

УДК 616.5-003.93:615.36:616.001.19-092.4  
© Колектив авторів, 2009

## ОСОБЛИВОСТІ РЕГЕНЕРАЦІЇ ШКІРИ ПІД ВПЛИВОМ ЕКСТРАКТІВ ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ ПРИ ХОЛОДОВІЙ ТРАВМІ У ЩУРІВ

Шиндер А.В.<sup>1</sup>, Єрмакова Н.Ю.<sup>1</sup>, Синчикова О.П.<sup>1</sup>, Сандомирський Б.П.<sup>1</sup>, Бизов В.В.<sup>2</sup>, Гальченко С.Є.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м.Харків; <sup>2</sup>Комунальний заклад охорони здоров'я міська клінічна лікарня № 13

**Шиндер А.В., Єрмакова Н.Ю., Синчикова О.П., Сандомирський Б.П., Бизов В.В., Гальченко С.Є.** Особливості регенерації шкіри під впливом екстрактів тваринного походження при холодовій травмі у щурів // Український морфологічний альманах. – 2009. – Том 7, №3. – С. 109-112.

В роботі показано, що загоєння холодкових ран шкіри у щурів Вістар відбувається більш швидкими темпами, ніж у безшерстих щурів Сфінкс. Введення екстракту селезінки свиней або підмору бджіл прискорює регенерацію епітелія та утворення в дермі похідних шкіри в порівнянні з контрольними групами. При цьому ефективність екстракту селезінки вища.

**Ключові слова:** холодова рана, загоєння, екстракт.

**Шиндер А.В., Єрмакова Н.Ю., Синчикова О.П., Сандомирський Б.П., Бизов В.В., Гальченко С.Є.** Особенности регенерации кожи под влиянием экстрактов животного происхождения при холодовой травме у крыс // Український морфологічний альманах. – 2009. – Том 7, №3. – С. 109-112.

В работе показано, что заживление холодковых ран кожи у крыс Вистар происходит более быстрыми темпами, чем у бесперстных крыс Сфинкс. Введение экстракта селезенки свиней или подмора пчел ускоряет регенерацию эпителия и образование в дерме производных кожи по сравнению с контрольными группами. При этом эффективность экстракта селезенки выше.

**Ключевые слова:** холодковая рана, заживление, экстракт.

**Shinder A.V., Yermakova N.Yu., Synchykova O.P., Sandomirsky B.P., Byzov V.V., Galchenko S.Ye.** Skin regeneration peculiarities under the effect of extracts of animal origin at cold trauma in rats // Український морфологічний альманах. – 2009. – Том 7, №3. – С. 109-112.

In our research we have demonstrated that the healing of skin cold wounds proceeds more rapidly in Wistar rats than in hairless Sphinx ones. The introduction of pig spleen extract or dead bees accelerates the epithelium regeneration and formation of skin derivatives in derma compared to the control groups. At the same time the spleen extract efficiency is higher.

**Key words:** cold trauma, healing, extract.

**Вступ.** Хірургічне лікування новоутворень шкіри часто виконується шляхом кріодеструкції пухлин. Такі новоутворення можуть знаходитися на відкритих частинах тіла (обличчя, шия) або волосистій частині голови. Крім того, онкологічні захворювання, гормоно- та хімотерапія призводять до розвитку імунодефіцитних станів, при яких загоєння ран утруднене [3, 4]. При такій локалізації холодкових ран бажано не тільки прискорити та нормалізувати процес їх загоєння, але і досягти відповідного косметичного ефекту [2]. Для вирішення цих задач все частіше звертається увага на субстанції ендогенного або природного [7, 10], в тому числі і тваринного походження [1, 6, 9], які можуть бути використані з метою стимуляції та нормалізації процесів репаративної регенерації. Також відомо, що волосяні фолікули можуть бути центрами регенерації дерми при термічних травмах, адже матрикс волосяних фолікул складається з плюрипотентних клітин з високою мітотичною активністю. Отже, особливості загоєння ран можуть залежати від наявності або відсутності в шкірі волосяних фолікул.

**Мета роботи-** вивчити особливості загоєння холодкових ран у щурів Вістар та безшерстих щурів Сфінкс при застосуванні екстрактів тваринного походження.

**Матеріали та методи дослідження.** Експерименти проведені відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених II Національним конгресом з біоетики (2004 р, Київ, Україна) і узгоджених з положеннями «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 1985).

Холодову травму шкіри моделювали у 18 щурів лінії Вістар і 18 безшерстих щурів Сфінкс (Hairless) масою 190 - 210 г мідним аплікатором діаметром 10 мм, охолодженим в рідкому азоті, експозиція - 60 сек.. У дослідних щурів Вістар видаляли шерсть в області стегна під поверхневим ефірним наркозом. Із щурів Вістар та Сфінкс було сформовано по три рівноцінні групи: контрольні з холодовою травмою, яким вводили фізіологічний розчин (рана), з холодовою травмою та введенням екстракту селезінки свиней (ЕСС); з холодовою травмою та введенням екстракту підмору бджіл (ЕПБ).

Одержання ЕСС проводили за методом [8], а ЕПБ - екстракцією бджолиного підмору в апараті Соклета та очищували від ліпофільних компонентів. Екстракти вводили щурам в черевну порожнину по 1 мл один раз на добу. Концентрація пептидів в ЕСС становила 100

мкг/мл, а в ЕПБ – 0,25 мг/мл сухого екстракту.

Для гістологічних досліджень фрагменти шкіри фіксували в 10%-му нейтральному формаліні з подальшою заливкою в парафін. Одержані з парафінових блоків зрізи завтовшки 6-8 мкм забарвлювали гематоксиліном і еозином для отримання оглядових гістологічних препаратів. Для електронно-мікроскопічного дослідження шкіри використовувалися її фрагменти, які спочатку фіксували протягом 2 год у 2%-му розчині глутарового альдегіду, відмивали фосфатним буфером і постфіксували в 1%-му розчині чотириокису осмію. Після обезводнення спиртами зростаючої концентрації шматочки тканини просочували сумішшю епон-аралдіт. Ультратонкі зрізи контрастували насиченим водним розчином ураніацетату і розчином цитрату свинцю по Рейнольдсу [5]. Ультраструктуру клітин шкіри досліджували за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-125К при прискорюючій напрузі 75 кВ, забезпеченого системою знімання і аналізу зображення САІ - 01А (АО "SELMP", м. Суми на основі ССD камери DX- 2 і пакету програм фірми "КАРРА", Німеччина).

**Результати та їх обговорення.** На 3-ю добу експерименту в препаратах із зони кріотравми у всіх тварин виявляється повна десквамація шарів епідермісу. У самій дермі спостерігається виражений набряк, повнокрів'я венул, інфільтрація лейкоцитами. Основна речовина гомогенна, колагенові волокна не визначаються, сосочковий і сітчастий шари шкіри не диференціюються. У підшкірній жировій клітчатці виявляється лейкоцитарна інфільтрація, яка виражена більшою мірою на межі з власними м'язами шкіри.

На 7-му добу в контрольних групах щурів виявляється проліферація епітеліальних клітин з формуванням молодого пласта, що наповзає на раневу поверхню від країв рани. Вертикальна анізоморфність клітин в наповзаючому епітеліальному пласті не виражена.

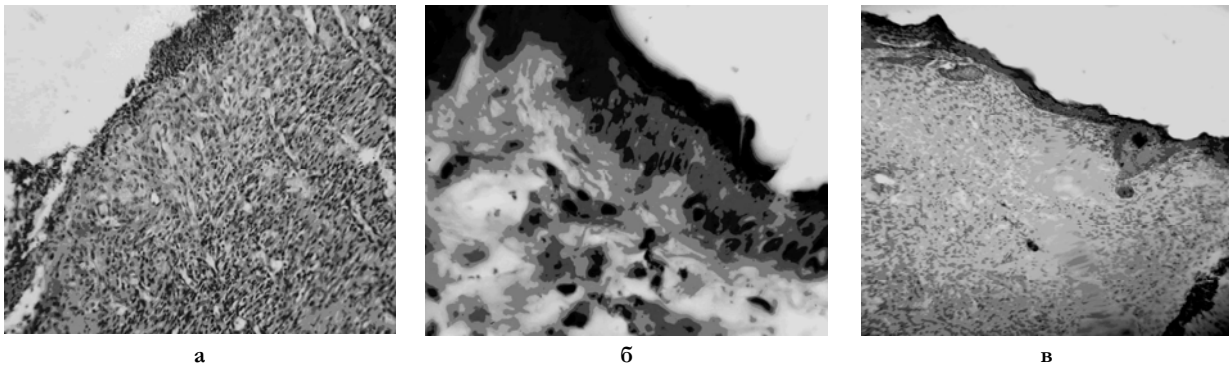
Сосочковий і сітчастий шари дерми не відновили свою структуру. Зберігається виражена дифузна інфільтрація дерми поліморфноядерними лейкоцитами.

У препаратах шкіри тварин, яким вводили ЕСС, на цей строк спостерігається проліферація епітеліоцитів по краю рани. Вертикальна стратифікація шарів наповзаючого пласта не виражена. Епітеліальні клітини розрізняються за розмірами і формою. Зустрічаються овальні, витягнуті, а в зоні, близькій до здорової тканини, відбувається диференціювання шарів новоутвореного епідермісу. Спостерігається відновлення сальних залоз, а у волосяних фолікулах щурів лінії Вістар виявляється проліферація епітелію. У сосочковому і сітчастому шарах дерми переважають клітини фібробластичного ряду. Причому процес репарації у щурів лінії Вістар виражений більш активно.

У тварин, яким вводили ЕПБ джерелом епітеліального пласта є базальні клітини багатопарового епітелію краю рани, а також клітини епітелію фолікулів волосся (щери Вістар) і сальних залоз. Зберігається гіперемія судин. Набряк зменшується, але лейкоцитарна інфільтрація зберігається.

При гістологічному дослідженні препаратів шкіри на 14-у добу було встановлено, що в контрольних групах тварин спостерігається утворення епітеліального пласта, грануляційної тканини. Характерний для цього строку гістологічний препарат наведено на рис 1а.

В регенераті у країв рани базальні клітини епітелію набувають характерної для них призматичної форми. Новоутворений епітеліальний пласт потовщений за рахунок підвищення щільності клітин у всіх шарах, але переважно в середньому. У регенераті визначаються сформовані волосяні фолікули (Вістар), а також сальні залози. Відновлення межі сосочкового і сітчастого шарів шкіри до цього терміну не відбулося, сосочки у базального шару епітелію ледве намічені.



**Рис. 1.** Гістологічна будова шкіри на 14-у добу експерименту; а – щури Вістар, контроль, б – щури Вістар, введення ЕСС, в – щури Сфінкс, введення ЕСС. Забарвлення гематоксиліном і еозином, Зб. х 100.

У гістологічних препаратах шкіри тварин, яким вводили ЕСС, край пошкодження ви-

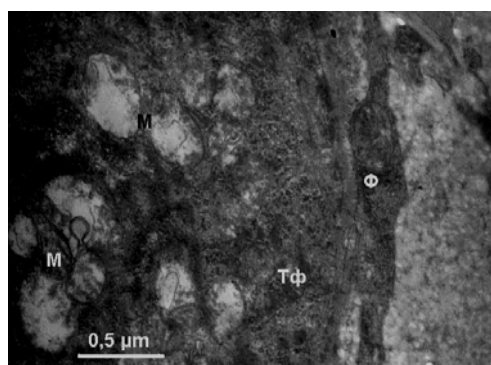
значається новоутвореним безперервним епітеліальним пластом з чітким диференціюван-

ням шарів (рис 1б, в). Зона травми заповнена рихлою сполучною тканиною, в якій виявляються придатки шкіри. При цьому у щурів Вістар ознаки регенерації були виражені більшою мірою - в регенераті у краю рани базальні клітини прилеглого до рани епітелію набули характерну для них призматичну форму. У регенераті дерми визначаються сформовані волосяні фолікули з ознаками росту шерсті (Вістар), а також сальні залози. Новоутворена грануляційна тканина містить велику кількість судин. Однак, якщо у щурів Вістар ознаки лейкоцитарної інфільтрації відсутні, то у щурів Сфінкс вони інколи відмічаються.

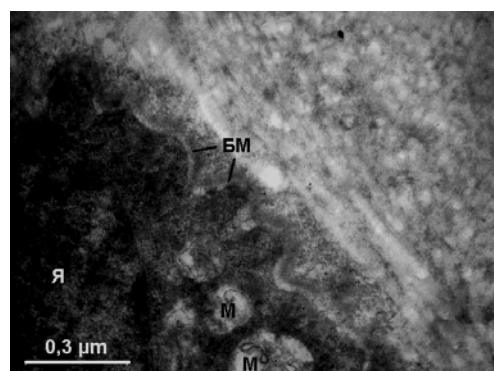
При введенні тваринам ЕПБ в регенераті у краю рани базальні клітини прилеглого до рани епітелію набули характерної для них призматичної форми. Новоутворений епі-

телій потовщений за рахунок збільшення клітин в його середніх шарах. У регенераті визначаються сформовані волосяні фолікули без ознак росту шерсті (Вістар), а також одиничні сальні залози. Відновлення межі сосочкового і сітчастих шарів шкіри до цього терміну не відбувається. У щурів Сфінкс спостерігається осередкова лімфоцитарна інфільтрація.

При електронномікроскопічному дослідженні шкіри контрольних тварин на 14-ту добу відмічається розпушення і фрагментація базальної мембрани епідермісу, а також наявність мітохондрій з сильно просвітленим матриксом і модифікацією крист в клітинах базального шару (рис. 2). У сітчастому шарі дерми у цих тварин інтенсивної васкуляризації не спостерігається.



а



б

**Рис. 2.** Ультраструктура клітини базального шару епідермісу на 14-ту добу експерименту у контрольних щурів: а – Вістар, б – Сфінкс. Позначення: М – мітохондрії, Тф – тонофіламенти, Ф – фібробласт, БМ – базальна мембрана, Я – ядро.

При введенні ЕСС ультраструктура епідермісу, сосочкового і сітчастих шарів дерми в периферичних частинах зони кріопшкодження практично відповідає нормі. Епідерміс представлений всіма типовими шарами: базальним, шипуватим, зернистим і роговим. Клітини базального шару лежать безпосередньо на базальній мембрані, утворюючи довгі вирости у напрямі сосочкового шару дерми.

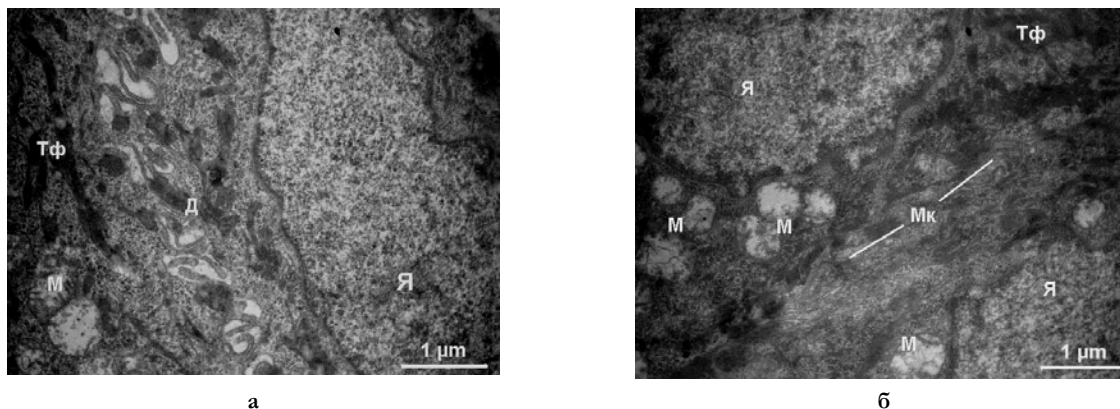
Базальна мембрана безперервна, вона утворена аморфною речовиною середньої електронної щільності. Цитоплазма епітеліоцитів в перинуклеарній частині містить мітохондрії з декількома кристами і електронно-світлим матриксом, а також добре розвинений ендоплазматичний ретикулум і багато вільних рибосом. Тонкі пучки тонофіламентів локалізовані в периферичних частинах клітин. Базальні клітини зв'язані між собою і вищерозміщеними шарами за допомогою десмосом, розташованих на міжклітинних містках.

Шипуватий шар представлений 4-5 рядами великих полігональних клітин, цитолема яких утворює довгі вирости - міжклітинні містки, які формують численні десмосоми. Ядра цих клітин крупні, округлі, каріоплазма рівномірно заповнена в основному еухроматином (рис. 3а).

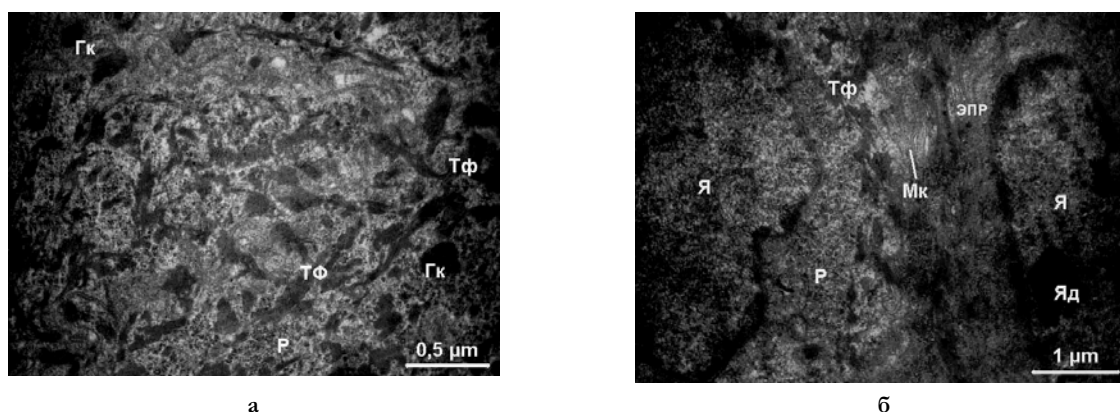
Ядра периферичної локалізації також досить крупні, що свідчить про активний біосинтез білка, характерний для епідермальних клітин. Цитоплазма багата органідами: цистернами ендоплазматичного ретикулуму і вільними рибосомами. Мітохондрії округлі, їх розміри невеликі, вони знаходяться в активному стані, про що побічно свідчить прояснення матриксу (рис. 3б). У цитоплазмі шипуватих клітин пучки тонофіламентів утворюють товсті фібрили, які прикріплюються до цитолеми, часто в місцях утворення десмосом (рис. 3а).

При введенні ЕПБ зернистий шар сформований 3-4 рядами витягнутих уздовж поверхні епідермісу клітин. Ядра їх овальної форми з переважанням еухроматина в каріоплазмі. Кількість цистерн ендоплазматичного ретикулуму і вільних рибосом менша, ніж в цитоплазмі шипуватих клітин. Тонкофібрили трохи розпушені, гранули кератогіаліна в основному не крупні (рис. 4).

Роговий шар представлений без'ядерними плоскими клітинами з електронно-щільною цитоплазмою, заповненою фібрилярними білками (кератогіаліном). Цитолема цих клітин утворює глибокі інвагінації, що забезпечують міцність міжклітинних взаємодій.



**Рис. 3.** Ультраструктура клітин на границі пшуватого та зернистого шарів епідерміса на 14-ту добу експерименту при уведенні шурам ЕСС: : а – Вістар, б – Сфінкс. Позначення: М – мітохондрій, Тф– тонофібрили, Ф – фібробласт, БМ – базальна мембрана, Я – ядро епітеліоцита, Мк – зона міжклітинного контакту, Д- участок міжклітинного контакту, десмосома.



**Рис. 4.** Ультраструктура клітин на границі пшуватого та зернистого шарів епідерміса на 14-ту добу експерименту при уведенні шурам ЕПБ: : а – Вістар, б – Сфінкс. Позначення: М – мітохондрій, Тф– тонофібрили, Я – ядро епітеліоцита, Мк – зона міжклітинного контакту, Гк – гранули кератогіаліна, Р – скупчення вільних рибосом, Яд – ядриншко, ЭПР – ендоплазматичний ретикулум.

**Висновки.** Регенерація шкірного покриву у шурів Вістар відбувається більш швидкими темпами, ніж у шурів Сфінкс. Введення ЕСС або ЕПБ прискорює регенерацію епітелія та утворення в дермі похідних шкіри в порівнянні з контрольними групами, при цьому ефективність ЕСС вища. Досліджені екстракти можуть знайти застосування при розробці препаратів для лікування ран.

Автори висловлюють подяку ст. наук. співр., канд. біол. наук В.В. Воліній, Л.М. Марченко та М.В. Рєпіну за надання консультативної та методичної допомоги при виконанні даної роботи.

#### ЛІТЕРАТУРА:

1. Альбертс А., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. - М.: Мир, 1994. - Т. 2. - С. 417-421.
2. Белоусов А.Е. Рубцы как глобальная проблема пластической хирургии // Анналы пластич. и эстетич. хирургии.-2004.-№ 4.-С.41-42.
3. Буянова А.В. Морфологические основы реализации иммунного ответа в коже // Журнал дерматол. и венерол.- 1999.- № 2.- С. 46-48.
4. Жаврид Э.А., Осинский С.П., Фрадкин С.З. Гипертермия и гипергликемия в онкологии.- К.: Наук. думка, 1987.- 256 с.

5. Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине / Отв. ред. Н. Н. Никольский.- СПб: Наука, 1994.-399 с.
6. Мовчан К.Н., Хижа В.Д., Чичков О.В. и др. Возможности апитерапии при оказании медицинской помощи пострадавшим от ожогов.- СПб: ИИЦ ВМА, 2007. - 256 с.
7. Смирнов С.В., Васильев А.В., Терских В.В. Современные методы клеточной терапии при лечении ожогов // Хирургия.-2003.-№ 12.- С. 58-62.
8. Пат. 64381 А Україна, МПК<sup>7</sup> А61К35/12. Спосіб отримання екстрактів ксеногенних органів / Гальченко С.Є., Шкодовська Н.Ю., Сандомирський Б.П., Грищенко В.І.; ПКіК НАН України.-№ 2003054649; Заявл. 22.05.2003; Опубл. 16.02.2004. Бюл. № 2.
9. Herndon D.N., Spies M. Modern burn care // J. Trauma.-2004.-Vol 57, № 1.-P. 37-41.
10. Kondo S. The roles of cytokines in photoaging // J. Dermatol. Sci.- 2000.- Vol. 23.- P. 30-36.
11. Stephens P.S., Davies K.J., Occleston N. et al. Skin and oral fibroblasts exhibit phenotypic differences in extracellular matrix reorganization and matrix metalloproteinase activity // Br. J. Dermatol.-2001.- Vol. 144.- P.229-237.

Надійшла 13.04.2009 р.  
рецензент: проф. С.М.Смірнов