощного антиоксидантного действия / В.И. Новоселов, В.К. Равин, М.Г. Шарапов и др. // Биофизика. – 2011. – Т. 56 (5). – С. 836–842.
12. Чучалин, А. Г. Респираторная медицина. Руководство (в 2-х томах) / А. Г. Чучалин. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 757 с.
13. Шарапов, М.Г. Клонирование, экспрессия и сравнительный анализ пероксиредоксинов 6 различного происхождения / М.Г. Шарапов, В.И. Новоселов, В.К. Равин // Молекулярная биология. – 2009. – Т. 43 (3). – С. 505-511.
14. Шарапов, М.Г. Пероксиредоксин 6 – природный радиопротектор. М.Г. Шарапов, С.В. Гудков, О.Э. Карп, В.Е. Иванов, А.Е. Гордеева, В.И. Брусков, В.И. Новоселов, Е.Е. Фесенко // Доклады Академии наук. – 2016. – Т. 467(3). – С. 355 – 357.
15. Ahmed, O.M. Quercetin and low level laser therapy promote wound healing process in diabetic rats via structural reorganization and modulatory effects on inflammation and oxidative stress / O.M. Ahmed, T. Mohamed, H. Moustafa, H. Hamdy, R.R. Ahmed, Aboud E. // Biomed Pharmacother. – 2018. – Vol. 101. – P. 58-73.
16. Alberts, B. Molecular Biology of the Cell. / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, et al. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
17. Al-Jawad, F.H. Role of antioxidants in the treatment of burn lesions / Al- F.H.Jawad, A.S.Sahib, A.A. Al-Kaisy // Ann Burns Fire Disasters. – 2008. – Vol. 21. – P. 186–191.

18. Andreadis, S. T. Biomimetic approaches to protein and gene delivery for tissue regeneration / S. T. Andreadis // *Trends Biotechnol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 331–337.
19. Arenbergerova, M. Topical hemoglobin promotes wound healing of patients with venous leg ulcers / M. Arenbergerova, P. Engels, S. Gkalpakiotis et al. // *Hautarzt.* – 2013. – Vol. 64. – P. 180–86.
20. Arner, S. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase / E. S. Arner, A. Holmgren // *Eur. J. Biochem.* – 2000. - Vol. 20. – P. 6102-6109.
21. Atiyeh, B.S. Management of acute and chronic open wounds: The importance of moist environment in optimal wound healing / B.S.Atiyeh, J. Ioannovich, C.A. Al-Amm, K.A. El-Musa // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 3. – P. 179–195.
22. Bedard, K. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology / K. Bedard, K.-H. Krause // *Physiol. Rev.* – 2007. – Vol. 87. – P. 245–313.
23. Benfeitas, R. Is the Peroxiredoxin 2/Thioredoxin/Thioredoxin reductase system in human erythrocytes designed for redox signaling? / R. Benfeitas, G. Selvaggio, F. Antunes, P. Coelho, A. Salvados // *Free Radic Biol Med.* – 2014. – Suppl.1:S24
24. Bertoletto, P.R. Oxidative stress gene expression profile in inbred mouse after ischemia/reperfusion small bowel injury / P.R. Bertoletto, A.T. Ikejiri, F.S. Neto, J.C. Chaves, R. Teruya, E. R. Bertoletto, M.O. Taha, A. J. Fagundes // *Acta Cir Bras.* – 2012. – Vol. 27. – P. 773–82.
25. Blair, S. D. Clinical trial of calcium alginate haemostatic swabs / S. D. Blair // *Br. J. Surg.* – 1990. – Vol. 77. P. 568–570.
26. Bretón-Romero, R. Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells / R. Bretón-Romero, S. Lamas // *Redox Biol.* – 2014. – Vol. 2. – P. 529–534.

27. Brölmann, F.E. Evidence-based decisions for local and systemic wound care / F.E. Brölmann, D.T. Ubbink, E.A. Nelson et al. // *Br J Surg.* – 2012. – Vol. 99(9). – P. 1172–83.
28. Buonora, J.E. Autoimmune profiling reveals peroxiredoxin 6 as a candidate traumatic brain injury biomarker / J.E. Buonora, M. Mousseau, D.M. Jacobowitz, R.C. Lazarus, A.M. Yarnel, C.H. Olsen, H.B. Pollard, R. Diaz-Arrastia, L. Latour, G.P. Mueller // *J Neurotrauma* – 2015. – Vol. 32. – P. 1805-14.
29. Canty, E.G. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis / E.G. Canty, K.E. Kadler // *Journal of Cell Science.* – 2005. – Vol. – 118. – P. 1341–1353.
30. Carter, M.J. Analysis of run-in and treatment data in a wound outcomes registry: clinical impact of topical platelet-rich plasma gel on healing trajectory. M.J. Carter, C.P. Fylling, W.W. Li, J. de Leon, V.R. Driver, T.E. Serena, J. Wilson // *Int Wound J.* – 2011. – Vol. 8. – P. 638-50.
31. Cartotto, R.C. Chemical burns / R.C. Cartotto, W.J. Peters, P.C. Neligan, L.G. Douglas, J. Beeston // *Can J Surg.* – 1996. – Vol. 39. – P.205–211.
32. Chae, H.Z. Protein glutathionylation in the regulation of peroxiredoxins: a family of thiol specific peroxidases that function as antioxidants, molecular chaperones, and signal modulators / H.Z. Chae, H. Oubrahim, J.W. Park, S.G. Rhee, P.B. Chock // *Antioxid. Redox Signal.* – 2012. – Vol. 6. – P. 506–523.
33. Chelikani, P. Diversity of structures and properties among catalases / P. Chelikani, I. Fita, P.C. Loewen // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2004. – Vol.61. – P. 192–208.
34. Chelombitko, M.A. Mitochondria-Targeted Antioxidant SkQ1 (10(6'-Plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium Bromide) Inhibits Mast Cell Degranulation in vivo and in vitro / M.A. Chelombitko, O.A. Averina, T.V. Vasilyeva, O.Y. Pletiuskina, E.N. Popova, A.V. Fedorov, B.V. Chernyak, V.S. Shishkina, O.P. Ilinskaya // *Biochemistry (Mosc).* – 2017. – Vol. 82(12). – P. 1493-1503.

35. Chen, H. Pre-activation of mesenchymal stem cells with TNF- α , IL-1 β and nitric oxide enhances its paracrine effects on radiation-induced intestinal injury / H. Chen, X. H. Min, Q. Y. Wang, F. W. Leung, L. Shi, Y. Yu, C. M. Wang, G. An, W. H. Sha, Q. K. Chen // *Sci. Rep.* – 2015. – Vol. 5. – P. 8718.
36. Chen, J.W. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities / J.W. Chen, C. Dodia, S.I. Feinstein, M.K. Jain, A.B. Fisher // *J Biol Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 28421–27.
37. Chen, L. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing / L. Chen, E. E. Tredget, P. Y. G. Wu, Y. Wu // *PLoS One.* – 2008. – Vol. 4. – P. 1886.
38. Chen, S.H. Survival of transferred ileum after ischemia time longer than 1 hour: a clinical result different from animal studies / S.H. Chen, Y.B. Tang, H.C. Chen // *J.Am.Coll.Surg.* - 2013. – Vol. 217. – P. 300–305.
39. Cho, S.-H. Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H₂O₂ mediated cell signaling / S.H. Cho, C.H. Lee, Y. Ahn, H. Kim, C.Y. Ahn, K.S. Yang, S.R. Lee // *FEBS Lett.* – 2004. – Vol. 560. – P. 7–13.
40. Choi, S.M. Effects of structurally stabilized EGF and bFGF on wound healing in type I and type II diabetic mice / S.M. Choi, K.M. Lee, H.J. Kim et al. // *Acta Biomater.* – 2018. – Vol. 66. – 325-334.
41. Cole-King, A. Psychological factors and delayed healing in chronic wounds / A.Cole-King, K.G. Harding // *Psychosom. Med.* – 2001. – Vol. 63. P. 216–220.
42. Darr, D. Free-radicals in cutaneous biology / D. Darr, I. Fridovich // *J Invest Dermatol.* – 1994. – Vol. 102. – P. 671–675
43. Das, S. Biomaterials and nanotherapeutics for enhancing skin wound healing / S. Das, A. B. Baker // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* – 2016. – Vol. 31. – Art. 82.
44. Deng, K. Mesenchymal stem cells and their secretome partially restore nerve and urethral function in a dual muscle and nerve injury stress urinary

incontinence model / K. Deng, D. L. Lin, B. Hanzlicek, B. Balog, M. S. Penn, M. J. Kiedrowski, Z. Hu, Z. Ye, H. Zhu, M. S. Damaser // *Am. J. Physiol. renal. Physiol.* – 2015. – Vol. 308. – P. F92–F100.

45. Diegelmann, R.F. Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing / R.F. Diegelmann, M.C. Evans // *Frontiers in Bioscience.* – 2014. – Vol. 9. – P. 283–289.

46. Ding, Y. Overexpression of peroxiredoxin 4 protects against high-dose streptozotocin-induced diabetes by suppressing oxidative stress and cytokines in transgenic mice / Y. Ding, S. Yamada, K.Y. Wang, S. Shimajiri, X. Guo, A. Tanimoto, Y. Murata, S. Kitajima, T. Watanabe, H. Izumi, K. Kohno, Y. Sasaguri // *Antioxid Redox Signal.* – 2010. – Vol. 13. – P. 1477–90.

47. Dissemond, J. Evidenz-basierte Medizin versus Best Practice: Wie entwickelt sich die Behandlung des chronischen Ulcus cruris Deutschland? / J. Dissemond // *Wundmanagement.* – 2012. – Vol. 6(Suppl. 2). – P. 6–11.

48. Driver, V.R. Autogel Diabetic Foot Ulcer Study Group. A prospective, randomized, controlled trial of autologous platelet-rich plasma gel for the treatment of diabetic foot ulcers // V.R. Driver, J. Hanft, C.P. Fylling, J.M. Beriou; // *Ostomy Wound Manage.* – 2006. – Vol. 52. – P. 68–74.

49. Du, H.C. Growth Factor-Reinforced ECM Fabricated from Chemically Hypoxic MSC Sheet with Improved In Vivo Wound Repair Activity / H.C. Du, L. Jiang, W. X.Geng, J. Li, R. Zhang, J. G. Dang, M. G. Shu, L.W. Li // *Biomed Res Int.* – 2017. – Vol. 2017. – P. 2578017.

50. Dubuisson, M. Human peroxiredoxin 5 is a peroxinitrite reductase / M. Dubuisson, D. Vander Stricht, A. Clippe, F. Etienne, T. Nauser, R. Kissner, W.H. Koppenol, J.F. Rees, B. Knoop / *FEBS Lett.* – 2004. – Vol. 30. – P. 161-5.

51. El Maghraby G.M. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes / G.M. El Maghraby, B.W. Barry, A.C. Williams // *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 2008. – Vol. 34. – P. 203-222.

52. Fisher, A.B. Peroxiredoxin 6 phospholipid hydroperoxidase activity in the repair of peroxidized cell membranes / A.B. Fisher // *Redox Biol.* – 2018. – Vol. 14. – P. 41–46.
53. Fisher, A.B. Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities / A.B. Fisher // *Antioxid Redox Signal.* – 2011. – Vol. 15. – P. 831 – 44.
54. Fisher, A.B. The serpentine path to a novel mechanism-based inhibitor of acute inflammatory lung injury / A.B. Fisher // *J Appl Physiol.* – 2014. – Vol. 116. – P. 1521–30.
55. Galiano, R.D. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing / R.D. Galiano, V. Michaels, M. Dobryansky, J.P. Levine, G.C. Gurtner // *Wound Rep Regen.* – 2004. – Vol. 12. – P. 485–492.
56. Gartner, L.P., Hiatt J.L.: *Color textbook of histology*, Ed 3. – Philadelphia: Saunders, 2007. – 592 p.
57. Gill, S.E. Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing / S.E. Gill, W.C. Parks // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 40. – P. 1334–1347.
58. Goldman, R. Growth factors and chronic wound healing: Past, present, and future / R. Goldman // *Adv. Skin Wound Care.* – 2004. – Vol. 17. – P. 24–35.
59. Gordeeva, A.E. Protective effect of peroxiredoxin 6 in ischemia/reperfusion - induced damage of small intestine / A.E. Gordeeva, A.A. Temnov, A.A. Charnagalov, M.G. Sharapov, E.E. Fesenko, V.I. Novoselov // *Dig Dis Sci.* – 2015. – Vol. 60. P. 3610 – 9.
60. Gottrup, F. Reducing wound pain in venous leg ulcers with Biatain Ibu: a randomized, controlled double-blind clinical investigation on the performance and safety / F. Gottrup, B. Jorgensen, T. Karlsmark et al. // *Wound Repair Regen.* – 2008. – Vol. 16. – P. 615–25.
61. Gurtner, G.C. Wound repair and regeneration / G.C. Gurtner, S. Werner, Y. Barrandon, M.T. Longaker // *Nature.* – 2008. – Vol. 453. – P. 314–321.

62. Halliwell, B. Antioxidants in human health and disease / B.Halliwell // *Annu. Rev. Nutr.* – 1996. – Vol. 16. P. 33–50.
63. Han, Y. Reactive oxygen species promote tubular injury in diabetic nephropathy: The role of the mitochondrial ros-txnip-nlrp3 biological axis / Y. Han, X. Xu, C. Tang, P. Gao, X. Chen. et al. // *Redox Biol.* – 2018. – Vol. 16. – P. 32-46.
64. Hardwicke, J. (2012) Chemical burns - Anhistorical comparison and review of the literature. / J. Hardwicke, T. Hunter, R. Staruch, N. Moiemmen // *Burns.* – Vol. 38. – P. 383-387.
65. Hardwicke, J. Epidermal growth factor therapy and wound healing--past, present and future perspectives / J. Hardwicke, D. Schmaljohann, D. Boyce, D. Thomas // *Surgeon.* – 2008. – Vol. 6. – P. 172-7.
66. Harvey, C. Wound healing / C. Harvey // *Orthop. Nurs.* – 2005. – Vol. 24. – P. 143–157.
67. Heidari, F. Bulge Hair Follicle Stem Cells Accelerate Cutaneous Wound Healing in Rats / F. Heidari, A. Yari, H. Rasoolijazi, M. Soleimani, A. Dehpoor, N. Sajedi, S. Joulai Veijouye, M.Nobakht // *Wounds.* – 2016. – Vol. 28(4). – P. 132-41.
68. Henry, G. Inflammatory Mediators in Wound Healing. G. Henry, W.L. Garner // *The Surgical Clinics of North America.* – 2003. – Vol. 83(3). – P. 483– 507.
69. Heyer, K. Effectiveness of advanced versus conventional wound dressings on healing of chronic wounds: systematic review and meta-analysis / K. Heyer, M. Augustin, K. Protz et al. // *Dermatology.* – 2013. – Vol. 226. – P. 172– 84.
70. Hofmann, B. Peroxiredoxins / B. Hofmann H.H. Hecht, L. Flohe // *Biol. Chem.* – 2002. - Vol.383. – P. 347–364.
71. Horch, R. E. Tissue engineering of cultured skin substitutes / R. E. Horch // *J. Cell. Mol. Med.* – 2005. – Vol. 9. – P. 592–608.

72. Huang, S. Expression of Peroxiredoxin 1 after traumatic spinal cord injury in rats / S. Huang, X. Liu, J. Zhang, G. Bao, G. Xu, Y. Sun, Q. Shen, M. Lian, Y. Huang, Z. Cui // *Cell Mol Neurobiol.* – 2015. – Vol. 35. – P. 1217–26.
73. Huang, W. Paracrine factors secreted by MSCs promote astrocyte survival associated with GFAP downregulation after ischemic stroke via p38 MAPK and JNK / W. Huang, B. Lv, H. Zeng, D. Shi, Y. Liu, F. Li, F. F. Chen, X. Liu, R. Zhu, X. Jiang // *J. Cell Physiol.* - 2015.
74. Immenschuh, S. Differential cellular and subcellular localization of heme_binding protein 23/peroxiredoxin I and heme oxygenase_1 in rat liver / S. Immenschuh, E. Baumgart_Vogt, M. Tan, S. Iwahara, G. Ramadori, H.D. Fahimi // *J. Histochem. Cytochem.* - 2003. – Vol. 51. – P.1621–31.
75. Inngjerdingen, K. An ethnopharmacological survey of plants used for wound healing in Dogonland / K. Inngjerdingen // *J. Ethnopharmacol.* – 2004. – Vol. 92. – P. 233–244.
76. Ishihara, M. Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process / M. Ishihara // *Biomaterials.* – 2002. – Vol. 23. – P. 833–840.
77. Ishii T. Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity / T. Ishii, E. Warabi, T. Yanagawa // *J. Clin. Biochem. Nutr.* – 2012. – Vol. – 50. – P. 91–105.
78. Iuchi, Y. Peroxiredoxin 4 knockout results in elevated spermatogenic cell death via oxidative stress / Y. Iuchi, F. Okada, S. Tsunoda, N. Kibe, N. Shirasawa, M. Ikawa, M. Okabe, Y. Ikeda, J Fujii // *Biochem J.* – 2009. – Vol. 419. – P. 149–158.
79. Iuchi, Y. Spontaneous skin damage and delayed wound healing in SOD1-deficient mice / Y. Iuchi, D. Roy, F. Okada,; N.Kibe,; S.Tsunoda et al. // *Mol. Cell. Biochem.* – 2010. –Vol. 341. – P. 181–194.
80. Jeon, Y.J. Phosphorylation of Prx III promotes JNK – dependent apoptosis in adult cloned pig kidney / Y. J. Jeon, J. Kim, D.S. Lee, J.H. Shim, K.S. Seo, J.I. Chae // *Int Biochem Cell Biol* // 2014. – Vol. 53. – P. 352 – 60.

81. Jiang, F. NADPH oxidase-mediated redox signaling: Roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair / F. Jiang, Y. Zhang, G.J. Dusting // *Pharmacol. Rev.* – 2011. – Vol. 63. – P. 218–242.
82. Karaduleva, E.V. Cardioprotective effect of modified peroxiredoxins in retrograde perfusion of isolated rat heart under conditions of oxidative stress / E.V. Karaduleva, E.K. Mubarakshina, M.G. Sharapov, A.E. Volkova, O.Y. Pimenov, V.K. Ravin, Y.M. Kokoz, V.I. Novoselov // *Bull Exp Biol Med.* – 2016. – Vol. 160. – P. 639 – 42.
83. Karplus, P.A. Peroxiredoxin systems. Structural survey of the peroxiredoxins / P.A. Karplus, A. Hall // *Subcellular Biochemistry.* – 2007. - Vol.44. – P. 46-60.
84. Karplus, P.A. Peroxiredoxins as molecular triage agents, sacrificing themselves to enhance cell survival during a peroxide attack / P.A. Karplus, L.B. Poole // *Mol. Cell.* – 2012. – Vol. 45. – P. 275–278.
85. Khubutiya, T.S., Vagabov A.V., Temnov A.A. Paracrine mechanisms of proliferative, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of mesenchymal stromal cells in models of acute organ injury / T.S. Khubutiya, A.V. Vagabov, A.A. Temnov // *Cytotherapy.* – 2014. – Vol. 5, №16. – P. 579–585.
86. Kim, J.M. Epidermal Growth Factor Attenuated the Expression of Inflammatory Cytokines in Human Epidermal Keratinocyte Exposed to *Propionibacterium acnes* / J.M. Kim, J.E. Choo, H.J. Lee, K.N. Kim, S.E. Chang // *Ann Dermatol.* – 2018. – Vol. 30(1). – P. 54-63.
87. Kinnula, V.L. Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung / V.L. Kinnula, P. Paakko, Y Soini // *FEBS Lett.* –2004. – Vol. 569. – P. 1–6.
88. Kita, M. Induction of cytokines in human peripheral blood mononuclear cells by mycoplasmas / M. Kita, Y. Ohmoto, Y. Hirai et al. // *Microbiol. Immunol.* – 1992. – Vol.36. – P.507-516.

89. Klein, S., Evidenzbasierte topische Therapie chronischer Wunden nach dem T.I.M.E. / S. Klein, S. Schreml, J. Dolderer et al. // *Prinzip. J. Dtsch. Dermatol. Ges.* – 2013. – Vol. 11. – P. 819–30.
90. Knoops, B. Multiple roles of peroxiredoxins in inflammation / B. Knoops, V. Argyropoulov, S. Becker, L. Ferte, O. Kuznetsova // *Mol Cell.* – 2016. – Vol. 39. – P. 60-4.
91. Ko, M.S. Role of dermal-epidermal basement membrane zone in skin, cancer, and developmental disorders / M.S. Ko, M.P. Marinkovich // *Dermatol Clin.* – 2010. – Vol. 28. – P. 1-16.
92. Körber, A. Reduktion des pH-Wertes im Ulcus cruris durch Cadesorb / A. Körber, J. Freise, S. Grabbe, J. Dissemond // *Zeitschrift für Wundheilung.* – 2006. – Vol. 11. – P. 230–4.
93. Kümin, A. Peroxiredoxin 6 is required for blood vessel integrity in wounded skin / A. Kümin, M. Schäfer, N. Epp, P. Bugnon, C. Born-Berclaz, A. Oxenius, A. Klippel, W. Bloch, S. Werner // *J Cell Biol.* – 2007. – Vol. 179. – P. 747-60.
94. Kümin, A.; Huber, C.; Rüllicke, T.; Wolf, E.; Werner, S. Peroxiredoxin 6 is a potent cytoprotective enzyme in the epidermis. *Am. J. Pathol.* 2006, 169, 1194–1205.
95. Kwon, T. Peroxiredoxin II is essential for maintaining stemness by redox regulation in liver cancer cells / T. Kwon, Y. Bak, Y.H. Park, G.B. Jang, J.S. Nam, J.E. Yoo, Y.N. Park, I.S. Bak, J.M. Kim, D.Y. Yoon, D.Y. Yu // *Stem Cells.* - 2016. – Vol. 34. – P. 1188-97.
96. Lay-Flurrie, K. The properties of hydrogel dressings and their impact on wound healing. / K. Lay-Flurrie // *Prof. Nurse.* – 2004. – Vol. 19. – P. 269–273.
97. Lee, D.H. Peroxiredoxin 6 overexpression attenuates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury / D.H. Lee, J.H. Park, S.B. Han, D.Y. Yoon, Y.Y. Jung, J.T. Hong // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8(31). – P. 51096-107.

98. Lee, E.Y. Expression of cyclooxygenase-2, peroxiredoxin I, peroxiredoxin 6 and nuclear factor- κ B in oral squamous cell carcinoma / E.Y. Lee, J.Y. Kang, K.W. Kim // *Oncol Lett.* – 2015. – Vol. 10. – P. 3129-36.
99. Lee, J.W. Evaluation of a polyurethane foam dressing impregnated with 3% povidone-iodine (Betafoam) in a rat wound model / J.W. Lee, K.Y. Song // *Ann Surg Treat Res.* – 2018. – Vol. 94(1). – P. 1-7.
100. Li, D.J. Cholinergic anti-inflammatory pathway inhibits neointimal hyperplasia by suppressing inflammation and oxidative stress / D.J. Li, H. Fu, J. Tong, Y.H. Li, L.F. Qu, P. Wang, F.M. Shen // *Redox Biol.* – 2018. – Vol. 15. – P. 22-33.
101. Li, M. Keratinocyte-releasable factors increased the expression of MMP1 and MMP3 in co-cultured fibroblasts under both 2D and 3D culture conditions / M. Li, A. Moeen Rezakhanlou, C. Chavez-Munoz, A. Lai, A. Ghahary. // *Molecular and Cellular Biochemistry.* – 2009. – Vol. 332. – P. 1–8.
102. Li, M. Mesenchymal stem cell-conditioned medium improves the proliferation and migration of keratinocytes in a diabetes-like microenvironment / M. Li, Y. Zhao, H. Hao, Q. Han, C. Tong, J. Liu, W. Han, X. Fu // *Int. J. Low Extrem. Wounds.* - 2015.
103. Li, Y. Epidermal Stem Cells in Skin Wound Healing / Y. Li, J. Zhang, J. Yue, X. Gou, X. Wu // *Adv Wound Care (New Rochelle).* – 2017. – Vol. 6(9). – P. 297-307.
104. Liu, M.H. Upregulation of peroxiredoxin III in doxorubicin-induced cytotoxicity and the FoxO3a-dependent expression in H9c2 cardiac cells / M.H. Liu, Y. Zhang, J. He, T.P. Tan, S.J. Wu, H.Y. Fu, Y.D. Chen, J. Liu, Q.F. Le, H.J. Hu, C. Yuan, X.L. Lin // *Exp Ther Med.* - 2015. – Vol. 10. – P. 1515-20.
105. Liu, N.N. Full-length cDNA cloning, molecular characterization and differential expression analysis of peroxiredoxin 6 from *Ovis aries* / N.N. Liu, Z.S. Liu, S.Y. Lu, P. Hu, Y.S. Li, X.L. Feng, S.Y. Zhang et. al. // *Vet. Immunol. Immunopathol.* - 2015. – Vol. 161. – P. 208-219.

106. Luo, Y. Crosslinked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery / Y. Luo // *J. Control. Release.* – 2000. – Vol. 69. – P. 169–184.
107. Ma, Y. Knockdown of peroxiredoxin 5 inhibits the growth of osteoarthritic chondrocytes via upregulating Wnt/ β -catenin signaling // Y. Ma, R. Li, Y. Zhang, L. Zhou, Y. Dai // *Free Radic Biol Med.* – 2014. – Vol. 76. – P. 251–60.
108. Maddaluno, L. Fibroblast growth factors: key players in regeneration and tissue repair / L. Maddaluno, C. Urwyler, S. Werner // *Development.* – 2017. – Vol. 144(22). – P. 4047–60.
109. Mahdavian, D. B. Macrophages in skin injury and repair / D.B. Mahdavian, W.M. van der Veer, M. van Egmond, F.B. Niessen, R.H. Beelen // *Immunobiology.* – 2011. – Vol. 216(7). – P. 753–62.
110. Manevich, Y. Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST / Y. Manevich, S.I. Feinstein, A.B. Fisher // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2004. – Vol. 101. – P. 3780–85.
111. Manevich, Y. Binding of peroxiredoxin 6 to substrate determines differential phospholipid hydroperoxide peroxidase and phospholipase A(2) activities / Y. Manevich, T. Shuvaeva, C. Dodia, A. Kazi, S.I. Feinstein, A.B. Fisher // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2009. - Vol. 485. – P. 139–149.
112. Manevich, Y. Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism / Y. Manevich, A.B. Fisher // *Free Radic Biol Med.* – 2005. – Vol. 38. – P. 1422–32
113. Manevich, Y. Structure and phospholipase function of peroxiredoxin 6: identification of the catalytic triad and its role in phospholipid substrate binding / Y. Manevich, K.S. Reddy, T. Shuvaeva, S.I. Feinstein, A. B. Fisher // *J. Lipid Res.* – 2007. – Vol. 48. – P. 2306–18.
114. Mansbridge, J. Skin tissue engineering / J. Mansbridge // *J Biomater Sci Polym Ed.* – 2008. – Vol. 19. – P. 955–68.

115. Manta, B. The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2 / B. Manta, M. Hugo, C. Ortiz, G. Ferrer-Sueta, M. Trujillo, A. Denicola // *Arch Biochem Biophys.* – 2009. – Vol. 484. – P. 146-54.
116. Marchese, C. UVB-induced activation and internalization of keratinocyte growth factor receptor / C. Marchese, V. Maresca, G. Cardinali, F. Belleudi, S. Ceccarelli, M. Bellocci, L. Frati, M.R. Torrisi, M. Picardo // *Oncogene.* – 2003. – Vol. 22. – P. 2422–2431.
117. Marinho, H.S. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors / H.S. Marinho, C. Real, L. Cyrne, H. Soares, F. Antunes // *Redox Biol.* – 2014. – Vol. 2. – P. 535–562.
118. Marshall, C.D. Cutaneous Scarring: Basic Science, Current Treatments, and Future Directions / C.D. Marshall, M.S. Hu, T. Leavitt, L.A. Barnes, H.P. Lorenz, M.T. Longaker // *Adv Wound Care (New Rochelle).* – 2018. – Vol. 7(2). – P. 29-45.
119. Martin, L. The release of model macromolecules may be controlled by the hydrophobicity of palmitoyl glycol chitosan hydrogels / L. Martin // *J. Control. Release.* – 2002. – Vol. 80. – P. 87–100.
120. Mathieu, D. Non-healing wounds / D. Mathieu, J.C. Linke, F. Wattel // *Handbook on hyperbaric medicine.* Netherlands: Springer. – 2006. – P. 401-427.
121. Meaume, S. A randomized, controlled, double-blind prospective trial with a Lipido-Colloid Technology Nano OligoSaccharide Factor wound dressing in the local management of venous leg ulcers / S. Meaume, F. Truchetet, F. Cambazard et al. // *Wound Repair Regen.* – 2012. – Vol. 20(4). – P. 500–11.
122. Mescher, A.L. Junqueira's Basic Histology. McGraw-Hill Medical. 14e. 2016. P. 371-384.
123. Mian, M. Collagen as a pharmacological approach in wound healing / M. Mian // *Int. J. Tissue React.* – 1992. – Vol. 14. – P. 1–9.

124. Niethammer, P. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish / P. Niethammer, C. Grabher, A.T. Look, T.J. Mitchison // *Nature*. – 2009. – Vol. 459. – P. 996–999.
125. Niezgoda, J.A. Randomized clinical trial comparing OASIS Wound Matrix to Regranex Gel for diabetic ulcers / J.A. Niezgoda, C.C. Van Gils, R.G. Frykberg, J.P. Hodde // *Adv Skin Wound Care*. – 2005. – Vol. 18. – P. 258-66.
126. Nino, M. Topical delivery of active principles: The field of dermatological research / M. Nino, G. Calabro, P. Santoianni // *Dermatology online Journal*. – 2010. – Vol. 16. – P. 4.
127. Noble, W.C. The skin microflora and microbial skin disease / Noble W.C. // *University of Cambridge / Cambridge*. – 1993.
128. Novoselov, S.V. Localization of the 28-kDa peroxiredoxin in rat epithelial tissues and its antioxidant properties / S.V. Novoselov, I. V. Peshenko, V.I. Popov, V.I. Novoselov, M.F. Bystrova, V.J. Evdokimov, S.S. Kanzalov, M.I. Merkulova, T.M. Shuvaeva, V.M. Lipkin, E.E. Fesenko // *J. Cell Tissue Res*. – 1999. – Vol. 298. – P. 471-480.
129. Novoselov, V.I. The role of antioxidant systems in the regeneration of the epithelium of the trachea after thermal burns of the upper respiratory tract // V.I. Novoselov, E.K. Mubarakshina, V.A. Yanin, S.E. Amelin, E.E. Fesenko // *Pulmonologiya*. – 2008. – Vol. 6. – P. 81-85.
130. Nozik-Grayck, E. Extracellular superoxide dismutase / E. Nozik-Grayck, H. B. Suliman, C.A. Piantadosi // *Int J Biochem Cell Biol*. – 2005. – Vol. 37. – P. 2466–2471.
131. Ogusucu, R. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxyxynitrite: rate constants by competitive kinetics / R. Ogusucu, D. Rettori, D.C. Munhoz, L.E. Netto, O. Augusto // *Free Radic Biol Med*. – 2007. – Vol. 23. – P. 206-13.
132. Palencia, L. Epidermal growth factor mediated healing in stem cell-derived vocal fold mucosa / L. Palencia, A. Das, S. P. Palecek, S. L. Thibeault, C. Leydon // *J. Surg. Res*. – 2015.

133. Palfreyman, S.J. Dressings for healing venous leg ulcers / S.J. Palfreyman, E.A. Nelson, R. Lochiel, J.A. Michaels // *Cochrane Database Syst Rev* 2006 3: CD001103.

134. Park, M.H. Roles of peroxiredoxins in cancer, neurodegenerative diseases and inflammatory diseases / M.H. Parks, M. Jo, Y.R. Kim, C.K. Lee, J. T. Hong // *Pharmacol Ther.* – 2016. – Vol. 163. – P. 1-23.

135. Park, Y.H. Peroxiredoxin II promotes hepatic tumorigenesis through cooperation with Ras/Forkhead box M1 signaling pathway / Y.H. Park, S.U. Kim, T.H. Kwon, J.M. Kim, I.S. Song, H.J. Shin, B.K. Lee, D.H. Bang, S.J. Lee, D.S. Lee, K.T. Chang, B.Y. Kim, D.Y. Yu // *Oncogene.* - 2015. - doi: 10.1038/onc.2015.411.

136. Patric, R.M. Advances in Wound Healing: A Review of Current Wound Healing Products / R.M. Patric, R.D. Gregory // *Plastic Surgery International.* – 2012.

137. Perkins, A. The sensitive balance between the fully folded and locally unfolded conformations of a model peroxiredoxin / A. Perkins, K.J. Nelson, J.R. Williams, D. Parsonage, L.B. Poole, P.A. Karplus // *Biochemistry.* – 2013. – Vol. 52. – P. 8708–21.

138. Peroja, P. Total peroxiredoxin expression is associated with survival in patients with follicular lymphoma / P. Peroja, K.M. Haapasaari, S. Mannisto, I. Miinalainen, P. Koivunen, S. Leppä, M.L. Karjalainen-Lindsberg, M.E. Kuusisto, T. Turpeenniemi-Hujanen, O. Kuittinen // *Virchow Arch.* – 2016. – Vol. 468. – P. 623-30.

139. Perry, B.H. A meta-analytic approach to an integrated summary of efficacy: a case study of becaplermin gel / B.H. Perry, A.R. Sampson, B.H. Schwab et al. // *Control Clin Trials.* – 2002. – Vol. 23. – P. 389–408.

140. Peshenko, I.V. Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxynitrite / I.V. Peshenko, Shichi H // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. - Vol. 31. – P. 292–303.

141. Pielesz, A. The role of dimethyl sulfoxide (DMSO) in ex-vivo examination of human skin burn injury treatment / A. Pielesz, A. Gawłowski, D. Biniś, R. Bobiński, M. Kawecki et al. // *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* – 2018. – Vol. 196. – P. 344–352.
142. Power, J.H. Peroxiredoxin 6 in human brain: molecular forms, cellular distribution and association with Alzheimer's disease pathology / J.H. Power, S. Asad, T.K. Chataway, F. Chegini, J. Manavis, J.A. Temlett, P.H. Jensen, P.C. Blumbergs, W.P. Gai. // *Acta Neuropathol.* – 2008. - Vol.115. – P. 611-622.
143. Pruitt, B. A. Characteristics of and uses of biological dressings and skin substitutes / B. A. Pruitt and N. S. Levine // *Arch. Surg.* – 1984. – Vol. 19.–P. 312.
144. Qian, Y. Implication of differential peroxiredoxin 4 expression with age in ovaries of mouse and human for ovarian aging / Y. Qian, L. Shao, C. Yuan, C.Y. Jiang, J. Liu, C. Gao, L. Gao, Y.G. Cui, S.W. Jiang, J.Y. Liu, Y. Meng // *Curr Mol Med.* – 2016. – Vol. 16. – P. 243 – 51.
145. Rasik, A.M. Antioxidant status in delayed healing type of wounds / A.M. Rasik, A. Shukla, // *Int. J. Exp. Pathol.* – 2000. – Vol. 81. – P. 257–263.
146. Ratnam, D.V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective / D.V. Ratnam, D.D. Ankola, V. Bhardwaj, D.K. Sahana, M. Kumar // *J. Control. Release* 2006. – Vol. 113. – P. 189–207.
147. Rawlins, E. L. Lung development and repair: contribution of the ciliated lineage / E. L. Rawlins, L. E. Ostrowski, S. H. Randel, B. L. Hogan // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol. 104. – P. 410–417.
148. Ren, G. Properties of the thioredoxin fold superfamily are modulated by a single amino acid residue / G. Ren, D. Stephan, Z. Xu, Y. Zheng, D. Tang, R.S. Harrison, M. Kurz, R. Jarrott, S.R. Shouldice, A. Hiniker J.L., Martin, B. Heras, J.C. Bardwell // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284. – P. 10150–59.
149. Requier, S. Peroxiredoxin post-translation modifications by redox messengers / S. Requier, J. Breton, K. Abbas, D. Cornu, C. Bouton, J.C. Drapier // *Redox Biol.* – 2014. – Vol. – 2. – P. 777–785.

150. Rhee, S.G. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling / S.G. Rhee // *Science*. – 2006. – Vol. 312. – P. 1882–83.
151. Rhee, S.G. Overview on Peroxiredoxin / S.G. Rhee // *Mol Cell*. – 2016. – Vol. 39 – P. 1–5.
152. Rhee, S.G. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases / S.G. Rhee, S.W. Kang, T.S. Chang, W. Jeong, K. Kim // *IUBMB Life*. – 2001. – Vol. 52. – P.35–41
153. Rhett, J.M. Novel therapies for scar reduction and regenerative healing of skin wounds / J.M. Rhett, G.S. Ghatnekar, J.A. Palatinus, M. O’Quinn, M.J. Yost, R.G. Gourdie // *Trends Biotechnol*. – 2008. – Vol. 26. – P. 173–180.
154. Robinson, A. M. Mesenchymal stem cells and conditioned medium avert enteric neuropathy and colon dysfunction in guinea pig TNBS-induced colitis / A. M. Robinson, S. Sakkal, A. Park, V. Jovanovska, N. Payne, S. E. Carbone, S. Miller, J. C. Bornstein, C. Bernard, R. Boyd, K. Nurgali // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. – 2014. – Vol. 307. – P. G1115–29.
155. Roy, S. Dermal wound healing is subject to redox control / S.Roy, S. Khanna, K. Nallu, T.K. Hunt, C.K. Sen // *Mol. Ther*. – 2006. – Vol. 13, P. 211–20.
156. Schäfer, M. Oxidative stress in normal and impaired wound repair / M. Schäfer, S. Werner // *Pharmacol. Res*. – 2008. – Vol. 58. – P. 165–171.
157. Schrader, M. Peroxisomes and oxidative stress / M. Schrader, H.D. Fahimi // *Biochim Biophys Acta*. – 2006. – Vol. 1763. – P. 1755–66.
158. Segal, A.W. How Neutrophils Kill Microbes / A.W. Segal // *Annual Review of Immunology*. – 2005. – Vol. 23. – P. 197–223.
159. Sen, C.K. Redox signals in wound healing. / C.K. Sen, S. Roy // *Biochim. Biophys Acta*. – 2008. – Vol. 1780. – P. 1348–61.
160. Shen, Q. Paracrine factors from mesenchymal stem cells attenuate epithelial injury and lung fibrosis / Q. Shen, B. Chen, Z. Xiao, L. Zhao, X. Xu, X. Wan, M. Jin // *Molecular medicine reports*. – 2014. – P. 2831–2837.
161. Sherwood, L. Human Physiology: From cells to systems / L. Sherwood 6th Edition / Thomson Brooks, Stamford. – 2007.

162. Shukla, A. Depletion of reduced glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant defence enzymes in a healing cutaneous wound / A. Shukla, A.M. Rasik, G.K. Patnaik // *Free Radic. Res.* – 1997. – Vol. 26. – P. 193–101.
163. Sibbald, R.G. Cost-effectiveness of becaplermin for nonhealing neuropathic diabetic foot ulcers / R.G. Sibbald, G. Torrance, M. Hux, C. Attard, N. Milkovich // *Ostomy Wound Manage.* – 2003. – Vol. 49. – P. 76-84.
164. Soneja, A. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing / A. Soneja, M. Drews, T. Malinski // *Pharmacol Rep.* – 2005. – Vol. 57. – Suppl:108-19.
165. Sterling, J.P. Management of the Burn Wound / J.P. Sterling, D.M. Heimbach, N.S. Gibran // *ACS Surgery.* – 2010.
166. Stewart, C.E. Chemical skin burns / Stewart C.E. // *Am Fam Physician.* – 1985. – Vol. 31. – P. 149–157.
167. Sun, B.K. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds / B.K. Sun, Z. Siprashvili, P.A. Khavari // *Science.* – 2014. – Vol. 346(6212). – P. 941-5.
168. Sun, H.N. Microglial peroxiredoxin V acts as an inducible anti-inflammatory antioxidant through cooperation with redox signaling cascades / H.N. Sun, S.U. Kim, S.M. Huang, J.M. Kim, Y.H. Park, S.H. Kim, S.R. Lee, K.T. Chang, S.H. Lee, D.Y. Yu, D.S. Lee // *J Neurochem.* – 2010. – Vol. 114. – P. 39-50.
169. Sykes, R.A. Chemical burns: retrospective review / R.A. Sykes, M.M. Mani, J.M. Hiebert // *J Burn Care Rehabil.* – 1986. – Vol. 7. – P. 343–347.
170. Tahmasbpour Marzony, E. Oxidative stress and altered expression of peroxiredoxin genes family (PRDXS) and sulfiredoxin-1 (SRXN1) in human lung tissue following exposure to sulfur mustard / E. Tahmasbpour Marzony, M. Ghanei, Y. Panahi // *Exp Lung Res.* – 2016. – Vol. 42. – P. 217–26.
171. Tavender, T.J. Peroxiredoxin IV is an endoplasmic reticulum-localized enzyme forming oligomeric complexes in human cells / T.J. Tavender, A.M. Sheppard, N.J. Bulleid // *Biochem J.* – 2008. – Vol. 411(1). – P. 191–9.

172. Temnov A. A. Use of perfluorocarbon emulsions for administration of photosensitizing preparations into bone marrow stem cells / A. A. Temnov, A. N. Sklifas, AV Tereshchenko, IuA Belyĭ, NB Lyskov, NI Kukushkin // *Biofizika*. – 2010. – Vol. 6. – P. 1063-69.

173. Thannickal, V.J. Reactive oxygen species in cell signaling / V.J. Thannickal, B.L. Fanburg // *Am J Physiol*. – 2000. – Vol. 279. – P. L1005–28.

174. Tsui, H.Y. Combined effects of artificial dermis and vascular endothelial growth factor concentration gradient on wound healing in diabetic porcine model / H.Y. Tsui, Y.C. Liu, X. Yan, Y. Lin, Y. Xu, Q. Tan // *Growth Factors*. – Vol. 15. – P. 1-9.

175. Tulsawani, R. Neuroprotective effect of peroxiredoxin 6 against hypoxia-induced retinal ganglion cell damage / R. Tulsawani, L.S. Kelly, N. Fatma, B. Chhunchha, E. Kubo, A. Kumar, D.P. Singh // *BMC Neurosci*. – 2010. – Vol. 11. – P. 125.

176. Usui, M.L. Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds / M.L. Usui J.N. Mansbridge, W.G. Carter, M. Fujita, J.E. Olerud // *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. – 2008. – Vol. 56. – P. 687–696.

177. Velnar T., Bailey T., Smrkolj T. The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *J. Int. Med. Res.* – 2009. – N 37. – P. 1528—42.

178. Vivekananda, J. Acute inflammatory injury in the lung precipitated by oxidant stress induces fibroblasts to synthesize and release transforming growth factor-alpha / J. Vivekananda,; A. Lin, J.J. Coalson,; R.J. King // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 25057–61.

179. Voinchet, V. Efficacy and safety of hyaluronic acid in the management of acute wounds / V. Voinchet // *Am. J. Dermatol.* – 2006. – Vol. 7. – P. 353–357.

180. Volkova, A.G. The effect of various antioxidant enzymes in the regenerative processes in the epithelium of the trachea after chemical burn / A.G.

Volkova, M.G. Sharapov, V.K. Ravin, A.E. Gordeeva, E.V. Karaduleva, E.K. Mubarakshina, A.A. Temnov, E.E. Fesenko, V.I. Novoselov // *Pulmonologiya*. – 2014. – Vol. 2. – P. 84-90.

181. Vowden, P. The effect of amelogenins (Xelma) on hard-to-heal venous leg ulcers / P. Vowden, M. Romanelli, R. Peter et al. // *Wound Repair Regen*. – 2006. – Vol. 14. – P. 240–6.

182. Walburn, J. Psychological stress and wound healing in humans: A systematic review and meta-analysis / J. Walburn, K. Vedhara, M. Hankins, L. Rixon, J. Weinman // *J. Psychosom. Res.* – 2009. – Vol. 67. – P. 253–271.

183. Walker, M. Scanning electron microscopic examination of bacterial immobilisation in a carboxymethylcellulose (AquacelR) and alginate dressings / M. Walker // *Biomaterials*. – 2003. – Vol. 24. – P. 883–890.

184. Wang, L. Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering / L. Wang // *Biomaterials*. – 2003. – Vol. 24. – P. 3475–81.

185. Weindorf, M. Nicht-interventionelle Untersuchung der Wirksamkeit und Verträglichkeit von TegadermTM Matrix bei Patienten mit therapierefraktären, chronischen Wunden / M. Weindorf, A. Körber, J. Klode, J. Dissemond // *J Dtsch Dermatol Ges.* – 2012. – Vol.10. – P. 412–20.

186. Werner, S. 2007. Keratinocyte – Fibroblast Interactions in Wound Healing // S. Werner, T. Krieg, H. Smola // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2007. – Vol. 127. – P. 1998–1008.

187. Werner, S. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines / S. Werner, R. Grose // *Physiol Rev*. – 2003. – Vol. 83. – P. 835–70.

188. Wild, T. *Manual der Wundheilung*. 1. / T. Wild, J. Auböck // Aufl. Springer Wien. – 2007.

189. Winterbourn, C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species / C.C. Winterbourn // *Nat. Chem. Biol.* – 2008. – Vol. 4. – P. 278–286.

190. Witte M. B. 2002 Role of Nitric Oxide in Wound Repair / M.B.Witte, A.Barbul // *American Journal of Surgery*. – 2002. – Vol. 183(4). – P. 406–412.
191. Wonsey, D.R. The c- Myc target gene PRDX3 is required for mitochondrial homeostasis and neoplastic transformation / D.R. Wonsey, K.I. Zeller, C.V. Dang // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. – Vol. 99. – P. 6649–6654.
192. Woo H.A. Reversible oxidation of the active site cysteine of peroxiredoxins to cysteine sulfinic acid. Immunoblot detection with antibodies specific for the hyperoxidized cysteine-containing sequence / H.A. Woo, S.W. Kim, H.K. Kim, K.S. Yang, H.Z. Chae, S.G. Rhee // *J Biol Chem*. – 2003. – Vol. 278. – P. 47361–4.
193. Woo, H.A. Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H₂O₂ accumulation for cell signaling / H.A.Woo, S.H.Yim, D.H.Shin, D.Kang, D.-Y.Yu, S.G. Rhee // *Cell*. – 2010. – Vol. 140. – P. 517–528.
194. Wood, Z.A. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins / Z.A. Wood, E. Schroder, J.R. Harris, L.B. Poole: // *Trends Biochem Sci*. – 2003. – Vol. 28. – P. 32–40.
195. Wozniak, G. Faktor XIII und Wundheilung / G. Wozniak, T. Noll // *Hamostaseologie*. – 2002. – Vol. 22. – P. 59–62.
196. Wu, Y. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis / Y. Wu, L. Chen, P.G. Scott, E.E. Tredget // *Stem Cells*. – 2007. – Vol. 25. – P. 2648–59.
197. Wu, Y.Z. Functional interaction of peroxiredoxin 6 with surfactant protein / Y.Z. Wu, Y. Manevich, J.L. Baldwin, A.B. Fisher // *A. FASEB J*. – 2005. – Vol. 19. – P. A282–3.
198. Xi, H. Hypoxia inducible factor 1-a suppress Peroxiredoxin expression to promote proliferation of CCRCC cell / H. Xi, Y.H. Gao, D.Y. Han, Q.Y. Li, L.J. Feng, W. Zhang, G. Li, J.C. Xiao, H.Z. Zhang, Q. Wei // *FEBS Lett*. – 2014. – Vol. 588. – P. 3390-4.

199. Xu, H.L. Dual Regulations of Thermosensitive Heparin-Poloxamer Hydrogel Using ϵ -Polylysine: Bioadhesivity and Controlled KGF Release for Enhancing Wound Healing of Endometrial Injury / H.L. Xu, J. Xu, B.X. Shen, S.S. Zhang, B.H. Jin, Q.Y. Zhu, D.L. ZhuGe, X.Q. Wu, J. Xiao, Y.Z. Zhao // *ACS Appl Mater Interfaces*. – 2017. – Vol. 9(35). – P. 29580-94.
200. Yager, D. R. The Proteolytic Environment of Chronic Wounds / D.R. Yager and B. C. Nwomeh // *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. – Vol. 7(6). – P. 433–441.
201. Yulyana, Y. Paracrine factors of human fetal MSCs inhibit liver cancer growth through reduced activation of IGF-1R/PI3K/Akt signalling / Y. Yulyana, I. A. Ho, K. C. Sia, J. P. Newman, X. Y. Toh, B. B. Endaya et al. // *Mol. Ther.* – 2015.
202. Yun, H.M. PRDX6 controls multiple sclerosis by suppressing inflammation and blood brain barrier disruption / H.M. Yum, K.R. Park, E.C. Kim, J.T. Hong // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6. – P. 20875-84
203. Zhang, S. Protein and miRNA profiling of radiation-induced skin injury in rats: the protective role of Peroxiredoxin-6 against ionizing radiation / S. Zhang, W. Wang, Q. Gu, J. Xue, H. Cao, Y. Tang, X. Xu, J. Cao, J. Zhou, J. Wu, Q. Ding // *Free Radic Biol Med*. – 2014. – Vol. 69. – P. 96-107.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую благодарность д.б.н., проф. Владимиру Ивановичу Новоселову за активное содействие в проведении исследований, всестороннюю поддержку, неоценимую профессиональную помощь. Научным руководителям: д.м.н. Андрею Александровичу Темнову за помощь в освоении проведения хирургического вмешательства, анестезирования животных и других медицинских подходов и д.б.н., профессору Евгению Назибовичу Музафарову за содействие в ходе выполнения диссертационной работы.

Выражаю благодарность д.м.н., профессору Рогову Константину Аркадьевичу за помощь в интерпритации результатов гистологического анализа; к.б.н. Алине Евгеньевне Гордеевой за помощь в освоении гистологических методов и консультации в ходе экспериментального исследования; к.б.н. Марсу Галиевичу Шарапову и Руслану Георгиевичу Гончарову за предоставление рекомбинантного экзогенного пероксиредоксина 6; всем сотрудникам лаборатории Механизмов рецепции ИБК РАН за создание благоприятного климата для работы и моральную поддержку.