

УДК: 616-002.18-006.327:616.381-007.274-092.9

С.В. Скальский, Т.Ф. Соколова

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА ФИБРОБЛАСТОВ ПРИ ОБРАЗОВАНИИ СПАЕК В БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ

Омский государственный медицинский университет, г. Омск, Российская Федерация

S.V. Skalsky, T.F. Sokolova

CHANGES OF PROLIFERATION AND APOPTOSIS PROCESSES IN FIBROBLASTS IN ABDOMINAL ADHESIONS FORMATION

Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

Резюме. Цель исследования — оценка процессов пролиферации, коллагеногенеза и апоптоза фибробластов крыс, активированных *in vivo* при моделировании гемоперитонеума. **Материал и методы.** Исследования проведены в первичной культуре клеток на 114 пулах перитонеальных фибробластов крыс, полученных от 26 животных с гемоперитонеумом на 10 сутки после его моделирования – основная группа, и 12 контрольных крыс. Суспензию перитонеальных фибробластов (2×10^6 кл./мл) культивировали 24 часа ($t 37^\circ\text{C}$, $5\% \text{CO}_2$). Пролиферативную активность оценивали по количеству фибробластов с морфологическими признаками митозов, а также по экспрессии маркера пролиферации Ki-67 с использованием моноклональных антител. Степень стимуляции коллагеногенеза фибробластами оценивали по количеству белковосвязанного оксипролина в супернатантах клеточных культур. Количество активных форм ядерного транскрипционного фактора NF- κ B определяли методом иммуноферментного анализа. Проводили ревизию брюшной полости крыс с макро- и микроскопическим анализом спаек. **Результаты.** Установлено, что у крыс с гемоперитонеумом пролиферативная активность фибробластов была высокой: митотический индекс превышал показатели контроля более чем в 5 раз, уровень маркера пролиферации Ki-67 был повышен почти в 8 раз. Выявлено 4-кратное увеличение коллагенсинтетической функции активированных фибробластов. Отмечена прямая корреляционная связь между пролиферативной активностью фибробластов, количеством белковосвязанного оксипролина и числом спаек в брюшной полости крыс ($r=0,91$; $r=0,78$, $p<0,05$). Усиление процессов пролиферации фибробластов, их коллагенсинтетической функции при индукции спаечного процесса в брюшной полости сопровождалось активацией фактора транскрипции NF- κ B, приводящей к блокированию процессов апоптоза. Показатели активации NF- κ B перитонеальных фибробластов крыс с гемоперитонеумом в 8 раз превышали значения контрольных. **Выводы:** Нарушения ауторегуляции роста соединительной ткани при гемоперитонеуме с преобладанием индукции пролиферации фибробластов, сопровождающейся активацией их

Abstract. Objective of the study is to evaluate the processes of proliferation, collagenosis and apoptosis in fibroblasts activated *in vivo* while modeling hemoperitoneum in rats. **Material and methods.** The studies were performed in the primary cell culture on 114 pools of rat peritoneal fibroblasts obtained from 26 animals with hemoperitoneum on the 10th day after simulating the model; it was a main group, and 12 control rats. A suspension of peritoneal fibroblasts (2×10^6 cells/ml) was cultured for 24 hours ($t37^\circ\text{C}$, $5\% \text{CO}_2$). Proliferative activity was assessed by the number of fibroblasts with mitosis morphological features, as well as by the expression of a proliferation marker Ki-67 using the monoclonal antibodies. The degree of collagenosis stimulation by fibroblasts was evaluated by the amount of protein-bound oxyproline in the supernatants of the cell cultures. Amount of active forms of the nuclear transcription factor NF- κ B was determined by ELISA. The revision of the abdominal cavity in rats with macro- and microscopic analysis of adhesions was performed. It was found that the proliferative activity of fibroblasts was high in rats with hemoperitoneum: the mitotic index exceeded the control values by more than 5 times, the level of the proliferation marker Ki-67 was increased almost 8 times. It was detected a 4-fold increase in the collagen-synthetic function of activated fibroblasts. A direct correlation between the proliferative activity of fibroblasts, the amount of protein-bound oxyproline and the number of abdominal adhesions in rats was noted ($r=0.91$, $r=0.78$, $p<0.05$). The intensification of fibroblasts proliferation, their collagen-synthetic function in adhesion process induction in the abdominal cavity was accompanied by the activation of the transcription factor NF- κ B, leading to the blocking of apoptosis processes. The indices of activation for NF- κ B peritoneal fibroblasts in rats with hemoperitoneum were 8 times higher than the control values. **Conclusions.** Thus, violations of growth autoregulation of the connective tissue in hemoperitoneum with the predominance of fibroblast proliferation induction, accompanied by activation of their collagen-synthesizing function over inhibition, leading to the adhesion progression.

коллагенсинтетической функции над ингибцией приводит к прогрессированию спайкообразования.

Ключевые слова: спайкообразование, пролиферация, оксипролин, апоптоз, маркер пролиферации Ki-67, ядерный транскрипционный фактор NF-κB

Keywords: adhesion, proliferation, hydroxyproline, apoptosis, proliferation marker Ki-67, nuclear transcription factor NF-κB

Конфликт интересов отсутствует.

There is no conflict of interest.

Контактная информация автора, ответственного за переписку: Скальский Сергей Викторович
sergscalskiy@mail.ru

Contact information of the author responsible for correspondence: Sergey V. Skalsky
sergscalskiy@mail.ru

Дата поступления 08.09. 2017

Received 08.09.2017

Образец цитирования:

Скальский С.В., Соколова Т.Ф. Изменение процессов пролиферации и апоптоза фибробластов при образовании спаек в брюшной полости. Вестник уральской медицинской академической науки. 2017, Том 14, №4, с. 369–374, DOI: 10.22138/2500-0918-2017-14-4-369-374

For citation:

Skalsky S.V., Sokolova T.F. Changes of proliferation and apoptosis processes in fibroblasts in abdominal adhesions formation. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. Journal of Ural Medical Academic Science. 2017, Vol. 14, no. 4, pp. 369–374. DOI: 10.22138/2500-0918-2017-14-4-369-374 (In Russ)

Сохранение физиологического гомеостаза соединительной ткани обеспечивается балансом между пролиферацией клеток и апоптозом. Пролиферация является завершающей фазой развития воспаления, обеспечивающей репаративную регенерацию тканей на месте очага альтерации. Центральную роль в репаративных реакциях при воспалении, в заживлении ран и фиброзе играют фибробласты, которые развиваются из молодых камбиальных клеток и в очаге репарации быстро образуют новые фибробласты путем деления (митоз, amitoz), роста и перемещения [1, 2].

Очевидно, что чрезмерному росту соединительной ткани способствует интенсификация выработки фибробластами коллагена и гликозаминогликанов. В литературе имеются единичные сообщения о влиянии повышенной продукции оксипролина и гидроксипролина на гиперпродукцию соединительной ткани [3].

В условиях патологии фибробласты участвуют в образовании заместительной соединительной ткани: рубцов, спаек. При репаративных процессах в очаге воспаления, при фиброзе регенерация клеток и фиброплазия достигаются как активацией процессов пролиферации, так и ограничением апоптоза клеток [4]. Апоптоз является основным механизмом удаления клеток в ходе различных этапов заживления ран. Это одна из форм клеточной смерти, которая не приводит к воспалительной реакции и поэтому важна в разрешении воспаления и фиброгенеза [5]. Преждевременный апоптоз или его чрезмерное инициирование нарушает восстановление тканей, например, в случае диабетических трофических язв [6]. И наоборот, предполагается, что задержка или отсутствие индукции апоптоза фибробла-

стов приводит к чрезмерному фиброгенезу, как, например, в келоидных рубцах [3]. Одним из главных факторов, регулирующих процессы клеточной пролиферации и апоптоза, является ядерный транскрипционный фактор NF-κB. Димеры NF-κB находятся в цитоплазме покоящейся клетки в неактивной форме, связанные с одним из ингибирующих белков IκB. Фосфорилирование IκB в ответ на различные стимулы приводит к их протеолитическому расщеплению и активации NF-κB, который затем перемещается в ядро клетки, где связывается с промоторным участком специфического гена и запускает процесс транскрипции [3]. При активации NF-κB индуцируются противоапоптотические механизмы практически во всех клетках. Факторы семейства NF-κB ингибируют апоптоз несколькими путями: NF-κB транскриптивирует ген, кодирующий белок A1/Bfl1 — член семейства белков Bcl2, ингибирующий выброс цитохрома C. Наряду с этим, NF-κB увеличивает экспрессию ингибиторов апоптоза IAP1 и IAP2, блокирующих функции каспаз 3, 6-9 [8]. Конечным результатом этого является нарушение заживления ран и формирование в коже гипертрофических и келоидных рубцов [9]. Изменения функциональной активности фибробластов в результате нарушения уравнивания эффекта пролиферации клеток процессами апоптоза при патологической регенерации может явиться важным фактором, приводящим к избыточному росту соединительной ткани при спайкообразовании, и позволит не только прогнозировать наличие и развитие спаечного процесса после хирургических вмешательств, но и будет базовым для разработки патогенетически обоснованной профилактики и терапии.

Целью нашего исследования явилась оценка регуляторных процессов пролиферации, коллагеногенеза и апоптоза с изменением их соотношений в культуре фибробластов крыс, активированных *in vivo* при моделировании гемоперитонеума.

Материалы и методы

Исследования проведены в первичной культуре клеток на 114 пулах перитонеальных фибробластов крыс. Клетки для культивирования получали от крыс с гемоперитонеумом и контрольных крыс. Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении, свободном доступе к корму и питьевой воде. Все исследования проводили в полном соответствии с современными принципами биоэтики, в том числе «Европейской конвенцией по защите прав позвоночных животных» (принятой в Страсбурге 18 марта 1986 года) и «Всемирной декларацией прав животных» («Universal Declaration of Animal Rights», принятой Международной Лигой Прав Животных 23 сентября 1977 года в Лондоне и объявленной 15 октября 1978 года в штабе ЮНЕСКО в Париже), «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» согласно приказу МЗ СССР №775 от 12.08.1977 г., Федерального закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.12.1999 г.

В основной группе лабораторных белых крыс-самцов ($n=26$) массой 234 ± 24 г. моделировался, согласно разработанному нами способу [патент РФ №2260854], гемоперитонеум однократным инъекционным внутрибрюшинным введением стерильной аутокрови из расчета 1% массы тела, забранной с соблюдением правил асептики из дорсальной хвостовой вены. Кровь вводилась в брюшинную полость через прокол в каудальной трети белой линии живота в течение не более чем 20 секунд с момента взятия. Контрольную группу составили 12 крыс, которым аналогичным способом вводили 0,9% раствор NaCl. На 10 сутки после моделирования гемоперитонеума (основная группа) или введения физиологического раствора (контрольная группа) крыс наркотизировали диэтиловым эфиром (ОАО «Медхимпром»), проводили эвтаназию путем декапитации с последующим немедленным забором материала для культуральных исследований. Брюшную полость через прокол в каудальной трети белой линии живота промывали 10 мл среды RPMI-1640 с 10% раствором гепарина и антибиотиками.

Суспензии клеток перитонеальных смывов трижды отмывали ростовой средой RPMI-1640 («Sigma») с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2% глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 ЕД/мл стрептомицина. Затем суспензию перитонеальных фибробластов, полученную от каждого животного, делили на 3 одинаковых пула, помещали в чашки Петри (D 40 мм), содержащие стекла, покрытые

поли-D-лизином, и культивировали в течение 24 часов в условиях насыщающей влажности в CO₂-инкубаторе (Revco, США) при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Концентрация посадки клеток в культурах составляла 2×10^6 фибробластов в 1 мл взвеси. Работу с клеточными культурами производили с соблюдением правил асептики и антисептики в стерильном боксе, оборудованном ламинарным шкафом 2-го класса биологической безопасности (Labconco, США). Пролиферативную активность фибробластов оценивали в обычном гистологическом исследовании по количеству клеток с морфологическими признаками митозов, а также по экспрессии в ядрах фибробластов маркера пролиферации Ki-67 — белка, экспрессирующегося на всех стадиях клеточного цикла, кроме стадии G₀. Традиционный подсчет митотической активности недостаточно отражает пролиферативный потенциал клетки, так как собственно митоз занимает несколько часов (что может визуализироваться при рутинном исследовании), а подготовка к нему — около 24 часов, в связи с чем изучение негистонового протеина Ki-67 (маркера пролиферации), экспрессирующегося во всех клетках, вышедших из G₀-фазы, позволяет определить «скрытый» пролиферативный потенциал фибробластов. Для определения пролиферативной активности фибробластов покровные стекла высушивали, клетки на них фиксировали и окрашивали по Романовскому-Гимза. Визуализацию проводили с помощью бинокулярного светового микроскопа (Axioscop «Carl Zeiss», Германия). Увеличение: объектив $\times 100$, окуляр $\times 10$. Просматривали 400 клеток и подсчитывали среди них количество клеток с морфологическими признаками митозов. Митотический индекс (MI) определяли по формуле: $MI = n/N \times 100\%$, где n — число клеток, вступивших в митоз, N — общее количество клеток. Иммуноцитохимическое исследование фибробластов выполняли по стандартной методике с использованием в качестве первичных антител МКА к Ki-67 («Sigma», США) в разведении 1:20 и вторичных ФИТС-меченых козьих антител к иммуноглобулинам мыши («Сорбент», Россия). В качестве контроля для исключения прямого иммуномечения (окрашивания) клеток вторичными антителами использовали вместо первичных антител фосфатно-солевой буфер (PBS). Полученные препараты изучали с помощью люминесцентного микроскопа (Axiophot, «Carl Zeiss», Германия), применяя объективы $\times 100/1,3$ и окуляры $\times 10$ с подсчетом клеток, имеющих светящиеся фокусы в области ядра, и предварительной оценкой клеток при фазово-контрастной микроскопии.

В супернатантах клеточных культур определяли содержание оксипролина по методике [10]. Содержимое свободного и суммарного оксипролина рассчитывали по калибровочной кривой и выражали в микромолях на 1 л. По разности содержания свободного и суммарного оксипролина находили количество белковосвязан-

ного оксипролина.

Приготовление ядерных экстрактов для определения содержания NF- κ B проводилось в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя BSM Diagnostics (США). Клеточные культуры после 24 часового культивирования (37°C, 5% CO₂) трижды отмывали холодным PBS. Осадок ресуспензировали в гипотоническом буфере, инкубировали на льду 15 минут, затем после добавления детергента NP40 центрифугировали при 4°C (3000 об/мин, 10 минут). Осадок суспензировали в 50 мкл экстракционного буфера в присутствии ингибиторов протеиназ (30 минут) и центрифугировали при 4°C (13000 об/мин, 30 минут). В супернатанте (ядерная фракция) методом иммуоферментного анализа с использованием наборов реагентов BSM Diagnostics (США) и фотометра «Multiscan» (Финляндия) определяли количество активных форм NF- κ B. После забора материала для культуральных исследований проводилась ревизия брюшной полости крыс с оценкой наличия спаечного процесса и его распространенности, локализации спаек, их формы. Определялся морфологический тип каждой обнаруженной спайки. Иссеченные соединительнотканые спайки подвергались макро- и микроскопическому анализу с использованием морфологических стандартных методик. Весь материал фиксировали в 10% нейтральном формалине и спирт-формоле. После парафиновой проводки гистологические срезы толщиной 5–6 мкм изготавливали на микротоме «Reichert» (США) и окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону. Анализ результатов исследования выполняли с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 6.0». Результаты представлены в виде средней арифметической (M) и ошибки средней (m). Определение значимости различий проведено с помощью критерия Стьюдента. Корреляционный анализ проводили с применением рангового коэффициента корреляции Спирмена. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Данные о пролиферативной активности фибробластов, полученных на 10 сутки после моделирования гемоперитонеума и оцененных в суточной культуре клеток по количеству фибробластов с морфологическими признаками митозов, а также по экспрессии общеизвестного индикатора пролиферативного состояния клеток — ядерного антигена Ki-67 представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, у крыс контрольной группы пролиферативная активность фибробластов была низкой. Митотический индекс составлял менее 3%. Экспрессия маркера пролиферации, напрямую связанного с делением клетки, белка Ki-67 в ядрах интактных фибробластов здоровых животных не превышала 4%. У животных основной группы, на 10 сутки после развития ге-

моперитонеума, митотический индекс в суточной культуре фибробластов превысил показатели контроля более чем в 5 раз, антиген Ki-67 маркировал 32,6% клеток, что было почти в 8 раз выше контрольных показателей. Высокая пролиферативная активность перитонеальных фибробластов крыс основной группы, активированных *in vivo*, на 10 сутки асептического воспаления брюшины сочеталась с образованием в брюшной полости соединительнотканых спаек со средним количеством 8,2±1,8 на одно животное. Более половины спаек (64,7%) были локализовано в нижнем этаже брюшной полости. Спайки (висцерально-париетальные — 24,4% и висцеро-висцеральные — 75,6%) макроскопически были представлены тяжевыми, плоскостными, пленчатыми, паутинными и смешанными. Микроскопически спайки состояли из волокнистой соединительной ткани. Среди клеток спаечной ткани преобладали клетки фибробластического ряда: фибробласты и фиброциты. Между показателем пролиферации фибробластов и числом спаек выявлено наличие сильной положительной корреляционной связи с коэффициентом корреляции 0,91 (p<0,05).

Таблица 1

Сравнительные данные митотической активности фибробластов, экспрессии в клетках антигена Ki-67, ядерного транскрипционного фактора NF- κ B у контрольных крыс и крыс, перенесших гемоперитонеум

Table 1

Comparative data of mitotic activity of fibroblasts, expression in Ki-67 antigens, nuclear transcription factor NF- κ B in control rats and rats after hemoperitoneum

Показатели	Группы животных	
	контрольная	основная
Митотический индекс, %	2,3±0,2	12,3±0,4*
Количество Ki-67+ клеток, %	3,7±0,3	32,6±0,7*
NF- κ B, пг/мл	84,2±27,6	671,7±21,3*

Исследование коллагенсинтетической функции активированных *in vivo* фибробластов, заключающееся в определении в супернатантах клеточных культур белковосвязанного оксипролина — маркера синтеза коллагена, показало, что при моделировании гемоперитонеума, сопровождающегося повышенным спайкообразованием в брюшной полости крыс, в культуре активированных *in vivo* фибробластов происходило увеличение образования белковосвязанного оксипролина. Установлено 4-кратное (p<0,05) повышение коллагенсинтетической функции активированных при моделировании гемоперитонеума фибробластов в сравнении с контролем (табл. 1). Отмечена прямая корреляционная связь между количеством белковосвязанного оксипролина и числом спаек в брюшной полости крыс (r=0,78, p<0,05).

Увеличение в ходе асептического воспаления брю-

шины количества активированных фибробластов, обладающих высоким пролиферативным потенциалом с морфологическими признаками митозов и гиперэкспрессией Ki-67, является одним из ключевых звеньев избыточного формирования соединительной ткани, обуславливающего выраженное и распространенное спайкообразование в брюшинной полости крыс при гемоперитонеуме.

Не менее важным механизмом регуляции роста соединительной ткани являются процессы апоптоза. Неоднократно показано, что фибробластические клетки удаляются путем апоптоза на завершающей стадии заживления ран, а задержка или отсутствие индукции апоптоза фибробластов приводит к чрезмерному фиброгенезу [5, 7, 11, 12]. Усиление резистентности клеток к апоптозу может быть связано с активацией ядерного фактора транскрипции NF-κB, индуцирующего различные факторы, препятствующие гибели клетки, что приводит к блокированию процессов апоптоза [8]. Согласно представленным в табл. 1 данным по экспрессии транскрипционного фактора NF-κB (p50/p65), его активность в культурах перитонеальных фибробластов, полученных от крыс с гемоперитонеумом (основная группа), а также неактивированных перитонеальных фибробластов контрольных животных была различной. Сравнительный анализ уровней NF-κB в основной и контрольной группах выявил достоверное различие показателей. Так, в первичных культурах неактивированных перитонеальных фибробластов (контрольная группа) содержание NF-κB в образцах лизата ядер клеток не превышало минимальной, определяемой параметрами тест-системы, концентрации (150 пг/мл). В ядерных лизатах культур активированных фибробластов крыс с гемоперитонеумом (основная группа) содержание NF-κB было высоким. Показатели активации фактора транскрипции NF-κB перитонеаль-

ных фибробластов крыс с гемоперитонеумом превышали значения контрольных показателей в 8 раз. Активация NF-κB перитонеальных фибробластов при асептическом воспалении брюшины у крыс, повышая уровень экспрессии ингибиторов апоптоза, приводила к блокированию процессов апоптоза, и наряду с выявленной активацией процессов пролиферации фибробластов, увеличения количества клеток с морфологическими признаками митозов и Ki 67-позитивных клеток, способствовала избыточной продукции соединительной ткани при гемоперитонеуме с образованием множественных спаек.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы.

1. Моделирование гемоперитонеума на этапе образования спаек сопровождается повышением пролиферации фибробластов (митотический индекс превышает показатели контроля более чем в 5 раз, уровень маркера пролиферации Ki-67 почти в 8 раз) и сочетается с образованием в брюшной полости крыс соединительнотканых спаек ($r=0,91$; $p<0,05$).

2. Спаечный процесс сопровождается усилением темпов синтеза фибробластами компонентов межклеточного матрикса: 4-кратным увеличением образования белково-связанного оксипролина.

3. При индукции активности перитонеальных фибробластов *in vivo* (модель гемоперитонеума) наблюдается 8-кратный рост уровня активных форм NF-κB, индуцирующих механизмы, приводящий к блокированию процессов апоптоза.

4. Нарушение регуляции клеточного цикла с активацией пролиферации фибробластов и их коллагенсинтетической функции, ингибированием апоптоза является одним из механизмов избыточной продукции соединительной ткани при гемоперитонеуме, что и приводит к прогрессированию спайкообразования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Klingberg F., Hinz B., White E. S. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *The Journal of pathology*. 2013. Vol. 229 (2). pp. 298-309.
2. Lieber R. L., Ward S. R. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 4. Structural and functional consequences of skeletal muscle fibrosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2013. Vol. 305 (3). pp. 241-252.
3. Головач И.Ю. Ядерный фактор κB (NF-κB) как важный патогенетический фактор и новая мишень в лечении ревматических заболеваний. *Рациональная фармакотерапия*. 2012. Т. 3 (24). С. 46-51.
4. Duffield J. S. et al. Host responses in tissue repair and fibrosis. *Annual review of pathology*. 2013. Vol.8. p. 241.
5. Mukhopadhyay S. et al. Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis*. – 2014. Vol. 19 (4). pp. 555-566.
6. Arya A. K. et al. Recent advances on the association of

REFERENCES

1. Klingberg F., Hinz B., White E. S. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *The Journal of pathology*. 2013. Vol. 229 (2). pp. 298-309.
2. Lieber R. L., Ward S. R. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 4. Structural and functional consequences of skeletal muscle fibrosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2013. Vol. 305 (3). pp. 241-252.
3. Golovach I.Yu. Nuclear factor κB (NF-κB) as an important factor and target in treatment of rheumatic diseases. *Ratsionalnaya farmakoterapiya*. 2012. Vol.3 (24). pp. 46-51. (In Russ)
4. Duffield J. S. et al. Host responses in tissue repair and fibrosis. *Annual review of pathology*. 2013. Vol. 8. p. 241.
5. Mukhopadhyay S. et al. Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis*. 2014. Vol.19 (4). pp. 555-566.
6. Arya A. K. et al. Recent advances on the association of

- apoptosis in chronic non healing diabetic wound. *World J Diabetes*. 2014. Vol. 5 (6). pp. 756-762.
7. Ikeda K. et al. Resveratrol inhibits fibrogenesis and induces apoptosis in keloid fibroblasts. *Wound Repair and Regeneration*. 2013. Vol. 21 (4). pp. 616-623.
8. Кунцевич Н.В. Роль нуклеарного фактора транскрипции NF-κB в развитии отторжения трансплантата. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2010. Т. XII, № 1. С. 72-77.
9. Lee Y. S. Hsu T., Chiu W.C. et al. Keloid-derived, plasma/fibrin-based skin equivalents generate de novo dermal and epidermal pathology of keloid fibrosis in a mouse model. *Wound Repair and Regeneration*. 2015. Vol. 24(1). pp. 57-60.
10. Шараев П.Н. Метод определения свободного и связанного оксипролина в сыворотке крови. *Лабораторное дело*. 1990. № 5. С. 283-285.
11. Czabotar P. E. et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014. Vol. 15(1). pp. 49-63.
12. Forbes S. J., Rosenthal N. Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy. *Nature medicine*. 2014. Vol. 20(8). pp. 857-869.
- apoptosis in chronic non healing diabetic wound. *World J Diabetes*. 2014. Vol.5 (6). pp. 756-62.
7. Ikeda K. et al. Resveratrol inhibits fibrogenesis and induces apoptosis in keloid fibroblasts. *Wound Repair and Regeneration*. 2013. Vol.21 (4). pp. 616-623.
8. Kuntsevich N.V. Role of nuclear transcription factor NF-κB in development of transplant rejection. *Vestnik transplantologii I iskustvennyh organov*. 2010. Vol.12 (1). pp. 72-77. (In Russ)
9. Lee Y. S. Hsu T., Chiu W.C. et al. Keloid-derived, plasma/fibrin-based skin equivalents generate de novo dermal and epidermal pathology of keloid fibrosis in a mouse model. *Wound Repair and Regeneration*. 2015. Vol. 24(1). pp. 57-60
10. Sharaev P.N. Test for detection free and bound hydroxyproline in blood serum. *Laboratornoye delo*. 1990. (5). pp. 283-285. (In Russ)
11. Czabotar P. E. et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014. Vol. 15(1). pp. 49-63.
12. Forbes S. J., Rosenthal N. Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy. *Nature medicine*. 2014. Vol. 20(8). pp. 857-869.

Авторы

Скальский Сергей Викторович

К.м.н., доцент, заведующий кафедрой фармакологии с курсом клинической фармакологии
sergscalskiy@mail.ru

Соколова Татьяна Федоровна

Д.м.н., ассистент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии
tfsokolova@mail.ru.

Омский государственный медицинский университет
Российская Федерация, 644099, г. Омск, ул. Ленина д.12.

Authors

Sergey V. Skalsky

Cand. Sci. (Med.), Docent, Head of the Department of Pharmacology
sergscalskiy@mail.ru

Tatyana F. Sokolova

Doc. Sci. (Med.), Assistant of the Department of Pharmacology
tfsokolova@mail.ru

Omsk State Medical University
Russian Federation, 644099 Omsk, ul. Lenin, 12