



Л.Г. Абрафикова, Т.Ф. Петренко, И.П. Высеканцев, В.И. Грищенко

ВЛИЯНИЕ НАТИВНЫХ И КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ АЛЛОФИБРОБЛАСТОВ НА ПРОЦЕССЫ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖНЫХ ЯЗВ У КРЫС

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Ключеві слова: алофіброblastи, клітинна терапія, швидкість загоєння ран.

Ключевые слова: аллофибробласты, клеточная терапия, скорость заживления ран.

Key words: *allofibroblasts, cell therapy, wound repair rate.*

У даній роботі представлено дані щодо впливу нативних та криоконсервованих алофіброblastів на стимулювання процесів загоєння ран у експериментальних тварин. Вивчено динаміку змін показників гострофазових білків у сироватці крові експериментальних тварин.

В данной работе представлены данные по влиянию нативных и криоконсервированных аллофибробластов на стимулирование процессов заживления ран у экспериментальных животных. Изучена динамика изменений показателей острофазовых белков в сыворотке крови экспериментальных животных.

The research demonstrates the data about the possibility of native and cryopreserved allogeneic fibroblasts to stimulate the processes of healing the wounds in animals. The dynamics of the change in the parameters of acute phase proteins in blood serum of experimental animals has been studied.

В настоящее время накоплен существенный опыт по лечению кожных ран с помощью различных физико-химических факторов, лекарственных и гормональных препаратов [9].

За последние два десятилетия появился ряд сообщений о развитии новых медицинских технологий, основанных на применении живых клеточных культур – аллофибробластов. Показано достоверное влияние аллофибробластов на процессы регенерации ран [12].

Большие успехи были достигнуты также в области клинического применения фетальных и эмбриональных клеток. Использование фетальных клеток и тканей оказалось эффективным при лечении длительно незаживающих ран и трофических язв [6,7]. Однако, несмотря на эффективность эмбриональной клеточной терапии, широкое внедрение в практику эмбриональных клеток ограничено, так как существуют серьезные этические и правовые препятствия.

Многообещающие перспективы развития клеточной и тканевой терапии связаны с возможностью использования в качестве исходного материала для восстановления поврежденных тканей и органов аутологических клеток, размноженных вне организма и ретрансплантированных в составе реконструированной ткани.

В Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины была разработана и внедрена технология выращивания фибробластов из кожи человека и экспериментальных животных.

Фибробласты – главный клеточный элемент соединительной ткани, которая составляет строю многих органов, являются важными участниками их морфогенеза и создают условия микроокружения, необходимые для дифференцировки и функционирования специализированных клеток [13]

Фибробласты продуцируют коллаген I и III типов, фибронектин, ламинин, индоген, хондротин-4-сульфат, эпидермальный фактор роста EGF и фактор роста кератиноцитов RGF, которые стимулируют пролиферацию и миграцию кератиноцитов кожи и могут ускорять восстановление по-

раженной дермы. Основной фактор роста фибробластов (bFGF) положительно влияет на рост всех типов клеток в ране, стимулирует продукцию компонентов внеклеточного матрикса фибробластами (фибронектина и коллагена).

ЦЕЛЬ РАБОТЫ – изучение влияния культивированных *in vitro* фибробластов на процессы регенерации кожных язв у экспериментальных животных и сравнение воздействия нативных и криоконсервированных фибробластов на указанные регенерационные процессы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальный раздел работы с животными выполнен на базе вивария ИПК и К НАН Украины. Эксперименты с животными проводили согласно «Загальних принципів експериментів на тваринах», одобрених I Національним конгресом по біоетикі (Київ, 20.09.04 г.), а також в відповідності з положеннями «Європейської Конвенції о захисті позвоночних живих тварин, використовуваних для експериментальних і других наукових цілей» (Страсбург, 1985 г.).

Асептичне запалення шкіри і підшкірної клітчатки моделювали на крысах лінії Wistar шляхом введення в підшкірну клітчатку 0,5 мл 9% розчину уксусної кислоти в область спини. Все оперативне втручання на живих тваринах, включаючи декапітацію, проводили під інгаляційним ефірним наркозом.

Культивування фибробластов шкіри крыс. Забор биоптатов шкіри крыс проводили на внутрішній стороні задньої лапи тварини. Передвартельно видаляли шерсть і місце забору обробляли 70% спиртом. Биоптат поміщали в стерильний розчин Хенкса з антибіотиками (100 ЕД/мл пеніциліну, 100 мг/мл стрептомицину), потім його дрібно нарізали на фрагменти розміром 1-2 мм². Отримані шматочки поміщали в чашки Петри дермальною частиною вниз, додавали культуральну середовище, що містить 90% поживної середовища ДМЕМ і 10% ембріональної телячої сироватки. Чашки Петри з експлантатами інкубували в умовах насичуючої вологості при 37°C з 5% CO₂. При утворенні моношару клітками їх обробляли



смесью раствора Версена с трипсином (4:1) и переносили в культуральные флаконы. Культуру клеток пассировали по мере формирования монослоя. Плотность посева клеток фибробластов составляет $1-2 \times 10^4$ на см^2 поверхности культурального флакона.

Криоконсервирование аллофибробластов. Монослой клеток при помощи смеси раствора Версена и трипсина переводят в суспензионное состояние. Клетки суспендируют в эмбриональной сыворотке в концентрации $2-4 \times 10^6$ кл/мл. К полученной суспензии добавляли равный объем 20% раствора ДМСО, приготовленного на эмбриональной сыворотке. Подготовленную суспензию разливали в криопробирки. После 15-минутной эквilibрации при комнатной температуре клетки замораживали по программе: охлаждение со скоростью $30-40^\circ\text{C}/\text{мин}$ до -28°C , 15-минутная остановка при -28°C с последующим погружением в жидкий азот [10].

Отогрев клеток производили на водяной бане при температуре 41°C в течение 2-3 минут. Суспензию клеток извлекали из криоампулы, переносили в центрифужную пробирку, добавляли 4-5-кратный объем раствора Хенкса и центрифугировали 7-10 мин при 1000 об/мин. Супернатант удаляли и к суспензии клеток добавляли стерильный физраствор.

Разрушение фибробластов. С целью выяснения влияния фибробластов на процессы регенерации раневой поверхности, клеточную суспензию фибробластов в концентрации $1-2 \times 10^6$ в 0,5 мл физиологического раствора подвергали 3 кратному процессу термоциклирования в жидком азоте с последующим ее отогревом на водяной бане при температуре 41°C .

Для нанесения фибробластов на раневую поверхность в качестве иммобилизирующего носителя был использован 3% раствор метилцеллюлозы [1,3]. Суспензию клеток в растворе Хенкса смешивали в равных объемах с метилцеллюлозным гелем, наносили на раны в соотношении $3-5 \times 10^4$ клеток на 1 кв. см.

Изучение влияния аллофибробластов на процессы регенерации кожных язв

Животные на 8 сутки эксперимента (момент формирования язв на кожных покровах) были разделены на 4 группы:

1 группа – процесс заживления язв протекал естественным путем, без лечения;

2 группа – лечение язв с использованием нативных фибробластов;

3 группа – лечение язв с использованием криоконсервированных фибробластов;

4 группа – лечение язв с использованием разрушенных фибробластов.

Динамику изменения площади раневой поверхности определяли методом планиметрии Поповой Л.Н. Планиметрию раны осуществляли до начала лечения, а затем на 7-й, 14-й и 21-й дни эксперимента. Площадь ран рассчитывали при помощи компьютерной программы Axio Vision Rel 4.7.

БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования острофазовых белков воспаления в сыворотке крови экспериментальных животных проводили на базе клинической лаборатории ХГДБ № 16. Определяли содержание церулоплазмينا и гликопротеидов. В исследованиях использовали унифицированные методы лабораторной диагностики [4], приборы и стандартные наборы реактивов фирмы «Филист-Диагностика», контрольные сыворотки фирмы «Филист-Диагностика», Днепропетровск.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено, что заживление язв в контрольной группе (без лечения) проходило медленно, полное заживление наступало на 25-26 сутки (табл. 1).

При использовании нативных фибробластов полное заживление наступало на 21 сутки. С 7 по 14 сутки площадь заживления язвы составляла $64,9 \pm 7,35\%$ и $98,1 \pm 0,29\%$ соответственно, что на $13,26\%$ и $26,4\%$ больше, чем в эти же сроки в группе животных, не получавших лечения.

Таблица 1

Динамика заживления язв при использовании фибробластов

Условия эксперимента	Площадь заживления язв %			
	7 сутки	14 сутки	21 сутки	25 сутки
	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$
I	$51,64 \pm 5,7$	$71,7 \pm 6,7$	$95,4 \pm 0,7$	$99,8 \pm 0,3$
II	$64,9 \pm 7,35^{1,2}$	$98,1 \pm 0,29^{1,2}$	$100,0 \pm 0,00^{1,2}$	$100,0 \pm 0,00^1$
III	$71,57 \pm 4,6^{1,2}$	$98,1 \pm 0,39^{1,2}$	$100,0 \pm 0,00^{1,2}$	$100,0 \pm 0,00^1$
IV	$0,132 \pm 0,04^{1,3}$	$27,48 \pm 3,7^{1,3}$	$65,52 \pm 2,1^{1,3}$	$99,75 \pm 0,05^1$

Примечание: I – контроль, без лечения; II – лечение ран с использованием нативных фибробластов; III – лечение язв с использованием криоконсервированных фибробластов; IV – лечение ран с использованием разрушенных фибробластов; \bar{X} – средняя арифметическая; $S\bar{x}$ – средняя ошибка средней арифметической; ¹ – различия достоверны по сравнению с контролем соответствующих сроков; ² – различия вариантов II и III достоверны по сравнению с вариантом I соответствующих сроков; ³ – различия варианта IV достоверны по сравнению с вариантом I соответствующих сроков.



Таблица 2

Содержание гликопротеидов в сыворотке крови при различных способах лечения язв у лабораторных крыс

Условия эксперимента	Показания гликопротеидов, г/л				
	0 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки	25 сутки
	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$
Интактные	0,34±0,03				
I	0,53±0,02 ¹	0,685±0,023 ¹	0,51±0,03 ¹	0,46±0,026 ¹	0,40±0,03
II		0,49±0,017 ¹	0,40±0,01 ¹	0,33±0,02	
III		0,49±0,01 ¹	0,39±0,02	0,34±0,02	
IV		0,6±0,01 ¹	0,54±0,02 ¹	0,515±0,02 ¹	0,46±0,02 ¹

Примечание: I – контроль, без лечения; II – лечение язв с использованием нативных фибробластов; III – лечение язв с использованием криоконсервированных фибробластов; IV – лечение язв с использованием разрушенных фибробластов; \bar{X} – средняя арифметическая; $S\bar{x}$ – средняя ошибка средней арифметической; ¹ – различия достоверны по сравнению с показателями интактных животных.

Сравнение действия криоконсервированных фибробластов на процесс заживления язв с действием нативных фибробластов не выявило достоверных различий в показателях площади заживления.

Применение разрушенных фибробластов значительно тормозило процессы регенерации язв. В первые 7 суток площадь заживления язв составляла 0,132±0,04%, что в 391,2 раза меньше, чем в контроле; в 491,7 и 542,2 раза меньше, чем при использовании нативных и криоконсервированных фибробластов соответственно. Незначительное сокращение раневой поверхности отмечено на 14 сутки – 27,48±3,7%, на 21 сутки площадь заживления язв составляла 65,52±2,1%, что достоверно не отличалось от показателей заживления язв на 7 сутки при использовании нативных или криоконсервированных фибробластов. Полное заживление язв при использовании разрушенных фибробластов отмечается на 25-26 сутки.

Как известно, раневой процесс сопровождается изменением ряда биохимических показателей крови [4,5]. Главным органом, реагирующим на процессы, протекающие в ране, является печень [8]. Белки, синтезируемые в печени и поступающие в кровяное русло, определяют в известной степени течение воспалительного процесса. Повышение концентрации острофазовых белков связано со стремлением организма к восстановлению нарушенного гомеостаза и созданию условий для репаративных процессов.

Для наблюдения за течением процессов регенерации нами были выбраны несколько медленно реагирующих маркеров острофазового процесса, что позволило судить об эффективности метода клеточной терапии. Одними из реактантов острой фазы являются гликопротеиды и церулоплазмин. Повышение этих острофазовых белков отмечается через 24-48 часов после повреждений тканей различной этиологии [2].

Известно, что концентрация гликопротеидов начинает возрастать через 24 часа от начала воспаления [4,5]. При проведении экспериментов было установлено, что в сыворотке животных контрольной группы к моменту формирования язв уровень гликопротеидов (Гл) возрос в 1,6 раза по сравнению с сывороткой интактных животных (табл.2). Высокий уровень содержания Гл в крови контрольной группы отмечали до 14 суток, к 21 суткам уровень Гл снижался, но не достигал уровня нормы.

При использовании для лечения язв как нативных так и криоконсервированных фибробластов, содержание Гл в крови уже с 7 суток начинало снижаться и к 14 суткам достоверно не отличалось от содержания Гл у интактных животных.

При нанесении на раневую поверхность разрушенных фибробластов динамика изменения Гл в крови животных была аналогична динамике изменения Гл в контрольной группе.

Таблица 3

Содержание церулоплазмينا в сыворотке крови при различных способах лечения язв у лабораторных крыс

Условия эксперимента	Показания церулоплазмينا, мг/л				
	0 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки	25 сутки
	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$
Интактные	278,5±18,4				
I	497,3±25,2	689,3±22,1	539,5±25,3	438,5±26,1	280,2±14,4
II		433,3±22,9	276,5±20,2	279,5±22,0	
III		439,16±27,0	265,8±23,4	266,2±22,3	
IV		649,2±15,9	585,3±15,0	463,0±19,4	394,2±13,1

Примечание: I – контроль, без лечения; II – лечение язв с использованием нативных фибробластов; III – лечение язв с использованием криоконсервированных фибробластов; IV – лечение язв с использованием разрушенных фибробластов; \bar{X} – средняя арифметическая; $S\bar{x}$ – средняя ошибка средней арифметической; ¹ – различия достоверны по сравнению с показателями интактных животных.



Одним из белков острофазового показателя, вовлеченного в процесс заживления ран, является церулоплазмин (Ц). Он имеет большое значение для уменьшения воспалительного процесса. Церулоплазмин устраняет свободные радикалы внеклеточно и может защищать клетки от перекисного окисления липидов, вызванного супероксидом и другими радикалами. Уровень Ц возрастает через 48 часов после начала воспаления [2].

Динамика изменений содержания церулоплазмينا в крови животных контрольной и опытных групп аналогична динамике концентрации Гл.

Полученные данные по динамике острофазовых показателей согласуются с литературными данными о течении раневого процесса [11], где первая фаза (латентная) сопровождается воспалительными реакциями и расплавлением некротических масс. В наших экспериментах на 6-7 сутки с момента формирования язв у экспериментальных животных уровень острофазовых показателей (Гл и Ц) был наиболее высоким.

При естественном заживлении ран полибласты и фибробласты появляются на 6-7 сутки в области ранения [11]. В случае внесения фибробластов на раневую поверхность острофазовые показатели были ниже, чем в контрольной группе, что может свидетельствовать о том, что трансплантированные аллофибробласты берут на себя функцию синтеза веществ, участвующих в процессах регенерации раневой поверхности. Этот факт подтверждают и показатели динамики уменьшения площади ран, сокращение которых происходит значительно быстрее при использовании фибробластов, а также биохимические показатели острофазовых белков и динамика заживления ран при использовании разрушенных фибробластов.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о высокой способности нативных и криоконсервированных фибробластов, трансплантированных в область повреждения тканей, стимулировать процессы заживления ран. Действие криоконсервированных фибробластов на процессы заживления не отличаются от действия нативных фибробластов. Фибробласты, утратившие функциональную

активность, ингибируют процессы заживления ран, в связи с чем при использовании фибробластов для лечения ран различной этиологии следует уделять внимание сохранности клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Роль аллофибробластов в процессах регенерации ран / [Абрафикова Л.Г., Петренко Т.Ф., Коцый С.В., Гончарук Е.И.] // Актуальні проблеми сучасної медицини. – 2009. – Т. 9, вип.4. (28). – С.11-15.
2. Алексеева Н.М. Изменение активности церулоплазмينا в сыворотке крови под воздействием различных факторов // Гигиена и санитария. – 1991; №8. – С. 70-71.
3. Ембріогель для зовнішнього застосування та спосіб його отримання [Гончарук О.І., Коцый С.В., Петренко Т.П. та ін.] / Україна, патент №64540 МПК А61К35/48. Заявл.24.06.03. Опубл.16.02.04. з. №2003065810 Бюл.2. С.4.42
4. Камышиников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М.: МЕДПресс-информ, 2004. – 920 с.
5. Клиническая биохимия. / Под ред. В.А. Ткачука. – 2е изд., испр. и доп. – М.: «Гэотар-Мед». – 2004. – 512 с.
6. Использование фетальных клеток и тканей в лечении поверхностных ран и трофических. – Трансплантация фетальных тканей и клеток. / [Н.Г. Колосов, О.В. Повеценко, А.В. Ефремов и др.] Сб. науч. ст. / Под ред. В.И. Кулакова, Г.Т. Сухих. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1998. – Т.126. – С.128.
7. Перспективы использования фетальных фибробластов человека при лечении ран различной этиологии / [Колокольцева Т.Д., Юрченко Н.Д., Колосов Н.Г. и др.] // Вестн. РАМН. – 1998. – №3. – С. 32-34.
8. Липатов В.А. Патогенез раневого процесса и подходы к лечению гнойных ран // Хирургия. – 2005. – №10. – С. 27-30.
9. Нечаев Э.А. Хирургическая инфекция – клиника, диагностика, лечение: Руководство для военных врачей. – М., 1993. – 296 с.
10. Петренко Т.Ф. Влияние криоконсервирования на морфофункциональные свойства клеток перевиваемых культур. Автореферат дисс... Харьков, 1986, 16 с.
11. Раны и раневая инфекция. Под редакцией М.И. Кузина и Б.М. Костюченко, Москва, «Медицина», 1990, 592 с.
12. Фибробласты и их значение в тканевых реакциях: Обзор литературы / [Скрипкин Ю.К., Кубанова А.А. и др.] // Арх. патологии. – 1991. – № 12 (52). – С. 65-68.
13. Терехов С.М. Фибробласты – основные клетки соединительной ткани. «Цитология», 1981. – Т.6, №23 – С. 717-718.

Сведения об авторах:

Абрафикова Лилия Геннадиевна, ИПК и К НАН Украины, м.н.с. отдела ДХБО при НТ и криоимикробиологии.
Петренко Татьяна Филипповна, ИПК и К НАН Украины, с.н.с. отдела ДХБО при НТ и криоимикробиологии.
Высеканцев Игорь Павлович, ИПК и К НАН Украины, зав. отделом ДХБО при НТ и криоимикробиологии.
Грищенко Валентин Иванович, академик НАН Украины, директор ИПК и К НАН Украины.

Адрес для переписки:

Украина, г. Харьков, ул. Переяславская, 23, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины.
тел. 057-373-31-26, e-mail: cyuo@online.kharkov.ua