

Л.Г. Абрафикова

**Морфологическая оценка процесса заживления экспериментальных кожных язв после внесения криоконсервированных фибробластов**

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

**Ключевые слова:** аллофибробласты, криоконсервирование, кожные язвы, клеточная терапия, метилцеллюлоза.

Представлены результаты экспериментального изучения влияния нативных и криоконсервированных аллофибробластов на процессы заживления кожных язв у беспородных крыс. Показано, что иммобилизованные на метилцеллюлозе фибробласты способствуют более быстрому заживлению кожных дефектов при асептическом воспалении кожи и подкожной клетчатки. Изучены гистологические препараты в процессе заживления экспериментальных язв на 1, 7, 14 и 21 сутки с момента их формирования у крыс, а также после нанесения на раневую поверхность фибробластов на носителе (метилцеллюлоза).

**Морфологічна оцінка процесу загоєння експериментальних шкірних виразок після нанесення криоконсервованих фібробластів**

Л.Г. Абрафикова

Представлено результати експериментального вивчення впливу нативних і криоконсервованих алофібробластів на процеси загоєння шкірних виразок у беспорідних щурів. Показано, що іммобілізовані фібробласти на метилцеллюлозі сприяють швидшому загоєнню шкірних дефектів при асептичному запаленні шкіри й підшкірної клітковини. Вивчено гістологічні препарати в процесі загоєння експериментальних виразок на 1, 7, 14 і 21 добу з моменту їх формування у щурів, а також після нанесення на ранову поверхню фібробластів на носії (метилцеллюлоза).

**Ключові слова:** алофібробласти, криоконсервування, шкірні виразки, клітинна терапія, метилцелюлоза.**Патологія.** – 2010. – Т.7., №3. – С. 113–115**Morphological assessment of healing process of experimental ulcers in rats after application of cryopreserved fibroblasts**

L.G. Abrafikova

The research comprises the results of experimental study of the effect of native allofibroblasts on the processes of healing the skin ulcers in experimental animals. It has been shown that immobilized fibroblasts on methyl cellulose contribute to more rapid and complete healing of dermal defects at aseptic inflammation of skin and subcutaneous fat. Histological preparations in healing dynamics of experimental ulcers to the 1, 7, 14 and 21 days from the moment of formation of experimental pathology in the animals were studied as well as after application to wound surface of allofibroblasts.

**Key words:** allogenic fibroblasts, cryopreservation, skin ulcers, cell therapy, methylcellulose.**Pathologia.** 2010; 7(3): 113–115

Процесс заживления ран различной этиологии представляет собой сложную цепочку взаимосвязанных биологических процессов [3]. Существенный опыт по консервативному лечению ран с помощью различных фармакологических препаратов [4,8] не всегда дает ожидаемый эффект. В связи с этим, исследователи уделяют значительное внимание разработке технологий получения клеточных препаратов и их применению для стимулирования регенеративных процессов и восстановления целостности поврежденных тканей. В большинстве работ авторы использовали или первично культивированные фибробласты, или фибробласты, подвергавшиеся культивированию после криоконсервирования. Вопрос клинического применения криоконсервированных фибробластов непосредственно после отогрева изучен мало [1,9].

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, что не вызывает иммунных реакций отторжения в организме реципиента.

**Цель работы**

Изучение влияния культивированных *in vitro* и криоконсервированных фибробластов на процессы регенерации кожных язв экспериментально смоделированных на беспородных крысах.

**Материалы и методы исследования**

Экспериментальный раздел работы с животными выполнен на базе вивария ИПК и К НАН Украины. Эксперименты с животными проводили согласно «Загальних принципів експериментів на тваринах», одобренными I и II Национальными конгрессами по биоэтике (Киев, 20.09.04 г.), а также в соответствии с положениями «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985 г.).

Асептическое воспаление кожи и подкожной клетчатки моделировали по стандартной методике [5] на беспородных крысах возрастом 4 месяца, весом 170–180 г.

Культуру нативных фибробластов получали из эксплантатов кожи крыс по стандартным протоколам [9].

Фибробласты криоконсервировали в среде 199 с 10% ДМСО по трехэтапной программе замораживания с начальной скоростью 1°C/мин до -40°C; 10°C/мин от -40°C до -80°C с последующим погружением в жидкий азот. Отогрев клеточной суспензии проводили на водяной бане при 41°C в течение 2–3 мин. Концентрация клеток после криоконсервирования составляла  $1 \times 10^6$  кл/мл.

Для нанесения фибробластов на раневую поверхность в качестве носителя использован 3% раствор метилцеллюлозы [2]. В предварительном исследовании показано, что это вещество не оказывает токсического действия на фибробласты.

Суспензии клеток (криоконсервированных и нативных) в растворе Хенкса смешивали в равных объемах с метилцеллюлозным гелем и наносили на раны из расчета  $3-5 \times 10^4$  клеток на  $1 \text{ см}^2$ .

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы STATISTIKA 6.0.

Животные на 7 сутки эксперимента (момент формирования язв на кожных покровах) разделены на 3 группы: I – процесс заживления язв протекал естественным путем; II – лечение язв с использованием нативных фибробластов на метилцеллюлозе; III – лечение язв с использованием криоконсервированных фибробластов на метилцеллюлозе; IV – лечение язв с использованием 1,5% раствора метилцеллюлозы.

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

Приготовление гистологических препаратов из раневой и близлежащей области кожного дефекта проводили по стандартной методике [6] после забора материала на 1, 7, 14, 21 сутки с момента вскрытия язв.

#### Результаты и их обсуждение

Установлено, что заживление язв в контрольной группе проходило достоверно медленней, чем в опытных группах. Полное заживление в контрольной группе наступало на 28 сутки. При использовании нативных и криоконсервированных фибробластов полное заживление язв наступало на 21 сутки. После аппликации 1,5% раствором метилцеллюлозы полное заживление ран наступало на 25 сутки.

По данным морфологического исследования в день самопроизвольного вскрытия кожной язвы у крыс, на микропрепаратах наблюдали обширный как по глубине, так и по протяженности дефект, выполненный некротической массой, с густо инфильтрованными нейтрофильными лейкоцитами. Поверхность дефекта покрывала сукровично-некротическая корка. Кое-где в его глубине видны деструктивно измененные остатки волокон дермы, мышечных волокон, остатки подкожно-жировой ткани.

На пограничных с дефектом участках кожи эпителиальный пласт утолщен, эпидермоциты часто дистрофически изменены. Коллагеновые волокна дермы набухшие. На всем протяжении вне дефекта видна подкожно-жировая клетчатка, а местами и мышечная ткань, с признаками острого воспаления. Сеть кровеносных сосудов в гиподерме резко расширена, полнокровна, наблюдались очаги кровоизлияний.

На 7 день после самопроизвольного вскрытия язвы у крыс контрольной группы кожный дефект оставался достаточно обширным. На поверхности сохранялась сукровично-фибриноидная корка, которая легко отслаивалась. 2/3 дефекта в центральных участках заполнены фибриноидно-некротической массой, обильно инфильтрованной нейтрофильными лейкоцитами. Этот слой без резкой границы переходил в грануляционную ткань, которая занимала 1/3 объема

дефекта. В ней дифференцировались лимфоциты, хаотично расположенные молодые фибробласты, немногочисленные нейтрофильные лейкоциты, макрофаги, мало дифференцированные клетки. Объем клеточного содержимого в новообразованной ткани достаточно велик, а молодых вертикально ориентированных кровеносных сосудов немного. В краевых участках дефекта ширина слоя некротической массы уменьшалась, к ней прилегал пласт грануляционной ткани, с хорошей васкуляризацией, относительно умеренным клеточным содержимым, среди которого наблюдали большое количество клеток фибробластического ряда, уже достаточно упорядоченно ориентированных. В глубоких слоях отмечали процесс волокнообразования. В пограничных с дефектом участках кожи эпидермис оставался утолщенным, коллагеновые волокна дермы были набухшие и повышено эозинофильны.

В подкожно-жировом слое отмечали разные по величине очаги клеточной пролиферации, иногда прослеживалось формирование тяжей, имеющих направленность под дефект. На более отдаленных от дефекта участках кожи, подкожно-жировой слой замещался рыхлой волокнистой тканью, в которой были видны отдельные мелкие очаги нагноения, часто видна лимфо-гистиоцитарная инфильтрация мышечной ткани. Сосудистая реакция слабо выражена, по сравнению с предыдущим периодом наблюдения. Заметных проявлений контракции не отмечено.

На 14 день после самопроизвольного вскрытия язвы протяженность дефекта на микропрепаратах уменьшалась, хотя глубина его оставалась достаточной. Поверхность чаще была прикрыта коркой. В центральных отделах язвы сохранялся большой некротический слой и прилежащая к нему незрелая грануляционная ткань. Ближе к краям язвы объем некротической массы уменьшался, под ним видна более зрелая грануляционная ткань. Краевой участок дефекта представлен уже достаточно зрелой грануляционной тканью в поверхностных и волокнистой тканью в донных слоях.

В пограничных с дефектом участках кожи отмечено воспалительное разрастание эпидермиса. Краевая эпителизация дефекта достаточно умеренна. В эпителиальном пласте не прослеживалась четкая дифференцировка слоев клеток.

Видна небольшая контракция – инвагинация краев здоровой кожи в краевые зоны дефекта. В подкожно-жировой клетчатке вне зоны дефекта местами сохранена воспалительная реакция. На 21 день в контрольной группе крыс у 50% животных поверхность дефекта полностью закрыта утолщенным эпителиальным пластом с дифференцировкой слоев. На поверхности бывшего дефекта сохраняется корка. Эпителиальный пласт непрочный, легко отслаивается от подлежащей ткани. У остальных крыс новообразованный эпителий не полностью прикрывал поверхность, новая ткань под ним менее зрелая.

К 28 дню после самопроизвольного вскрытия язвы при спонтанном заживлении ее во всех случаях на месте бывшего дефекта определялся хорошо сформированный волокнистый рубец, прикрытый

утолщенным эпителиальным пластом с отчетливой дифференцировкой слоев, вплоть до рогового слоя. В одном случае в самом поверхностном участке рубца видны небольшие остатки тканевого детрита.

В опытной группе 2 после аппликаций на язвенную поверхность метилцеллюлозы с нативными фибробластами к 7 дню после самопроизвольного вскрытия язвенный дефект был достаточно обширен. В центральных отделах сохранен относительно умеренный по ширине фибриноидно-детритный слой. К нему прилегает умеренная по степени зрелости грануляционная ткань. В ней достаточно новообразованных вертикально ориентированных кровеносных сосудов, по краям и в глубине видны признаки волокнообразования. Отмечен умеренный краевой рост эпителия. В пограничных с дефектом участках кожи в подкожно-жировой клетчатке снижена, сравнительно со спонтанно заживающими язвами, воспалительная клеточная и сосудистая реакция. Контракция здоровой кожи в область дефекта умеренна.

На 14 день после нанесения нативных фибробластов на МЦ геле у 4 из 6 крыс отмечено полное заживление язвенного дефекта. Ткань, заполняющая бывший дефект, в центральных отделах сохраняет умеренно васкуляризованный и клеточный характер. Эпителиальный пласт утолщен, дифференцировка слоев в нем отчетливая. У остальных крыс сохранен небольшой дефект с активным ростом эпителия и достаточно зрелым характером грануляционной ткани практически во всех областях дефекта.

К 21 дню у 100% животных язвенный дефект кожи заживал, заполняющая его ткань напоминала дерму.

В опытной группе 3 после аппликаций на язвенную поверхность метилцеллюлозы с криоконсервированными фибробластами фибриноидно-некротический слой в области дефекта на 7 день после ее самопроизвольного вскрытия и начала лечения достаточно уменьшался, по сравнению с контрольной группой. Под ним определялась умеренно зрелая грануляционная ткань. В ее донных отделах отмечались признаки волокнообразования. Отчетлив краевой рост эпителия.

К 14 дню от начала вскрытия язв и лечения метилцеллюлозой с криоконсервированными фибробластами эпителизация поверхности дефекта практически завершена (у 84% крыс). Видна контракция здоровой кожи в области дефекта. Ткань, заполняющая область дефекта, в случае неполной эпителизации поверхности, волокнистая в донных и краевых отделах, сохраняет определенную васкуляризацию и клеточность в его центральных зонах. При полной эпителизации более отчетлив повсеместный волокнистый характер молодой ткани. Новообразованный эпителий утолщен, в нем отчетлива дифференцировка слоев.

На 21 день у всех крыс отмечали полное заживление

дефекта с формированием волокнистого рубца. В нем виден центральный клиновидный участок, на котором превалировал рыхлый волокнистый характер ткани, а остальные зоны имели характер строения дермы.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о высокой способности культуры нативных и криоконсервированных фибробластов, трансплантированных в область повреждения тканей, стимулировать процессы заживления ран. Нативные и криоконсервированные фибробласты на носителе метилцеллюлозе позитивно влияли на процесс заживления асептических кожных язв у беспородных крыс. Нанесение фибробластов на язву способствовало интенсивному развитию грануляционной ткани. Область дефекта быстрее очищалась от некротических масс, что приводило к ускорению созревания новообразованной ткани. Быстрее и интенсивнее происходила эпителизация дефекта. Все это способствовало полному заживлению язв у 67% животных уже на 14 день от начала аппликаций (при спонтанном заживлении – на 21 день у 50% крыс). При естественном заживлении ран процесс грануляции завершался к 25–27 суткам. Отсутствие различий в стимулирующем действии на репаративные процессы нативных и криоконсервированных фибробластов позволяют рекомендовать применение в клинической практике криоконсервированных фибробластов непосредственно после отогрева, без дополнительного культивирования.

#### Литература

1. Абрафикова Л.Г. Роль аллофибробластов в процессах регенерации ран / Абрафикова Л.Г., Петренко Т.Ф., Кошый С.В., Гончарук Е.И. // Актуальні проблеми сучасної медицини. – 2009. – Т. 9, Вип. 4 (28). – С. 11–15.
2. Пат. №64540 Україна, МПК А61К35/48. Препарат Ембріогель для зовнішнього застосування та спосіб його отримання / Гончарук О.І., Кошый С.В., Петренко Т.П., Гапон А.А., Ревенко О.Б., Грищенко В.І. – №2003065810; заявл. 24.06.03. Опубл. 16.02.04. з. Бюл. 2.
3. Колокольцева Т.Д. 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.
4. Липатов В.А. Патогенез раневого процесса и подходы к лечению гнойных ран / Липатов В.А. // Хирургия. – 2005. – №10. – С. 27–30.
5. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. реком. / За ред. чл.-кор. АМН України О.В. Стефанова. – К.: Авіценна, 2001. – 528 с.
6. Пирс Э. Гистохимия / Пирс Э. – М.: Медицина, 1962. – 365 с.
7. Попова Л.Н. Как изменяются границы вновь образующегося эпидермиса при заживлении ран: автореф. дис. ... канд. мед. н. / Попова Л.Н. – М., 1942. – 16 с.
8. Раны и раневая инфекция / Под ред. М.И. Кузина и Б.М. Костюченко. – М.: Медицина, 1990. – 592 с.
9. Терехов С.М. Усовершенствованный метод клонирования диплоидных фибробластов человека / Терехов С.М. // Цитология. – 1981. – Т. 23, №6. – С. 717–718.

#### Сведения об авторе:

Абрафикова Л.Г., м. н. с. отдела ДХБО при НТ и криомикробиологии ИПК и К НАН Украины.

#### Адрес для переписки:

Абрафикова Лилия Геннадиевна. г. Харьков, ул. Переяславская, 23, ИПК и К НАН Украины.  
Тел.: (057) 373 31 26, (067) 682 53 18, E-mail: abrafikova@mail.ru