
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ УМЕРЕННО ГИПОКСИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ МАТКИ КРЫС**

© 2025 г. Н. Б. Тихонова^{1,*}, А. А. Темнов², В. В. Алексанкина¹,
А. П. Алексанкин¹, Т. В. Фокина¹, А. Н. Склифас², Е. В. Кузнецова¹,
А. П. Милованов¹, Л. М. Михалева¹

¹Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского, Москва, Россия,

²Пуцинский научный центр биологических исследований РАН – обособленное подразделение
Института биофизики клетки РАН, Пушкино, Россия

*E-mail: morpholhum@list.ru

Поступила в редакцию 01.11.2024 г.

После доработки 11.05.2025 г.

Принята к публикации 15.05.2025 г.

Цель работы – установить влияние кондиционированной среды и лизата культивируемых аутологических стромальных клеток костного мозга (КМСК), выращенных при 10% O₂, на иммунологическую регуляцию заживления стенки маточного рога крысы линии Sprague – Dawley после сквозного хирургического разреза. В первой группе животных ($n = 14$) разрез маточной стенки перед ушиванием обрабатывали кондиционированной средой, во второй группе ($n = 14$) обработку разреза не проводили. Область заживления исследовали на 5-е и 15-е сутки после операции гистологическими (окраски гематоксилин и эозин и по Маллори), иммуногистохимическими (CD68, FABP4) методами и полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ПЦР-РВ для IL-1 β , IL-4, IL-6 и IL-10). Площадь зоны заживления в обработанной группе была ниже по сравнению с контрольной группой во все сроки мониторинга ($p < 0.05$). На 5-е сутки в обработанной группе экспрессия IL-4 и IL-10 была ниже, чем в контрольной, а на 15-е сутки IL-1 β оказался ниже в контрольной группе. С 5-х на 15-е сутки экспрессия IL-1 β , IL-4, IL-6 и IL-10 в контрольной группе снизилась ($p < 0.05$), в обработанной группе достоверных различий не обнаружено ($p < 0.05$). Количество CD68⁺ макрофагов снизилось на 15-е сутки в обработанной группе по сравнению с 5-ми сутками и оказалось ниже, чем в контрольной группе. Скопления FABP4⁺-клеток в зоне поврежденного миометрия на 15-е сутки в обеих группах практически исчезли за исключением 2 животных в контрольной группе. В зоне поврежденного периметрия скопления FABP4⁺-клеток увеличились на 15-е сутки, а в обработанной группе снизились и оказались достоверно ниже, чем в контрольной группе. Таким образом, применение КМСК привело к сокращению зоны между разобщенными в результате разреза слоями миометрия, снижению воспалительной реакции и ускорению восстановления маточной стенки.

Ключевые слова: матка крысы, заживление раны, кондиционированная среда, макрофаги, адипоциты, интерлейкины

DOI: 10.7868/S2658655X25070061, EDN: MVRBMQ

ВВЕДЕНИЕ

Изучение процессов регенерации маточной стенки модельных животных, в частности грызунов, после сквозного хирургического разреза вызывает интерес как с позиции фундаментальной науки, накапливающей сведения об особенностях восстановления различных тканей и органов, так и с позиции клинической медицины, стремящейся минимизировать осложнения после кесарева сечения и гистеротомии. Поиск новых препаратов, способствующих быстрому и полноценному восстановлению стенки матки, выявление возможных побочных эффектов и разработка наиболее эффективных схем применения лекарств представляют собой важные задачи экспериментальной морфологии и клеточной биологии. Терапевтическое воздействие на рану компонентов культивирования мезенхимальных полипотентных стромальных клеток (МСК) различного происхождения рассматривают как наиболее перспективный способ лечения хронических ран и предотвращения патологического заживления [1–3]. На особенности процесса заживления может оказать влияние как состав используемых продуктов культивирования, так и источник происхождения или условия культивирования МСК [4, 5]. Количественные и качественные показатели секрета культивируемых МСК достаточно сильно зависят от условий культивирования. Влияние гипоксических условий культивирования МСК костномозгового происхождения на состав их секрета изучалось в ранее опубликованных работах [6–8]. Секретом МСК, который включает цитокины и факторы роста, значительно изменяется при гипоксии. Гипоксические МСК продуцируют большее количество проангиогенных и противовоспалительных факторов по сравнению с их нормоксическими аналогами. Считается, что это изменение секрета усиливает терапевтический потенциал МСК в регенеративной медицине [9, 10]. Однако эффект компонентов умеренно гипоксических МСК на иммунологическую регуляцию заживления поврежденной маточной стенки неизвестен. Целью исследования стало определение влияния кондиционированной среды и лизата МСК, культивированных в умеренно гипоксических условиях (10% O₂ в атмосферном воздухе), на иммунологическую регуляцию заживления сквозного разреза стенки матки крыс.

Основное управление процессами заживления раны осуществляют макрофаги, которые участвуют во всех фазах заживления и регулируют как воспалительную реакцию, так и пролиферативную. В качестве метода оценки макрофагов в зоне заживления мы выбрали иммуногистохимическое исследование общего маркера макрофагов – белка CD68 [11]. Для оценки интенсивности воспалительной реакции в зоне заживления решено было изучить уровень экспрессии мРНК для провоспалительных цитокинов IL-1b и IL-6 [12, 13] и противовоспалительных IL-4 и IL-10 [14].

В отличие от кожных ран, доступность раны матки после ушивания ограничена. Поэтому единственным наименее травматичным методом применения препарата МСК после сквозного разреза маточной стенки является нанесение его на края раны до ушивания. В связи с этим возникает ограничение во времени влияния компонентов МСК на отдаленные стадии заживления, и основной эффект становится возможен, с одной стороны, только на первых этапах, но, с другой стороны, последствия могут значительно изменить скорость и качество регенерации.

Данное исследование являлось экспериментальным, и в качестве модельного животного была выбрана лабораторная крыса, что накладывает дополнительные ограничения на использование результатов работы. Кроме того, маточная стенка подвержена значительному влиянию эстрального цикла, управляемого половыми гормонами, которые также влияют на воспалительную и пролиферативную реакции в процессе заживления [15, 16]. Оценка влияния препарата на уровень экспрессии цитокинов при заживлении маточной стенки осложнялась изменением их экспрессии в зависимости от фазы эстрального цикла. Мы попытались минимизировать влияние эстрального цикла на исследуемые показатели и проводили сквозной разрез только на одном маточном

роге крысы, а второй (неоперированный) использовали в качестве внутреннего (сравнительного) контроля для ПЦР-РВ. Для дополнительной стандартизации результатов эксперимента и минимизации влияния фазы эстрального цикла сквозной разрез выполнялся всегда в фазу эструса.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Животных содержали в условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище. С учетом этических соображений и существующих данных литературы [9, 10], с целью снижения количества экспериментальных животных в работу не были включены контрольные группы, в которых рану обрабатывали препаратами из МСК, культивированными в условиях атмосферной нормоксии (21% O₂) или гипоксии (5% O₂).

Фазы эстрального цикла определяли исследованием вагинальных мазков [17], окрашенных “Диахим-Дифф-Квик” (“Абрис+”, Россия).

Операция. Хирургическую операцию проводили, как описано ранее [18, 19]. Оперировали под общим наркозом, вводили анестетик “Золетил” (Vibrac, Франция) – 10 мг/кг и седативный препарат “Ксиланит” (“Нита-Фарм”, Россия) – 0.1 мг/кг. Матку и брюшную стенку ушивали нитью “Ультрасорб USP 6/0” (ООО “Линтекс”, Россия), кожу – нитью “Моносорб USP 4/0” (ООО “Линтекс”, Россия). Половозрелым самкам крыс Sprague – Dawley ($n = 28$; возраст 4–5 месяцев, масса тела 260–320 г; длительность эстрального цикла 5–6 суток) в фазу эструса рассекали кожу и слои брюшной стенки, выводили правый рог матки из брюшной полости, наносили продольный сквозной разрез (1 см) стенки с антимезометриальной стороны маточного рога, левый рог оставляли интактным в качестве контроля. Контрольной группе (Группа 1, $n_1 = 14$) края раны не обрабатывали, особям экспериментальной группы (Группа 2, $n_2 = 14$) в разрез вносили препарат кондиционированной среды (20 мкл), разрез матки и брюшную стенку ушивали непрерывным обвивным швом нитью “Ультрасорб USP 6/0”, кожу – П-образным узловым швом нитью “Моносорб USP 4/0”. Шов обрабатывали 0.05%-ным раствором “Хлоргексидин Биглюконат” (“ЮжФарм”, Россия) и спреем “Террамицин Аэрозоль” (IGS Aerosol GmbH, Германия). Для взятия материала животных выводили из эксперимента передозировкой эфирного наркоза на пятые сутки после операции – 1-я контрольная точка для Группы 1 ($n_{1.1} = 7$) и Группы 2 ($n_{2.1} = 7$) и на 15-е сутки – 2-я контрольная точка для Группы 1 ($n_{1.2} = 7$) и Группы 2 ($n_{2.2} = 7$).

Препарат кондиционированной среды. Первичные мультипотентные стромальные клетки (КМСК) были извлечены из костного мозга бедренной кости крыс SD под общим наркозом. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (DMEM-FCS), до получения монослоя. Мультипотентность подтверждали методами, определяющими способность клеток к остеогенной, хондрогенной и адипогенной дифференциации. Клеточный монослой культивировали в условиях атмосферной гипоксии (10% O₂, 5% CO₂) в течение 3 суток, собирали культуральную среду и объединяли с растворимой фракцией клеточного лизата, который был получен после двух циклов замораживания-оттаивания для получения препарата кондиционированной среды [20].

Гистология и иммуногистохимия. Для морфологической оценки зоны заживления участок рога матки фиксировали в забуференном 10%-ном растворе формалина и готовили парафиновые срезы толщиной 4 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также по Маллори. За площадь зоны заживления принимали площадь участка, ограниченного разобщенными разрезом краями миометриальных слоев. Для иммуногистохимического исследования в качестве первичных антител использовали мышинные моноклональные антитела к CD68 (#ab31630, Abcam, Великобритания, разведение 1 : 200)

и кроличьи моноклональные антитела к FABP4 (#ab219595, Abcam, San Francisco, Калифорния, США, разведение 1 : 200). Перед нанесением первичных антител проводили тепловую демаскировку антигенов в цитратном буфере pH 6.0 в микроволновой печи при мощности 500 Вт в течение 5 мин. Перед заключением иммуногистохимические препараты докрашивали гематоксилином Майера. Гистопрепараты исследовали под микроскопом Nexcore NE930 (Китай) с видеокамерой TUCSEN Michrome 5 Pro и с программным приложением Mosaic2.4 (Tucsen Photonics, Китай). В зоне заживления использовали программу QuPath ver. 0.5.0 (Эдинбург, Великобритания).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) [21]. Для количественного определения экспрессии генов участки маточной стенки замораживали и хранили при -70°C . После размораживания и гомогенизации получали тотальную РНК коммерческим набором “Проба-НК” (“ДНК-Технология”, Россия). Обратную транскрипцию проводили набором “Реверта-L” (“ИнтерЛабсервис”, Россия). Уровень экспрессии генов определяли с помощью ПЦР в режиме реального времени в детектирующем амплификаторе ДТ-96 (“ДНК-Технология”, Россия) с использованием готовой смеси для ПЦР 5x qPCRmix-HSSYBR (“Евроген”, Россия) и со специфичными праймерами (“Евроген”, Россия) для IL-1b (for 5'-CTGTCTGACCCATGTGAGCT-3'; rev 5'-ACTCCACTTGGTCTTGACTT-3'), IL-4 (for 5'-ATGTAACGACAGCCCTCTGA-3'; rev 5'-AGCACGGAGGTACATCACG-3'), IL-6 (for 5'-TACATATGTTCTCAGGGAGAT-3'; rev 5'-GGTAGAAACGGAAGTCCAG-3'), IL-10 (for 5'-GCCCAGAAATCAAGGAGCAT-3'; rev 5'-TGAGTGTACGTAGGCTTCTA-3') и референс-ген rGAPDH (for 5'-GCGAGATCCCGCTAACATCA-3'; rev 5'-CCCTTCCACGATGCCAAAGT-3'). Результаты анализировали в программе Real Time PCR 7.10 (“ДНК-Технология”, Россия). Относительную экспрессию мРНК определяли с помощью метода $\Delta\Delta\text{Ct}$, нормализуя по референс-гену rGAPDH для ΔCt и по внутреннему контролю (интактный ро) для $\Delta\Delta\text{Ct}$. Кратность различий в экспрессии целевого гена в участке заживления относительно неоперированного рога матки выражали в $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$.

Методы статистики. Статистическую обработку полученных результатов проводили в программах STATISTICA (Ver.12, StatSoft Inc., Tulsa, Оклахома, США) и Prism (Ver.8.0, GraphPad Software Inc., San Diego, Калифорния, США). Распределение показателей выборки оценивали через медиану (Me) и квартили (Q1; Q3). Значимость различий при множественном сравнении определяли с помощью непараметрического критерия Краскела – Уоллиса, используя для попарного сравнения критерий Данна. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

К 5-м суткам после операции произошло полное смыкание маточной стенки. Площадь между разобщенными мышечными слоями у группы, получившей препарат кондиционированной среды, была достоверно меньше по сравнению с контрольной группой на 5-е ($p < 0.05$) и на 15-е сутки ($p < 0.05$). В контрольной группе площадь заживления увеличилась ($p < 0.05$). В контрольной и экспериментальной группах увеличение площади заживления с 5-х по 15-е сутки было недостоверным ($p > 0.05$), но в контрольной группе наблюдалась тенденция к увеличению (рис. 1а).

При иммуногистохимическом исследовании в экспериментальной группе на 15-е сутки наблюдалось уменьшение количества клеток, содержащих белок CD68 (CD68⁺ клетки) в зоне заживления. Кроме того, на 15-е сутки количество CD68⁺ клеток было ниже в экспериментальной группе по сравнению с контролем (рис. 2).

При иммуногистохимическом исследовании белка FABP4 в зоне между поврежденными слоями миометрия на 5-е сутки в экспериментальной и контрольной группах площадь скоплений клеток, содержащих FABP4, была больше по сравнению с 15-ми

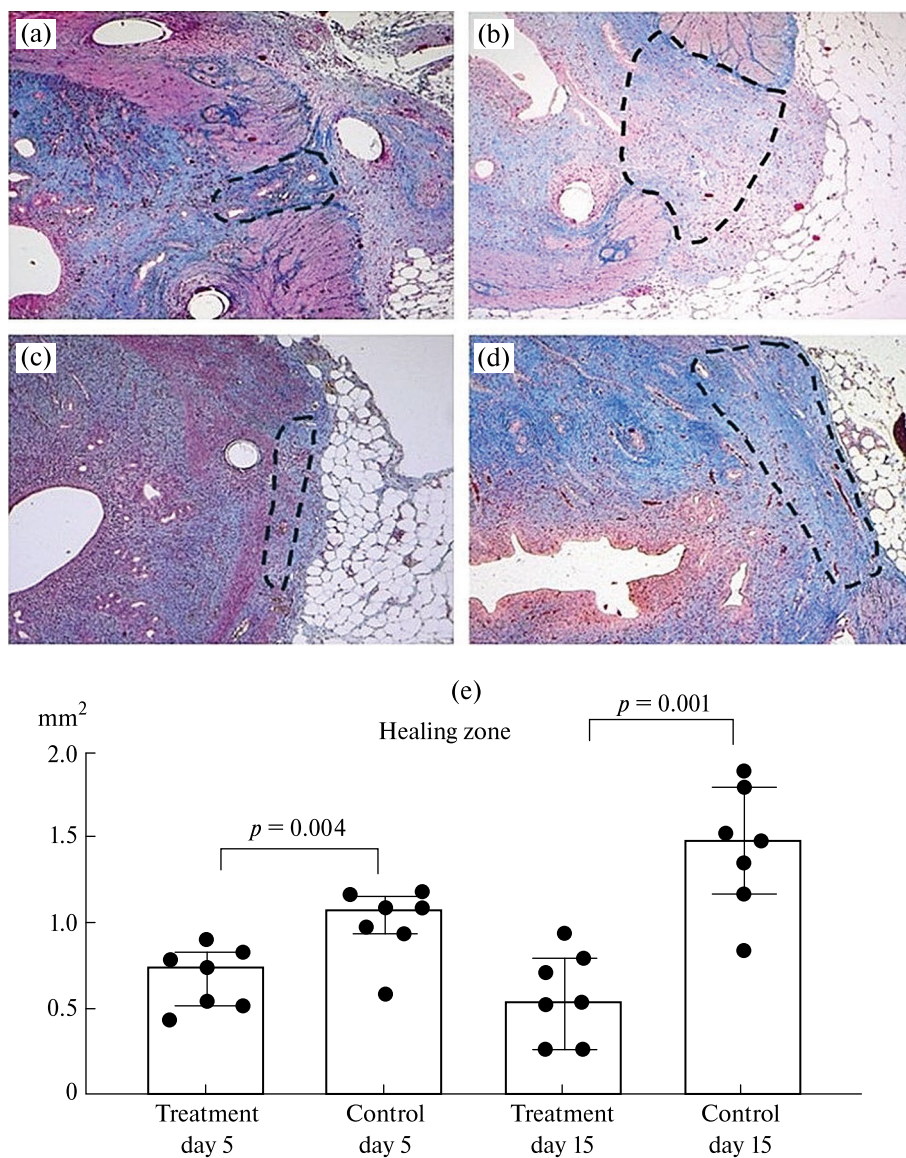


Рис. 1. Зона заживления на 5-е и 15-е сутки после сквозного разреза маточной стенки крысы, окраска по Маллори, х50; прерывистой линией обозначена вычисляемая зона заживления. (а) – Эксперимент на 5-е сутки. (б) – Контроль на 5-е сутки. (с) – Эксперимент на 15-е сутки. (д) – Контроль на 15-е сутки. (е) – Площадь зоны заживления.

сутками; несмотря на преимущественно большие показатели в контроле, на 5-е сутки достоверных различий между экспериментальной и контрольной группами не выявлено. В экспериментальной группе на 15-е сутки в зоне заживления между разобщенным миометрием скопления FABP4 отсутствовали, в экспериментальной группе только у 2 животных (30%) присутствовали FABP4⁺-клетки (рис. 3).

Поврежденная зона маточной стенки со стороны брюшной полости во всех наблюдениях была покрыта жировой тканью, которая прикреплялась к периметрию. В зоне

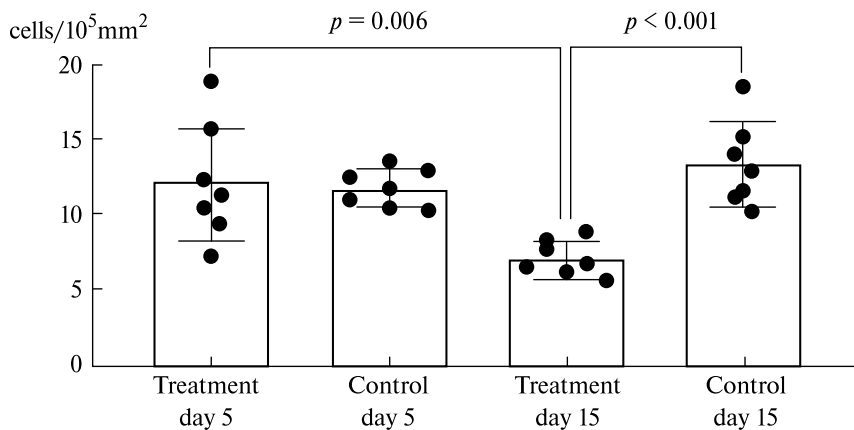
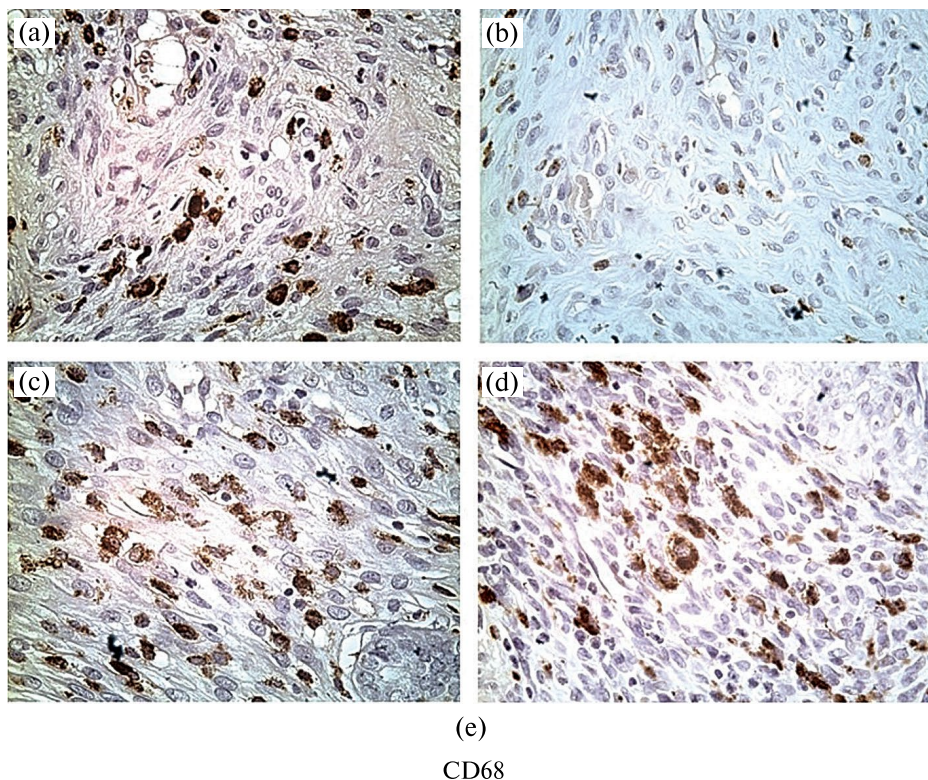


Рис. 2. Иммуногистохимическое окрашивание клеток CD68⁺ в зоне поврежденного миометрия после сквозного хирургического разреза матки крысы, х400. (а) – Эксперимент на 5-е сутки. (б) – Контроль на 5-е сутки. (с) – Эксперимент на 15-е сутки. (д) – Контроль на 15-е сутки. (е) – Плотность клеток CD68 в зоне повреждения миометрия, число клеток CD68 в 10⁵ мкм².

прикрепления жировой ткани в периметрии на 5-е сутки в экспериментальной группе наблюдалась тенденция к более обширным скоплениям ($p = 0.07$) по сравнению с контролем. На 15-е сутки площадь FABP-скоплений была ниже в группе, получавшей препарат ($p = 0.008$). С 5-х по 15-е сутки в экспериментальной группе уровень FABP4 снизился ($p = 0.038$), а в контрольной группе повысился ($p = 0.018$) (рис. 4).

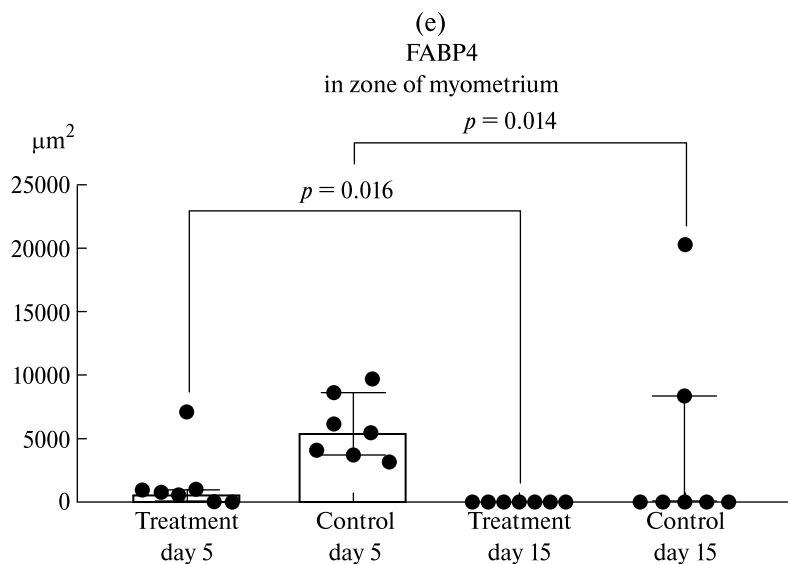
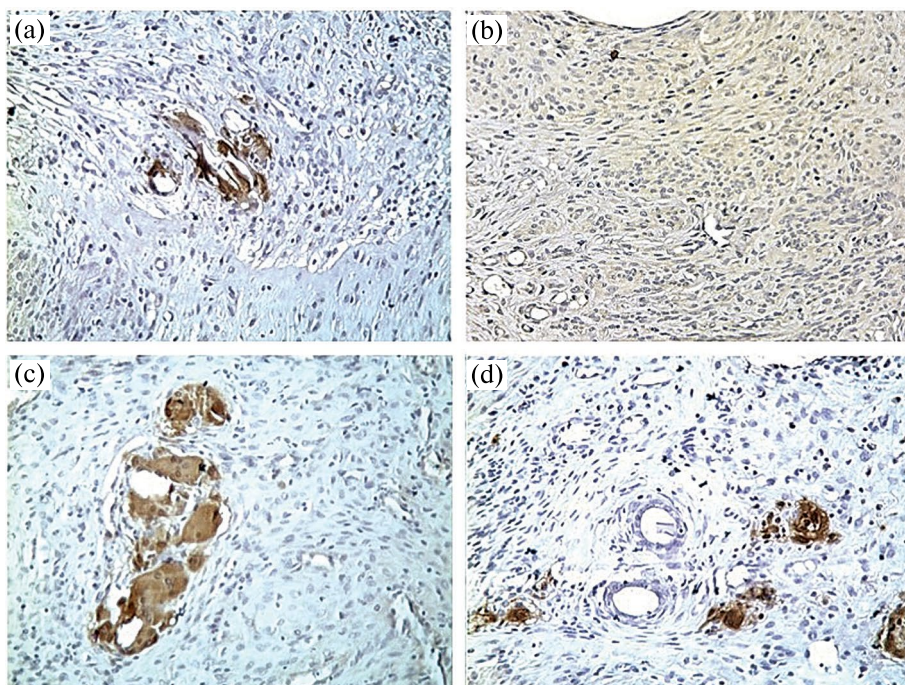


Рис. 3. Скопления FABP4⁺-клеток в зоне поврежденного миометрия после сквозного разреза маточной стенки, x200. (a) – Эксперимент на 5-е сутки. (b) – Контроль на 5-е сутки. (c) – Эксперимент на 15-е сутки. (d) – Контроль на 15-е сутки. (e) – Площадь скоплений FABP4⁺-клеток в зоне повреждения миометрия.

При исследовании экспрессии генов IL-1b, IL-4, IL-6 и IL-10 обнаружено их снижение на 15-е сутки в контрольной группе. На 5-е сутки отмечена более низкая экспрессия IL-4 и IL-10 в экспериментальной группе по сравнению с контролем. На 15-е сутки отмечена более низкая экспрессия IL-1b и IL-6 в контроле (рис. 5).

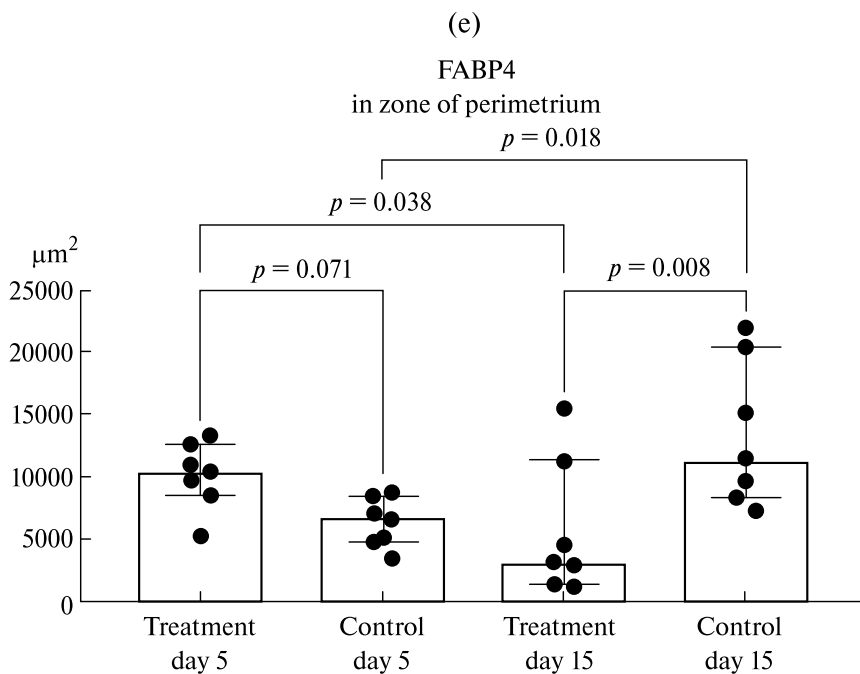
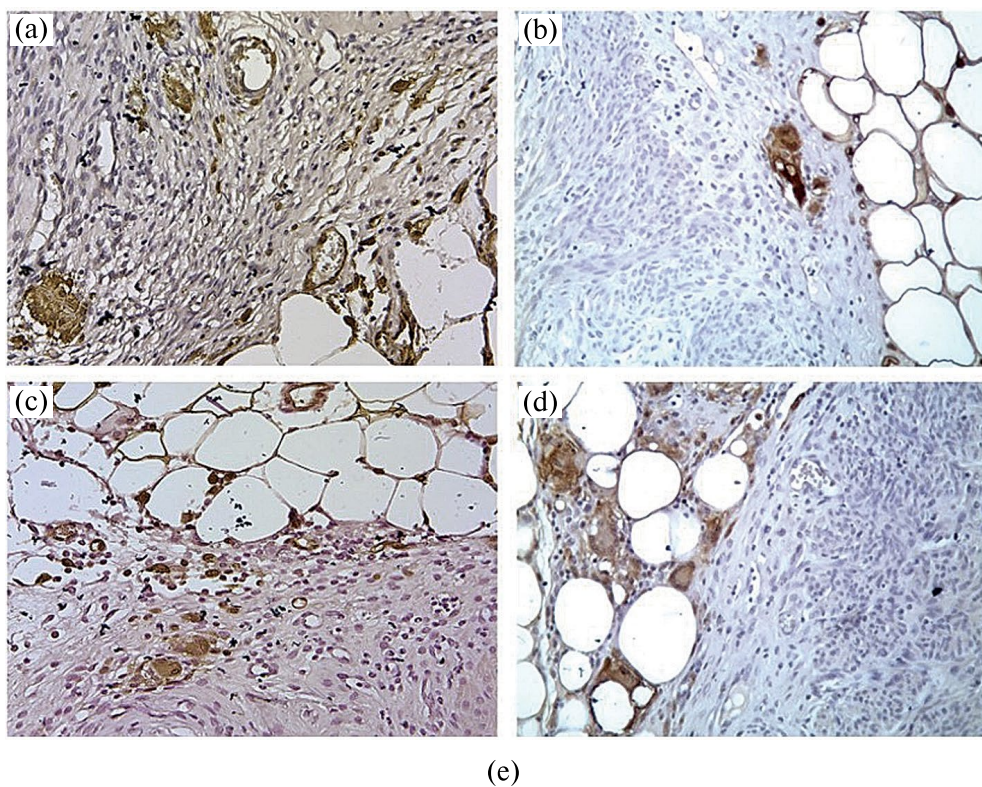


Рис. 4. Скопления FABP4⁺-клеток в зоне поврежденного периметрия после сквозного разреза маточной стенки, x200. (a) – Эксперимент на 5-е сутки. (b) – Контроль на 5-е сутки. (c) – Эксперимент на 15-е сутки. (d) – Контроль на 15-е сутки. (e) – Площадь групп клеток, содержащих FABP4, в зоне повреждения периметрия.

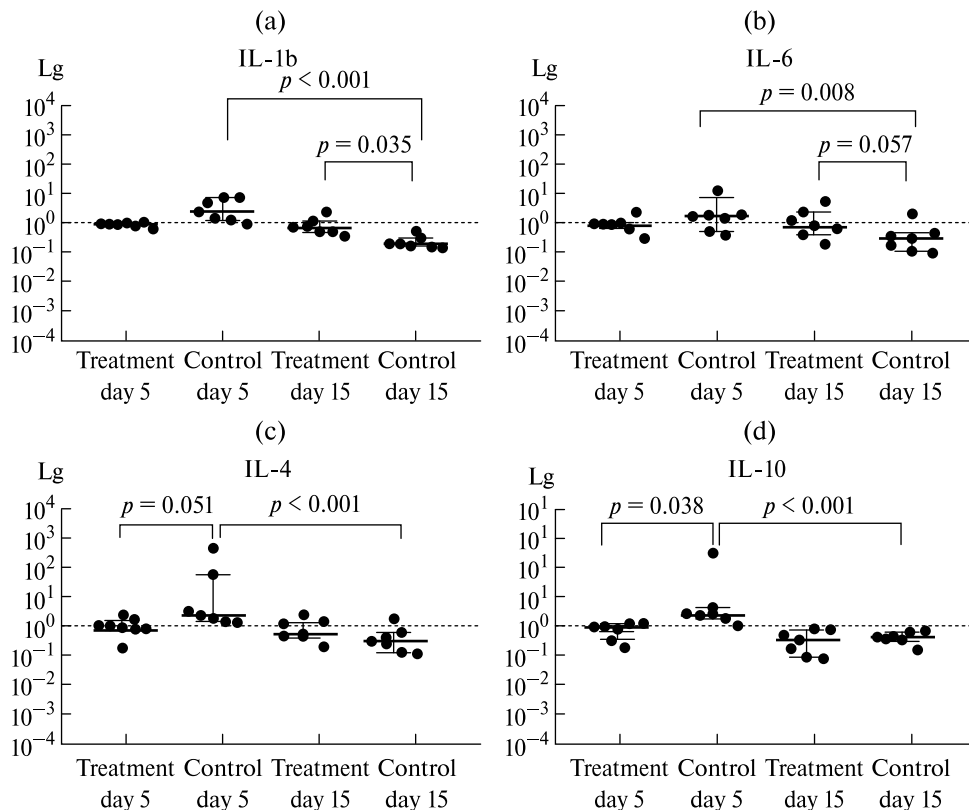


Рис. 5. Уровень экспрессии интерлейкинов в зоне заживления после сквозного хирургического разреза маточной стенки.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для уменьшения влияния фазы эстрального цикла на сравнение показателей между группами мы нормализовали показатель степени экспрессии генов в зоне заживления относительно неоперированного маточного рога для каждого животного. Таким образом, значение экспрессии гена в неповрежденной маточной стенке принималось за 1. Однако маточная стенка крысы – очень пластичный орган, быстро реагирующий на смену гормонального фона в коротком эстральном цикле изменением в экспрессии множества факторов, включая представленные в этом исследовании. Более того, гормональный фон оказывает влияние на скорость восстановления стенки матки, поэтому длительность фаз заживления может отличаться в зависимости от фазы эстрального цикла, в которую проводилась операция на матке. Учитывая эти нюансы, воспалительная фаза заживления при повреждении в фазу эструса совпадает с воспалительной реакцией маточной стенки в метэструсе, и последующее повышение эстрогенов оказывает дополнительный стимул для этапа пролиферации при регенерации [16, 17]. В нашем исследовании у крыс при заживлении после сквозного разреза в фазу эструса к 5-м суткам раневой канал полностью заполняется соединительной тканью, что согласуется с ранее полученными результатами [18, 19]. Все животные в обеих группах показали восстановление целостности поврежденной стенки к 5-м суткам (рис. 1а, б),

что свидетельствует об отсутствии нарушений на первых этапах заживления при использовании кондиционированной среды. Снижение площади новообразованной ткани между разобщенными разрезом слоями миометрия (рис. 1) может отражать сниженную или ограниченную по продолжительности пролиферативную активность в зоне повреждения у экспериментальной группы, но недостаточную для восстановления целостности органа. Косвенно о более раннем завершении фазы пролиферации или более раннем начале фазы ремоделирования в экспериментальной группе может свидетельствовать появление на 5-е сутки вокруг разобщенных мышечных слоев темно-голубой плотной соединительной ткани (рис. 1а).

У крыс белок CD68 относят к общим маркерам макрофагов, однако в резидентных перитонеальных макрофагах его экспрессия обычно низкая и может значительно повышаться в ответ на воспалительные стимулы. [11]. В матке крыс на распределение макрофагов влияют колебания уровней половых гормонов в течение эстрального цикла [22]. Информация о распределении макрофагов в матке грызунов противоречивая и, возможно, связана с используемыми маркерами. Во время эструса и метэструса количество макрофагов F4/80⁺ выше, чем в диэструсе и проэструсе [23]. По другим данным, количество CD68⁺ макрофагов выше на стадиях диэструса и проэструса [24]. В наше исследование были включены животные со стабильным 5-дневным эстральным циклом, и на 5-е и 15-е сутки предполагалось, что крысы будут находиться в фазе эструса или в соседних фазах. Однако оперативное вмешательство могло спровоцировать индивидуальные отклонения от длительности цикла. Снижение на 15-е сутки CD68⁺-клеток в экспериментальной группе определенно указывало на восстановление иммунологической среды, соответствующей фазе эструса в этой группе. Высокое значение CD68 в контрольной группе на 15-е сутки не отличалось от значений на 5-е сутки в обеих группах и могло свидетельствовать о продолжающейся воспалительной реакции в процессе.

Связывающий жирные кислоты белок 4 (FABP4) интенсивно экспрессируется в адипоцитах и макрофагах, умеренно – в эндотелиоцитах и слабо – в других тканях и типах клеток, участвует в метаболизме и накоплении липидов. FABP4 широко используется в качестве маркера дифференцированных адипоцитов [25], но также экспрессируется в адипогенных предшественниках [26]. FABP4 усиливает пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, способствует ангиогенезу [27]. Уровень экспрессии FABP4 в адипоцитах примерно в 10000 раз выше, чем в макрофагах [25]. В макрофагах FABP4 активирует провоспалительные сигнальные пути, приводя к выработке провоспалительных цитокинов, в том числе к высвобождению IL-1b [28]. Таким образом, выявленные на 5-е сутки в зоне заживления кластеры FABP4-клеток могут свидетельствовать о воспалительной реакции в зоне заживления, которая к 15-м суткам завершается. В экспериментальной группе более низкий уровень FABP4 указывает на более раннее завершение фазы воспаления в маточной стенке. Сниженная экспрессия воспалительных цитокинов IL-1b и IL-6 в этой группе также подтверждает окончание фазы воспаления (рис. 5). В области прикрепления жировой ткани площадь FABP4-кластеров в периметрии к 15-м суткам снижается в экспериментальной группе, а в контрольной увеличивается, что также подтверждает модулирующее влияние препарата на воспалительную фазу заживления. Увеличение FABP4 к 15-м суткам в экспериментальной группе (рис. 4е) может говорить о продолжающихся процессах с затратой энергии (воспалительных или пролиферативных) в этой локализации, что согласуется и с повышенным количеством CD68 в зоне поврежденного миометрия (рис. 2d, e). Ранее нами было показано участие жировой ткани в заживлении маточного рога у крыс после сквозного разреза [18, 19, 29]. Полное окутывание поврежденного рога жировой тканью отмечается уже на 5-е сутки [18, 19]. Полное освобождение рога от жировой ткани происходит на 30–60-е сутки после повреждения [29]. В этом исследовании жировая ткань покрывала поврежденный рог в обеих группах на 5-е и на 15-е сутки, но FABP4 в зоне периметрия значительно снизился только в экспериментальной группе, что может свидетельствовать о завершающем этапе

воспалительной реакции и начале освобождения от жировой ткани. Увеличение этого маркера на границе соединения с жировой тканью в контроле на 15-е сутки может указывать на активизацию процессов взаимодействия восстановленной маточной стенки с прикрепленной жировой тканью в этот период.

Уровень мРНК всех исследованных цитокинов на 5-е сутки был выше в контрольной группе, но только IL-4 и IL-10 показали достоверные различия с экспериментальными животными. На 15-е сутки в контрольной группе произошло снижение уровня всех исследованных цитокинов, что также свидетельствует о процессах завершения воспалительной фазы заживления. В экспериментальной группе фаза воспаления, по-видимому, завершилась к 5-м суткам, так как отличий в уровне цитокинов в точках мониторинга не отмечено. Более высокие значения на 5-е сутки по сравнению с 15-ми сутками провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в контроле могут свидетельствовать об активном процессе разрешения воспалительной реакции на 5-е сутки. Это предположение поддерживает высокий уровень противовоспалительных цитокинов IL-4 и IL-10 на 5-е сутки в контрольной группе по сравнению с экспериментальной, эти цитокины участвуют в переходе от воспалительной реакции к пролиферативной [14]. Интересно, что в экспериментальной группе к 15-м суткам в зоне заживления достоверно снизилось количество макрофагов, клетки, содержащие FABP4, исчезли, и исследованные интерлейкины находились на уровне физиологической нормы.

Как уже было отмечено, мы попытались снизить физиологический вклад эстрального цикла на уровень цитокинов, относящийся к процессу заживления, используя в качестве внутреннего контроля неоперированный рог матки и вычитая его показатели из показателей оперированного рога. На рис. 5 пунктирная линия указывает на показатель неоперированного рога, равный 1. Значения уровня экспрессии цитокинов экспериментальной группы на 5-е сутки группируются вокруг этой линии, и медиана совпадает с показателями неоперированного рога, что свидетельствует о физиологических значениях этих цитокинов. Значения IL-10 для всех наблюдений в экспериментальной группе на 15-е сутки находятся ниже физиологической нормы, так же как и медианы показателей IL-1b, IL-4 и IL-6, отражая продолжающийся процесс регенерации, однако достоверных различий с 5-ми сутками не достигают.

IL-1 β играет решающую роль в переходе от воспаления к пролиферации во время заживления ран. Первоначально уровень IL-1 β резко возрастает после повреждения ткани, достигая максимума в течение первых 12–24 ч, а затем возвращается к норме после завершения стадии пролиферации [30, 31]. В эстральном цикле IL-1 β повышается в фазу проэструса и эструса и затем снижается в диэструсе [32]. Высокие значения IL-1b на 5-е сутки в контрольной группе отражают продолжающуюся воспалительную реакцию, связанную с процессом заживления. К 15-м суткам воспалительная фаза в контрольной группе завершается.

IL-4 способствует пролиферации эндометриальных стромальных клеток [33], стимулирует продукцию противовоспалительных цитокинов, активацию макрофагов M2 [34] и ингибирует продукцию IL-1b, IL-6 и других провоспалительных цитокинов [14]. Различий в уровне IL-4 в матке грызунов в эстральном цикле не обнаружено [35]. Высокие уровни IL-6 могут способствовать воспалению и образованию гипертрофических рубцов путем нарушения процесса ремоделирования внеклеточного матрикса [36]. В матке грызунов мРНК и биоактивность IL-6 достигают пика во время проэструса и эструса аналогично IL-1 β [37]. IL-10 относится к противовоспалительным цитокинам, способствует переходу от воспалительной к пролиферативной фазе заживления раны [14, 38]. Таким образом, высокие значения IL-1b, IL-4, IL-6 и IL-10 в контроле на 5-е сутки могут свидетельствовать о переходе от воспалительной фазы к пролиферативной. В экспериментальной группе низкие значения этих цитокинов указывают на завершившуюся к 5-м суткам воспалительную реакцию. Сниженные значения IL-1b и IL-6 на 15-е сутки в контрольной группе по сравнению

с экспериментальной и неповрежденным рогом указывают на продолжающийся процесс регенерации и, возможно, активную фазу ремоделирования [39].

В предыдущих исследованиях было показано, что умеренно гипоксическая кондиционированная среда способствовала ингибированию воспалительных реакций в поврежденной печени [20] и снижению патологического ангиогенеза в роговице глаза [40]. Однако ее влияние на заживление маточной стенки после сквозного хирургического разреза было установлено впервые. Наши результаты подтверждают способность кондиционированной среды снижать воспалительную реакцию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Компоненты кондиционированной среды МСК костномозгового происхождения, культивированных при умеренных гипоксических условиях (10% O₂), ускоряют заживление сквозного разреза маточной стенки в фазу эструса, снижают воспалительную реакцию и способствуют полному завершению воспалительной фазы уже к 5-м суткам. Обработка кондиционированной средой раны до ушивания способствует уменьшению площади заживления и восстановлению физиологического уровня интерлейкинов в поврежденном роге. Исчезновение FABP4⁺-клеток в области поврежденного миометрия и снижение в периметрии в зоне взаимодействия с жировой тканью также указывают на завершение процесса регенерации и, возможно, начало процесса освобождения от жировой ткани. Роль и механизмы взаимодействия эндогенной жировой ткани с поврежденной маточной стенкой исследованы недостаточно и требуют дальнейшего изучения. Однако результаты этой работы указывают, что компоненты кондиционированной среды умеренно гипоксических МСК могут влиять на характер взаимодействия поврежденной маточной стенки и эндогенной жировой ткани.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н. Б. Т., А. А. Т. и А. П. М.), сбор данных (В. В. А., Н. Б. Т., Е. В. К. и А. Н. С.), обработка данных (Н. Б. Т., Т. В. Ф. и А. П. А.), написание и редактирование манускрипта (Н. Б. Т., А. А. Т., А. П. М., Л. М. М.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнялась в рамках государственного задания № 123030700105-0 (FURG-2023-0046) Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных. Исследование одобрено Комиссией по биоэтике Научно-исследовательского института морфологии человека им. акад. А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского” (протокол № 35 (11) от 23.03.2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kosaric N, Kiwanuka H, Gurtner GC* (2019) Stem cell therapies for wound healing. *Expert Opin Biol Ther* 19(6): 575–585.
<https://doi.org/10.1080/14712598.2019.1596257>
2. *Raghuram AC, Yu RP, Lo AY, Sung CJ, Bircan M, Thompson HJ, Wong AK* (2020) Role of stem cell therapies in treating chronic wounds: A systematic review. *World J Stem Cells* 12(7): 659–675.
<https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i7.659>
3. *Abdel-Gawad DRI, Moselhy WA, Ahmed RR, Al-Muzafar HM, Amin KA, Amin MM, El-Nahass ES, Abdou KAH* (2021) Therapeutic effect of mesenchymal stem cells on histopathological, immunohistochemical, and molecular analysis in second-grade burn model. *Stem Cell Res Ther* 12(1): 308.
<https://doi.org/10.1186/s13287-021-02365-y>
4. *Zhou J, Shi Y* (2023) Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): origin, immune regulation, and clinical applications. *Cell Mol Immunol* 20(6): 555–557.
<https://doi.org/10.1038/s41423-023-01034-9>
5. *Egger D, Tripisciano C, Weber V, Dominici M, Kasper C* (2018) Dynamic Cultivation of Mesenchymal Stem Cell Aggregates. *Bioengineering (Basel)* 5(2): 48.
<https://doi.org/10.3390/bioengineering5020048>
6. *Múzes G, Sipos F* (2022) Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome: A Potential Therapeutic Option for Autoimmune and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Cells* 11(15): 2300.
<https://doi.org/10.3390/cells11152300>
7. *Giovannelli L, Bari E, Jommi C, Tartara F, Armocida D, Garbossa D, Cofano F, Torre ML, Segale L* (2023) Mesenchymal stem cell secretome and extracellular vesicles for neurodegenerative diseases: Risk-benefit profile and next steps for the market access. *Bioact Mater* 29: 16–35.
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.06.013>
8. *Ferreira JR, Teixeira GQ, Santos SG, Barbosa MA, Almeida-Porada G, Gonçalves RM* (2018) Mesenchymal Stromal Cell Secretome: Influencing Therapeutic Potential by Cellular Preconditioning. *Front Immunol* 9: 2837.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02837>
9. *Volkova MV, Shen N, Polyanskaya A, Qi X, Boyarintsev VV, Kovaleva EV, Trofimenko AV, Filkov GI, Mezentshev AV, Rybalkin SP, Durymanov MO* (2023) Tissue-Oxygen-Adaptation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Enhances Their Immunomodulatory and Pro-Angiogenic Capacity, Resulting in Accelerated Healing of Chemical Burns. *Int J Mol Sci* 24(4): 4102.
<https://doi.org/10.3390/ijms24044102>
10. *Pezzi A, Amarin B, Laureano Á, Valim V, Dahmer A, Zambonato B, Sehn F, Wilke I, Bruschi L, Silva MALD, Filippi-Chiela E, Silla L* (2017) Effects of Hypoxia in Long-Term In Vitro Expansion of Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. *J Cell Biochem* 118(10): 3072–3079.
<https://doi.org/10.1002/jcb.25953>
11. *Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV* (2017) CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest* 97(1): 4–13.
<https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.116>
12. *Lopez-Castejon G, Brough D* (2011) Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev* 22(4): 189–195.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>
13. *Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T* (2014) IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6(10): a016295
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>
14. *Chatterjee P, Chiasson VL, Bounds KR, Mitchell BM* (2014) Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy. *Front Immunol* 5: 253.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00253>
15. *Park DW, Yang KM* (2011) Hormonal regulation of uterine chemokines and immune cells. *Clin Exp Reprod Med* 38(4): 179–185.
<https://doi.org/10.5653/cerm.2011.38.4.179>
16. *Engeland CG, Sabzehei B, Marucha PT* (2009) Sex hormones and mucosal wound healing. *Brain Behav Immun* 23(5): 629–635.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.12.001>

17. Hubscher CH, Brooks DL, Johnson JR (2005) A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotech Histochem* 80(2): 79–87.
<https://doi.org/10.1080/10520290500138422>
18. Tikhonova NB, Milovanov AP, Aleksankina VV, Fokina TV, Boltovskaya MN, Aleksankin AP, Artem'eva KA (2021) Analysis of Healing of Rat Uterine Wall After Full-Thickness Surgical Incision. *Bull Exp Biol Med* 172(1): 100–104.
<https://doi.org/10.1007/s10517-021-05340-y>
19. Tikhonova NB, Milovanov AP, Aleksankina VV, Fokina TV, Boltovskaya MN, Aleksankin AP (2021) The role of adipose tissue in the healing of rat uterine wall after a full-thickness surgical incision. *Clin Exp Morphol* 10: 72–80.
<https://doi.org/10.31088/CEM2021.10.4.72-80>
20. Temnov AA, Rogov KA, Sklifas AN, Klychnikova EV, Hartl M, Djinovic-Carugo K, Charnagalov A (2019) Protective properties of the cultured stem cell proteome studied in an animal model of acetaminophen-induced acute liver failure. *Mol Biol Rep* 46(3): 3101–3112.
<https://doi.org/10.1007/s11033-019-04765-z>
21. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55(4): 611–622.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
22. De M, Wood GW (1990) Influence of oestrogen and progesterone on macrophage distribution in the mouse uterus. *J Endocrinol* 126(3): 417–424.
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1260417>
23. Huang J, Roby KF, Pace JL, Russell SW, Hunt JS (1995) Cellular localization and hormonal regulation of inducible nitric oxide synthase in cycling mouse uterus. *J Leukoc Biol* 57(1): 27–35.
<https://doi.org/10.1002/jlb.57.1.27>
24. Zhang L, Long W, Xu W, Chen X, Zhao X, Wu B (2022) Digital Cell Atlas of Mouse Uterus: From Regenerative Stage to Maturational Stage. *Front Genet* 13: 847646.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2022.847646>
25. Furuhashi M, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T (2015) Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clin Med Insights Cardiol* 8(Suppl 3): 23–33.
<https://doi.org/10.4137/CMC.S17067>
26. Shan T, Liu W, Kuang S (2013) Fatty acid binding protein 4 expression marks a population of adipocyte progenitors in white and brown adipose tissues. *FASEB J* 27(1): 277–287.
<https://doi.org/10.1096/fj.12-211516>
27. Elmasri H, Ghelfi E, Yu CW, Traphagen S, Cernadas M, Cao H, Shi GP, Plutzky J, Sahin M, Hotamisligil G, Cataltepe S (2012) Endothelial cell-fatty acid binding protein 4 promotes angiogenesis: role of stem cell factor/c-kit pathway. *Angiogenesis* 15(3): 457–468.
<https://doi.org/10.1007/s10456-012-9274-0>
28. Steen KA, Xu H, Bernlohr DA (2017) FABP4/aP2 Regulates Macrophage Redox Signaling and Inflammation Activation via Control of UCP2. *Mol Cell Biol* 37(2): e00282–16.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00282-16>
29. Tikhonova N, Milovanov AP, Aleksankina VV, Kulikov IA, Fokina TV, Aleksankin AP, Belousova TN, Mikhaleva LM, Nizhaeva NV (2023) Adipocytes in the Uterine Wall during Experimental Healing and in Cesarean Scars during Pregnancy. *Int J Mol Sci* 24(20): 15255.
<https://doi.org/10.3390/ijms242015255>
30. Hübner G, Brauchle M, Smola H, Madlener M, Fässler R, Werner S (1996) Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine* 8(7): 548–556.
<https://doi.org/10.1006/cyto.1996.0074>
31. Macleod T, Berekméri A, Bridgewood C, Stacey M, McGonagle D, Wittmann M (2021) The Immunological Impact of IL-1 Family Cytokines on the Epidermal Barrier. *Front Immunol* 12: 808012.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.808012>
32. Hickey DK, Fahey JV, Wira CR (2013) Mouse estrous cycle regulation of vaginal versus uterine cytokines, chemokines, α - β -defensins and TLRs. *Innate Immun* 19(2): 121–131.
<https://doi.org/10.1177/1753425912454026>

33. *Vicetti Miguel RD, Quispe Calla NE, Dixon D, Foster RA, Gambotto A, Pavelko SD, Hall-Stoodley L, Cherpes TL* (2017) IL-4-secreting eosinophils promote endometrial stromal cell proliferation and prevent *Chlamydia*-induced upper genital tract damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(33): E6892–E6901.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1621253114>
34. *Salmon-Ehr V, Ramont L, Godeau G, Birembaut P, Guenounou M, Bernard P, Maquart FX* (2000) Implication of interleukin-4 in wound healing. *Lab Invest* 80(8): 1337–1343.
<https://doi.org/10.1038/labinvest.3780141>
35. *Lopez MC, Stanley MA* (2005) Cytokine profile of mouse vaginal and uterus lymphocytes at estrus and diestrus. *Clin Dev Immunol* 12(2): 159–164.
<https://doi.org/10.1080/17402520500141010>
36. *Sun Q, Tang L, Zhang D* (2023) Molecular mechanisms of uterine incision healing and scar formation. *Eur J Med Res* 28(1): 496.
<https://doi.org/10.1186/s40001-023-01485-w>
37. *De M, Sanford TR, Wood GW* (1992) Interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor alpha are produced in the mouse uterus during the estrous cycle and are induced by estrogen and progesterone. *Dev Biol* 151(1): 297–305.
[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(92\)90234-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(92)90234-8)
38. *Singampalli KL, Balaji S, Wang X, Parikh UM, Kaul A, Gilley J, Birla RK, Bollyky PL, Keswani SG* (2020) The Role of an IL-10/Hyaluronan Axis in Dermal Wound Healing. *Front Cell Dev Biol* 8: 636.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00636>
39. *Johnson BZ, Stevenson AW, Prêle CM, Fear MW, Wood FM* (2020) The Role of IL-6 in Skin Fibrosis and Cutaneous Wound Healing. *Biomedicines* 8(5): 101.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines8050101>. PMID: 32365896; PMCID: PMC7277690
40. *Kodunov A, Temnov A, Tereshchenko A, Trifanenkova I, Sklifas A, Shatskikh A* (2022) Mechanisms of the influence of conditioned medium of cultured stem cells on the development of pathological angiogenesis in the eye cornea in experiment. *Patogenez (Pathogenesis)* 19(4): 41–52.
<https://doi.org/10.25557/2310-0435.2021.04.41-52>

Immunological Effect of Moderately Hypoxic Mesenchymal Stromal Cell Culture Conditions on Uterine Healing in Rats

N. B. Tikhonova^{a,*}, A. A. Temnov^b, V. V. Aleksankina^a, T. V. Fokina^a, A. P. Aleksankin^a,
A. N. Sklifas^b, E. V. Kuznetsova^a, A. P. Milovanov^a, and L. M. Mikhaleva^a

^a*Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russia*

^b*Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia*

^{*}*E-mail: morpholhum@list.ru*

The aim is to determine the influence of conditioned medium of autologous bone marrow stromal cells (CMSC) cultured at 10% O₂, on the healing of the rat uterus after a thorough surgical incision. Methods: In the treated group of animals ($n = 14$), the edges of the uterine wound were processed with a conditioned medium prior to suturing, in the control group of animals ($n = 14$), the incision was not processed. Results: On the 5th and 15th days after the operation, morphological studies of the healing zone were carried out. The number of macrophages CD68, FABP4+ cells and the level of mRNA expression of inflammatory cytokine IL-1b, IL-6 and anti-inflammatory IL-4, IL-10 were assessed. The healing area in the treated group was lower than the reference area in all monitoring periods ($p < 0.05$). From the 5th to the 15th day, the expression of IL-1b, IL-4, IL-6 and IL-10 in the control group decreased ($p < 0.05$), in the processed group no valid differences were found ($p < 0.05$). On the 5th day in the treatment group, the expression of IL-4 and IL-10 was lower than in the control, and on the 15th day the expression of IL-1b was lower in the control group. The number of macrophages of CD68 decreased by 15th day in the treated group compared to 5th day and was lower than in the control group. The FABP4 cell clusters in the area of damaged myometrium at 15 days in both groups were almost eliminated except for 2 animals in the control group. In the area of damaged perimetrium, FABP4 clusters increased in the control group by 15th day, and in the treated group decreased and was reliably lower than in the control group. Thus, the application of CMSC has resulted in a reduction of the damage area, reduced inflammatory response and accelerated recovery of the uterine wall.

Keywords: rat uterus, wound healing, conditioned medium, CD68, FABP4, IL-1b, IL-4, IL-6, IL-10