

## ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ЗАЖИВЛЕНИЕ РАН

Г. А. Ковалев, И. О. Ищенко, О. В. Наумова, Б. П. Сандомирский

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков,  
Харьковский национальный медицинский университет МЗ Украины

## IMPACT OF PREPARATIONS OF FETOPLACENTAL ORIGIN ON THE WOUNDS HEALING

G. A. Kovalev, I. O. Ishchenko, O. V. Naumova, B. P. Sandomirskiy

Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine, Kharkov,  
Kharkov National Medical University

Заживление ран — комплексный процесс, в котором отдельные клетки интегрированы в сложный механизм саноогенеза, реализуемый на разных уровнях организации живой материи. Это обуславливает перспективность применения в лечении ран средств регенеративной медицины, в том числе препаратов фетоплацентарного происхождения [1, 2]. Системная терапия, направленная на стимуляцию заживления ран, всегда привлекала внимание клиницистов, однако на практике средства регенеративной медицины используют недостаточно.

Ткани фетоплацентарного происхождения содержат большое количество активаторов регенерации и дифференцировки: факторы роста фибробластов и нервных волокон, фактор, стимулирующий рост макрофагальных и эритроидных колоний, а также антипролиферативные цитокины, предотвращающие клеточную и системную гиперстимуляцию [2, 3]. Кроме того, в них содержатся стадиоспецифические белки и пептиды, способные стимулировать иммунокомпетентные клетки [2, 4].

Однако в связи с недостаточным количеством экспериментальных исследований вопрос о перспективах использования препаратов, содержащих БАВ фетоплацентарного происхождения, в системной терапии ран не решен.

Целью исследования была морфологическая характеристика холодовых ран при применении ЭП или КСКК.

### Реферат

Изучены возможности использования препаратов, содержащих биологически активные вещества (БАВ) фетоплацентарного происхождения, в системной терапии ран. Проведено сравнение морфологических характеристик холодовых ран при применении экстракта плаценты (ЭП) и криоконсервированной сыворотки кордовой крови (КСКК). Отмечено их выраженное стимулирующее влияние на заживление ран благодаря улучшению микроциркуляции в тканях, граничащих с зоной криодеструкции, стимуляции местных иммунных процессов, активации образования грануляционной ткани и эпителизации раневого дефекта. Терапевтический эффект КСКК более выражен, чем ЭП. Полученные результаты являются обоснованием применения БАВ фетоплацентарного происхождения в комплексном лечении ран.

**Ключевые слова:** раны; системная терапия; экстракт плаценты; криоконсервированная сыворотка кордовой крови; эксперимент.

### Abstract

Possibilities of application of preparations, containing biologically active substances (BAS) of fetoplacental origin, in systemic therapy of the wounds, were analyzed. Comparison of morphological characteristics of the cold wounds while application of placental extract (PE) and cryopreserved serum of the cord blood (CPSCB) was done. The pronounced stimulating impact on the wounds healing due to improvement of microcirculation in tissues, bordering upon the cryodestruction zone, the local immune processes stimulation, activation of the granulation tissue and epithelial wound defect formation were noted. Therapeutic effect of CPSCB is more significant than that of PE. The data obtained serve as a background for the BAS of fetoplacental origin application in complex treatment of the wounds.

**Keywords:** wounds; systemic therapy; extract of placenta; cryopreserved serum of the cord blood; experiment.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на 60 крысах — самцах "Сфинкс" массой тела 200 — 230 г в соответствии с требованиями комитета по биоэтике ИПКиК НАН Украины, согласованными с директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза [5]. Применяли аппликатор диаметром 8 мм, который охлаждали жидким азотом (температура — 195 °С, экспозиция 60 с), холодовые раны моделировали под поверхностным наркозом на латеральной поверхности бедра. В качестве источника БАВ использовали медицинский

препарат ЭП и КСКК. Животные разделены на группы по 10 особей в каждой. Животным контрольной группы (КГ) вводили изотонический раствор натрия хлорида ("Биофарма", Украина); группы сравнения (ГС) — ЭП ("Юрия—Фарм", Украина); экспериментальной группы (ЭГ) — КСКК (предоставлена низкотемпературным банком ИПКиК НАН Украины). Схема введения соответствовала инструкции к применению медицинского иммунобиологического препарата "Криоцелл—криокорд" (ГП "Межведомственный научный центр криобиологии и криомедицины НАН, АМН и МЗ Ук-

раины"), содержащего сыворотку кордовой крови. Инъекции начинали с 3-х суток после криодеструкции, через день, по 0,1 мл/кг массы тела, внутримышечно на протяжении 9 сут.

Для гистологического исследования забирали ткани, иссеченные из зоны криовоздействия, с захватом интактных тканей. Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, осуществляли проводку в спиртах, заливали в парафин, срезы толщиной 5–6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином [6]. Для объективизации результатов исследования применяли морфометрический метод, с помощью которого определяли глубину зоны некроза и толщину зоны регенерата [7].

Статистическая обработка проведена с помощью пакета программ Excel 2003 (Microsoft, США), SPSS v.10.0 (SPSS Inc., США). Использовали непараметрический критерий Манна–Уитни ( $p < 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На 7-е сутки эксперимента у животных КГ в зоне криовоздействия преобладали признаки первой фазы раневого процесса. Отмечены выраженные циркуляторные нарушения, формирование обширной зоны ишемического некроза эпидермиса, дермы, гиподермы и мышечной ткани, отграниченной от окружающих тканей лейкоцитарным валом с примесью макрофагов. В пограничной с зоной некроза области циркуляторные нарушения обуславливали дистрофические изменения тканей с образованием очагов некроза стромы дермы. По краям раны определяли наплыв эпителия, в котором выявляли дистрофические процессы (гиперкератоз, паракератоз, вакуольная дистрофия, спонгиоз) что, по нашему мнению, связано с нарушением трофики новообразованного эпидермиса вследствие дисциркуляторных изменений.

На 14-е сутки в изучаемой зоне наблюдали положительную динамику репаративного процесса — уменьшение объема некротизированных тканей, продолжение реге-

нерации эпидермиса, образование грануляционной ткани, то есть преобладание второй фазы раневого процесса. В прилежащей к зоне криодеструкции области сохранялись очаговые пролиферативно—дистрофические изменения эпидермиса и вторичные деструктивно—воспалительные нарушения.

Поскольку в работе использовали животных без шерстного покрова, эпителизация ран была краевой, что приближало экспериментальную модель к аналогичной патологии у человека. После криодеструкции погибшие ткани оставались на месте, для очищения холодových ран от некротических масс требовалось достаточно много времени. Это обуславливало длительные сроки заживления холодových ран у крыс КГ.

У животных ГС на 7-е сутки эксперимента в зоне криотравмы наблюдали морфологические признаки параллельно текущих фаз раневого процесса — травматическое воспаление с формированием зоны коагуляционного некроза тканей и новообразование грануляционной ткани с регенерацией эпидермиса. Тем не менее, по сравнению с КГ раны заживали лучше. Так, в ГС наблюдали достоверное уменьшение глубины зоны некроза (в 1,2 раза), уменьшение выраженности нейтрофильной и увеличение — макрофагально—фибробластической реакции с формированием в 50% наблюдений непрерывного широкого пласта грануляционной ткани, от-

граничивавшего зону некроза от подлежащих тканей (табл. 1).

Толщина зоны регенерата превышала таковую в КГ в 2 раза (табл. 2).

Регенерирующий эпидермис, в отличие от КГ, характеризовался уменьшением количества и размеров очагов гиперплазии и гипертрофии клеток с наличием в их основании островков молодой грануляционной ткани. Сохранившиеся в пограничных зонах дистрофические изменения эпидермиса, очаговые некробиотические и некротические изменения дермы, мышечных и нервных волокон по сравнению с КГ, выявляли реже, они были ограниченными. По—видимому, это обусловлено уменьшением степени гипоксии тканей вследствие ускорения неоваскулогенеза, что согласуется с данными других исследований об увеличении количества капилляров в тканях (относительно возрастной нормы) при введении криоконсервированного ЭП старым животным [8].

На 14-е сутки отмечена положительная динамика процессов заживления с преобладанием второй фазы раневого процесса — новообразование соединительной ткани и регенерация эпителия. По сравнению с КГ, значительно реже выявляли гнойно—некротические осложнения (в 50% наблюдений — в ГС, в 100% — в КГ). Сформирован пласт молодой соединительной ткани, отмечена ее активная эпидермизация. По сравнению с КГ, толщина зоны

Таблица 1. Глубина зоны некроза

Группа животных	Величина показателя, мкм в сроки наблюдения, сут ( $\bar{x} \pm m$ )	
	7	14
КГ	2049,63 ± 29,85	721,83 ± 36,13 <sup>α</sup>
ГС	1749,98 ± 13,97*	529,12 ± 23,30* <sup>α</sup>
ЭГ	1655,28 ± 11,42* <sup>v</sup>	420,67 ± 20,04* <sup>vα</sup>
Примечание.	Различия показателей достоверны по сравнению с таковыми: * — в КГ; <sup>v</sup> — в ГС; <sup>α</sup> — на 7-е сутки наблюдения ( $p < 0,05$ ). То же в табл. 2.	

Таблица 2. Толщина зоны регенерата

Группа животных	Величина показателя, мкм в сроки наблюдения, сут ( $\bar{x} \pm m$ )	
	7	14
КГ	324,80 ± 3,60	897,51 ± 37,49 <sup>α</sup>
ГС	657,75 ± 28,10*	1123,01 ± 47,21* <sup>α</sup>
ЭГ	748,22 ± 16,09* <sup>v</sup>	1290,41 ± 53,29* <sup>vα</sup>

регенерата была в 2,3 раза больше. Процесс эпидермизации был более активным, очаговые пролиферативные и дистрофические изменения эпидермиса менее выражены.

У животных ЭГ на 7—е сутки эксперимента признаки травматического воспаления были выражены в меньшей степени, чем в других группах. При этом, хотя по сравнению с КГ глубина зоны некроза в ЭГ, как и в ГС, была в 1,2 раза меньше, различия показателей статистически значимо различались. Отмечено активное течение второй фазы раневого процесса с формированием в 50% наблюдений непрерывного широкого пласта грануляционной ткани, отграничивавшего зону некроза от подлежащих тканей. Более активное образование грануляционной ткани подтверждено результатами измерения толщины зоны регенерата, которая в 2,3 раза превышала таковую в КГ.

Как и в других группах, отмечали краевую эпителизацию раневого дефекта. Дистрофические изменения эпидермиса выявляли реже, чем в других группах. В пограничных с зоной некроза участках наблюдали послойное строение дермы, уменьшение выраженности циркуляторных нарушений, что, по—видимому, и было причиной меньшей выраженности некроза стромы. Вместе с тем, в указанных зонах сохранялись очаги дистрофии и некробиоза мышечных и нервных клеток.

На 14—е сутки морфологические изменения тканей в области криовоздействия характеризовались в 80% наблюдений формированием непрерывной зоны регенерата. Продолжалась активная эпидермизация раневого дефекта. Как и в ГС,

отмечено уменьшение объема некротизированных тканей, однако глубина некроза была меньше, чем в других группах. Так, применение КСКК способствовало уменьшению этого показателя в 1,7 раза, ЭП — в 1,4 раза. Более быстрое удаление некротизированных тканей сопровождалось увеличением объема грануляционной ткани. Как и в ГС, отмечено достоверное увеличение толщины зоны регенерата по сравнению с таковой в КГ. При этом, показатели в ЭГ были достоверно выше, чем в ГС. Применение КСКК способствовало увеличению этого показателя в 1,4 раза, ЭП — в 1,3 раза. В пограничных с зоной регенерата тканях сохранялись дистрофические изменения, в 20% наблюдений обнаружены небольшие очаги некроза стромы, которые в КГ наблюдали у всех животных, в ГС — у 50%.

Полученные результаты согласуются с данными о том, что применение БАВ плаценты способствует уменьшению нейтрофильной и увеличению макрофагально—фибробластической реакции в очаге воспаления, что сопровождается ограничением альтеративных и активизацией репаративных процессов [9]. По нашему мнению, терапевтический эффект ЭП и КСКК обусловлен системным влиянием комплекса БАВ фетоплацентарного происхождения. Применение ЭП или КСКК способствовало более быстрому очищению ран от некротизированных тканей, уменьшению продолжительности их заживления. Посредством каких регуляторных систем достигаются эти эффекты, неизвестно. Можно предположить, что ЭП и КСКК оказывают модулирующее влияние на нейроэндокринную

и иммунную регуляцию раневого процесса, создавая, таким образом, благоприятный фон для адекватного течения процессов саногенеза. Косвенным подтверждением такого предположения является улучшение микроциркуляции в тканях, граничащих с зоной криодеструкции, стимуляция местных иммунных процессов, активация образования грануляционной ткани и эпителизации раневого дефекта.

Принимая во внимание сходные результаты применения КСКК и ЭП и учитывая их сходную природу, можно предполагать, что механизмы реализации их терапевтического влияния также аналогичны. Более выраженная эффективность КСКК, вероятно, обусловлена более высоким содержанием в ней БАВ и более широким их спектром.

Таким образом, системное введение ЭП или КСКК оказывает выраженное стимулирующее влияние на заживление холодных ран. Ускорение заживления достигается благодаря улучшению микроциркуляции в тканях, граничащих с зоной криодеструкции, стимуляции местных иммунных процессов, активации образования грануляционной ткани и эпителизации раневого дефекта. Терапевтический эффект КСКК выражен в большей степени, чем ЭП.

Полученные результаты являются обоснованием к применению БАВ фетоплацентарного происхождения в комплексе лечения ран. Перспективой дальнейших исследований может быть исследование образования и созревания соединительной ткани при введении ЭП и КСКК на модели холодных ран.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Mao A. Regenerative medicine: Current therapies and future directions / A. Mao, D. Mooney // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2015. — Vol. 112, N 47. — P. 14452 — 14459.
2. Enhanced anti-inflammatory effects of  $\gamma$ -irradiated pig placenta extracts / K. Kim, J. Heo, J. Yoon [et al.] // Korean J. Food Sci. Anim. Resour. — 2015. — Vol. 35, N 3. — P. 293 — 298.
3. Greenberg D. Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and stroke / D. Greenberg, K. Jin // Cell. Mol. Life Sci. — 2013. — Vol. 70, N 10. — P. 1753 — 1761.
4. Kaji E. Gene and stem cell therapies / E. Kaji, M. Leiden // J. A. M. A. — 2001. — N 285. — P. 545 — 550.
5. Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes // Offic. J. Eur. Union. — 2010. — L 276. — P. 33 — 79.
6. Коржевский Д. Э. Основы гистологической техники / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. — СПб.: СпецЛит, 2010. — 95 с.
7. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия / Г. Г. Автандилов. — М.: Медицина, 1990. — 384 с.
8. Влияние криоконсервированного экстракта плаценты на морфофункциональные показатели лабораторных животных при общем охлаждении / А. К. Черемской, О. С. Прокопюк, Г. И. Губина—Вакулик [и др.] // Вісн. Харк. нац. ун—ту ім. В. Н. Каразіна. Сер. Біологія. — 2006. — Вип. 3, № 729. — С. 232 — 235.
9. Вплив кріоекстракту плаценти на клітинні реакції вогнища запалення і периферичної крові / В. І. Шепітько, Т. М. Юрченко, М. О. Клименко [та ін.] // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Укр. мед. стомат. академії. — 2004. — Т. 4, № 1(7). — С. 31 — 37.