

### ВЛИЯНИЕ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ ДЕРМАЛЬНЫХ АУТОФИБРОБЛАСТОВ НА ПРОЦЕССЫ РЕГЕНЕРАЦИИ В ИНДУЦИРОВАННОЙ ОЖОГОВОЙ РАНЕ

Самаева Е.В., Молдоташева Г.С., Ильина Л.Л.  
МВШМ, кафедра патологии.

**РЕЗЮМЕ.** Принципиальной новизной работы явились исследования, связанные с практическим применением разработанной новой методики культивирования дермальных аутофибробластов (ДАФБ) с применением обогащенной тромбоцитами плазмы и препарата корня солодки «Глицирам» (получен патент на изобретение № 1740 КР).

Проведен сравнительный анализ влияния культивированных ДАФБ, выращенных в присутствии обогащенной тромбоцитами плазмы и препарата корня солодки «Глицирам» на процессы регенерации в сравнении с традиционным методом лечения ожоговых ран мазью «Левомеколь». Объектом исследования послужили лабораторные беспородные крысы массой 150–200 гр. Термическое поражение IIIA степени наносилось контактным способом.

Экспериментальным путем доказано, что пересадка культивированных ДАФБ позволяла в 1,5–2 раза сократить сроки заживления ожоговых ран, предупреждала формирование грубых рубцов.

**Ключевые слова:** индуцированная ожоговая рана, лечение, культивированные аутофибробласты.

#### ИНДУЦИРИЛГЕН КҮЙҮК ЖАРАСЫНА ӨСТҮРҮЛГӨН ДЕРМАЛДЫК АУТОФИБРОБЛАСТАРДЫН РЕГЕНЕРАЦИЯЛОО ПРОЦЕССИНЕ ТААСИР ӨТҮҮСҮ

Самаева Е.В., Молдоташева Г.С., Ильина Л.Л.  
Патология кафедрасы Эл Аралык Жогорку Медициналык Мектеби

**ЖЫЙЫНДЫ.** Бул изилдөө ишинин принципалдык жаңылыгы: дермалдык аутофибробластарды өстүрүүнүн жаңы ыкмасы болуп тромбоцит менен байытылган плазманы жана “Глицирам” тамырынын препаратын колдонуу эсептелинет.

Регенерация процессине тромбоциттер менен байытылган плазмада жана “Глицирам” тамырынын препаратында өстүрүлгөн дермалдык аутофибробластардын таасири жана салттык күйүк жарасын дарылоодо колдонулуугу “Левомеколь” майынын таасирине салыштырма анализ жүргүзүлгөн. Изилдөөнүн объектиси болуп пародасыз, салмагы 150–200 гр. болгон лабораториялык чыккандар кызмат кылды. IIIA даражадагы термикалык күйүк контакттык ыкма менен тийгизилди. Өстүрүлгөн ДАФБ 1,5 – 2 эсе аз убакыттын ичинде жаранын айыгуусуна алып келгени эксперименталдык жол менен далилденди.

**Негизги сөздөр:** индуцирленген күйүк жарасы, дарылоо, өстүрүлгөн аутофибробластар.

#### THE EFFECT OF CULTURED DERMAL AUTOFIBROBLASTS ON THE REGENERATION PROCESSES IN INDUCED BURN WOUND

Samaeva E.V., Moldotasheva G.S., Ilina L.L.  
Pathology department ISM

**SUMMARY.** The principal novelty of the work is research related to the practical application of newly developed methods of incubation of dermal auto-fibroblasts (DAFB) using platelet-rich plasma and the medicine of licorice root "Glycyram" (received patent No. 1740 KG).

A comparative analysis of the impact of incubate DAFB grown in the presence of platelet-rich plasma and the medicine of licorice root "Glycyram" on regeneration processes in comparison with the traditional method of burn wounds treatment with the ointment "Levomekol" is carried out. The object of research is laboratory outbred rats weighing 150–200 g. Thermal defeat IIIA degree is applied by contact.

Experimentally it is proved that transplantation of incubate DAFB ultimately allowed shortening in 1.5–2 times the duration of burn wounds healing, prevented the formation of rough scars.

**The keywords:** induced burn, treatment, incubate autofibroblasts

**Актуальность.** Термические поражения представляют собой серьёзную медицинскую, социальную и экономическую проблему, занимая третье место в структуре травматизма мирного времени [1]. В Республиканский ожоговый центр г. Бишкек ежегодно за медицинской помощью обращаются в среднем 1253 больных, из них 44,2% (555 больных) получают стационарное лечение, остальные 55,8% (697 больных) - амбулаторное лечение. Из больных, получивших стационарное лечение, 55 % (305 больных) составляют взрослые, остальные

45% (250 больных) дети [2].

При поверхностных ожогах восстановление кожного покрова проводится при помощи местного консервативного лечения, создающего благоприятные условия для их заживления. При ожогах IIIA степени мозаичность поражения кожи часто затрудняет самостоятельное заживление, особенно при обширных ожогах, когда за счет нарушений микроциркуляции и инфицирования эпидермальные производные находятся под угрозой гибели [3].

При глубоких ожогах требуется прове-

дение кожной пластики. Однако при обширных глубоких ожогах более 15-20 % поверхности тела возникает дефицит донорских ресурсов кожи, существенно затрудняющий возможность одномоментной пластики всех ожоговых ран. При этом образуется дополнительная кожная рана в месте забора лоскута [4].

Коррекция различных нарушений в организме пациента при ожогах, как правило, невозможна без восстановления целостности кожного покрова. Создание идеального покрытия затруднено, в основном по двум причинам. Во-первых, лекарственные средства в составе покрытия могут быть несовместимы и взаимно подавлять или уничтожать свою специфическую активность. Во-вторых, положительное воздействие препаратов в одной фазе раневого процесса может оказаться отрицательным в другой [5].

Новые подходы к решению проблемы дефицита донорских ресурсов наметились с развитием биотехнологии, когда появилась возможность получать жизнеспособные клетки и даже пласты этих клеток в лабораторных условиях [6]. В частности, для местного лечения ожоговых ран перспективным представляется применение клеточных культур фибробластов и продуцируемых ими биологически активных веществ [7]. Патогенетическая сущность этой методики состоит в следующем: трансплантированные на рану фибробласты стимулируют пролиферацию эпидермоцитов, сохранившихся в ране, и эпидермоцитов сетчатых лоскутов аутокожи, применяемых для трансплантации. Стимулирующее влияние фибробластов на процессы эпителизации ячеек обуславливает ускорение процессов приживления аутодермотрансплантатов с большим коэффициентом перфорации [8].

Преимущество использования аутоклеток заключается в продолжительном клиническом эффекте, а также, исключен риск заражения пациента инфекционными агентами и развития аллергических реакций, к тому же не возникает трудностей с поиском подходящих доноров [9].

Анализируя литературные источники по данному вопросу, можно отметить что, разработка методов лечения с использовани-

ем культивированных клеток кожи и ее эквивалентов требует совершенствования на всех этапах, начиная от формирования трансплантата и до его применения.

**Целью** наших исследований стало изучение протекания регенераторных процессов в индуцированной ожоговой ране, при применении культивированных дермальных аутофибробластов (ДАФБ), выращенных с использованием обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) и препарата «Глицирам».

### **Материалы и методы исследования:**

Эксперименты проводились на лабораторных беспородных крысах обоего пола, массой 150 -200 гр. Животные содержались в стандартных условиях при температуре 20-22<sup>0</sup>С и обычном световом режиме. Термическое поражение IIIА степени наносилось контактным способом насадкой к электропаяльнику размером 2х2 см, разогретой до 232<sup>0</sup>С, экспозиция 4 секунды [10].

После воздействия термического агента ожоговая рана была представлена коагуляционным струпом, который удалялся в пределах жизнеспособных тканей острым путем на третьи сутки (первичная дермальная тангенциальная некрэктомия). Гистологическая картина послойного кожно-мышечного лоскута соответствовала ожогу IIIА степени.

Распределение животных по группам производилось следующим образом: 1-я группа – с ожогом IIIА степени после проведения тангенциальной некрэктомии с пересадкой на 3-и сутки культуры ДАФБ, выращенных в среде с применением ОТП и «Глицирама» [11]; 2-я группа – с ожогом IIIА степени после проведения тангенциальной некрэктомии, леченные мазью «Левомеколь».

Оценка течения воспалительного процесса в ожоговой ране проводилась на 1, 3, 7, 10, 15, 25, 40 сутки после нанесения ожоговой травмы и проведения курса лечебных мероприятий при помощи морфологических и морфометрических методов исследования.

При морфометрическом исследовании в каждой группе животных определяли следующие показатели:

1. Толщина эпидермиса, сосочкового и сетчатого слоев дермы (в мкм).
2. Сосуды микроциркуляторного рус-

ла: количество (на 1 мм<sup>2</sup>) и диаметр (в мкм).

3. Клеточный состав: нейтрофилы, лимфоциты, макрофаги, фибробласты, фиброциты, плазмоциты, оценивался путем подсчета общего количества клеток.

4. Оценивалось состояние прилегающего эпителия.

Морфометрию проводили на световом микроскопе Ломо АУ – 12 при увеличении х8, х20, х40 с помощью стандартной линейки в соответствии с общепринятыми требованиями.

Полученный фактический материал подвергали компьютерной обработке с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel с учетом критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** В процессе послеожогового восстановления эпидермальный слой при лечении ДАФБ восстанавливался следующим образом. Активация пролиферативных процессов привела к нарастанию 1-2 рядного эпителия на 7-е сутки. Этому способствует прорастание многослойного плоского эпителия с краев раны и из кожных дериватов. Вновь сформированный эпидермис несколько утолщен (на 57%) по сравнению с интактной кожей, но наблюдалась дальнейшая нормализация как цифровых данных, так и структуры. И уже, начиная с 10 суток, наблюдалось формирование многослойного плоского эпителия и к моменту окончания лечения (приблизительно на 20 суток) в этой группе ожоговая рана покрыта многослойным плоским эпителием с типичными слоями стратификации, ничем не отличающимся от окружающей интактной кожи.

Во второй же группе (лечение мазью «Левомеколь») наблюдалась несколько иная картина. Эпидермис отсутствовал в 1-10 сутки, а затем превышал толщину эпидермиса интактной кожи, кроме того, отличался от нее формой клеток количеством и толщиной слоев. Окончательная эпителизация зоны термического повреждения происходила лишь к 40 суткам, однако вновь сформированный эпителий был утолщен по сравнению с интактной кожей на 73%. Следует отметить, что происходила в основном краевая эпителизация. Характерно наличие струпа

местами вплоть до 25-30 суток, что связано с прогрессирующим вторичным некрозом в зоне поражения.

Проведенное исследование выявило последовательные фазные изменения толщины слоев дермы в динамике термического ожога. На 3-и сутки после ожога толщина дермы превышала толщину интактной кожи на 15%. Затем в первой группе отмечался максимум воспалительной реакции с отеком дермы на 7 сутки, что связано с экссудативно – инфильтративным процессом в дерме, однако в дальнейшем, отмечалась тенденция к снижению толщины, что связано с переходом фазы пролиферации воспалительного процесса в фазу регенерации. К 15 суткам наблюдения толщина дермы приблизилась к толщине дермы интактной кожи с полным восстановлением этого показателя к 25 и к 40 суткам (фаза регенерации).

Во второй же группе наибольшего утолщения дерма достигла к 7 суткам с последующим снижением воспалительной реакции и отека к 25 суткам. Однако к 40 суткам наблюдалась иная картина, дерма была утолщена на 14% по сравнению с интактной кожей, что связано с повышенным содержанием клеточных элементов соединительной ткани, преимущественно за счет фибробластов и фиброцитов, что свидетельствует о формировании грубого послеожогового рубца.

Характерны изменения и структурных составляющих дермы. На 3 сутки после ожога отмечалась выраженная воспалительная реакция и отек. На 7-е сутки в группе с трансплантацией культивированных ДАФБ отмечалась тенденция к снижению воспалительной реакции и к 25 суткам наблюдения структура дермы восстановилась в большей степени, чем в группе, леченной мазью «Левомеколь», где даже к 40 суткам исследования дифференцировка дермы была еще не четкой, сосочки выражены слабо.

Одним из признаков начала дегенеративно-воспалительной стадии течения раневого процесса (фаза пролиферации) являлось начало формирования деморкационного вала, который начал формироваться еще на третьи сутки и к 7 суткам уже сформировался. В первой группе под деморкационным

валом сохранялась отечность сетчатого слоя с выраженной фибробластической реакцией и участками коллаgenoобразования. Во второй же группе в сетчатом слое дезорганизованные, набухшие, разрыхленные коллаgenовые волокна.

Изменение количественного и качественного состава клеточных элементов происходило с 1-х суток после получения

термической травмы. К 3-м суткам в общей массе преобладали нейтрофильные лейкоциты и лимфоциты. К 7-м суткам в обеих группах сохраняется аналогичная картина, однако общее количество клеточных элементов в первой группе было больше, это связано со значительным ростом числа фибробластов и фиброцитов (переход к фазе регенерации) (Диаграммы 1, 2).

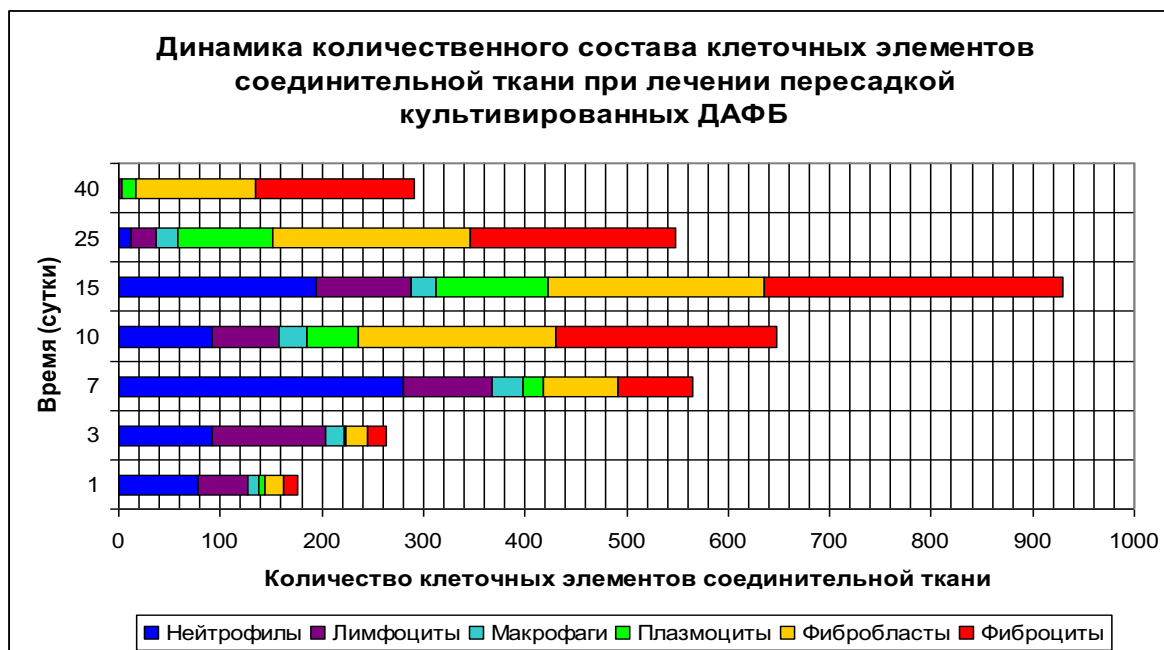


Диаграмма 1. Динамика количественного состава клеточных элементов соединительной ткани при лечении пересадкой культивированных ДАФБ

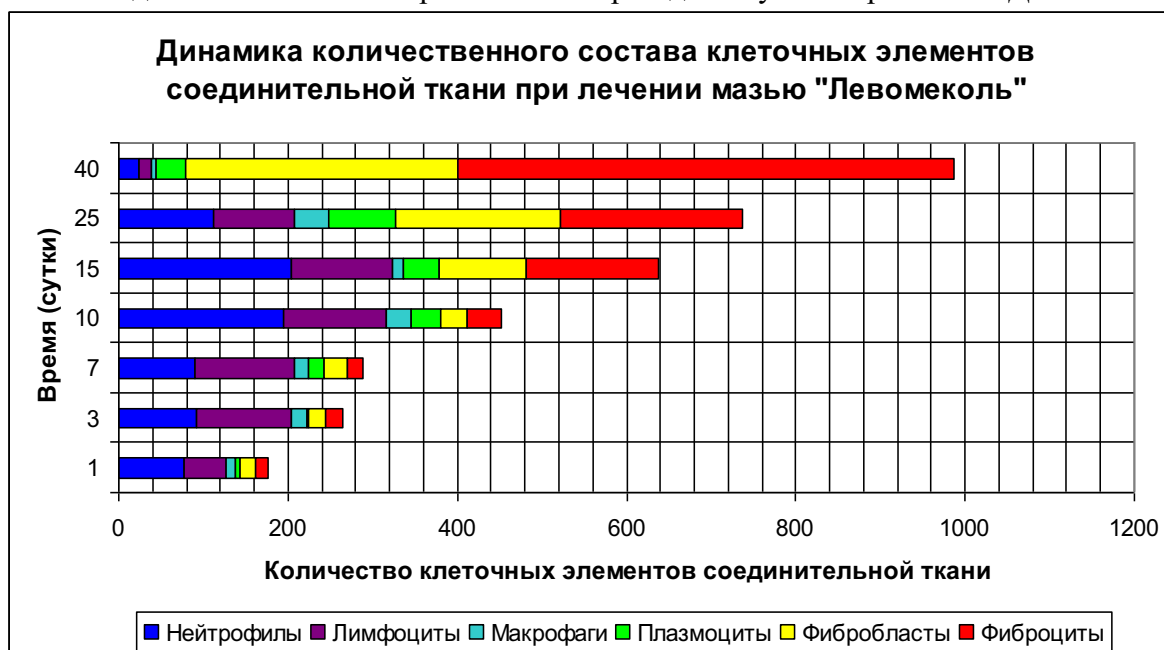


Диаграмма 2. Динамика количественного состава клеточных элементов соединительной ткани при лечении мазью «Левомеколь».

К 10 суткам во второй группе преобладающими клеточными элементами остава-

лись нейтрофильные лейкоциты и лимфоциты, в первой же группе - это фибробласты и фиброциты, причем преобладали фиброциты, результатом чего являлась меньшая, чем в первой группе толщина новообразованной рубцовой ткани.

Очень важным прогностическим признаком, свидетельствующем о прогрессировании процессов репарации, является начало пролиферации фибробластических элементов, сначала периваскулярно, а затем и на границе с трансплантированной культурой фибробластов, обнаруживаемое уже на 10 сутки исследования.

Во второй группе стихание деструктивных процессов происходило лишь к 25 суткам, когда фибробласты и фиброциты становятся преобладающими клеточными элементами. В первой же группе к 25 суткам наблюдалась тенденция к нормализации клеточного состава дермы с минимальной клеточной реакцией.

К 40 суткам в первой группе клеточный состав не отличался от клеточного состава интактной кожи. Во второй же группе сохранялась клеточная реакция в виде увеличения общего числа клеточных элементов на 68% со значительным количеством фибробластов и фиброцитов, что является признаком формирования грубого ожогового рубца.

В дерме наблюдалось выраженное

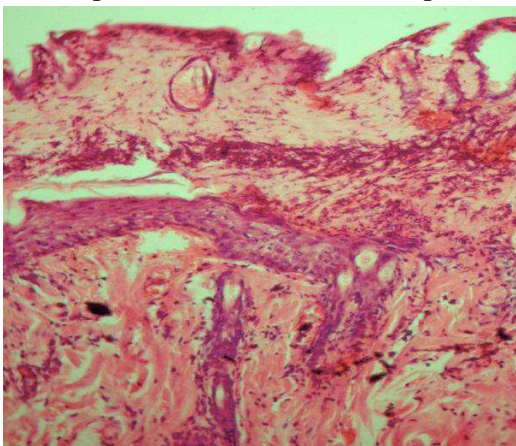


Рис. 1. Микрофото. Состояние ожоговой раны на 7-е сутки наблюдения. Лечение пересадкой ДАФБ. Виден вновь образованный эпителий, большое количество сосудов регенерации синусоидного типа

расширение просвета сосудов микроциркуляции с увеличением их плотности в 1 и 3 сутки исследования (гиперемия). В первые несколько суток сохранялись микроциркуляторные расстройства, такие как периваскулярный отек, эритростаз, лейкостаз. Затем в первой группе наблюдалась тенденция к стиханию гиперемических проявлений и к 25 суткам достоверного отличия от интактной кожи не имела, что связано с переходом острого воспалительного процесса (альтерация, экссудация, пролиферация) в фазу регенерации.

Во второй же группе в начальные сроки наблюдалось значительное расширение сосудов микроциркуляции, эта тенденция продолжалась до 25 суток исследования. К концу исследования (на 40 сутки) сохраняющиеся процессы перестройки кровеносного русла привели к снижению диаметра и плотности сосудов микроциркуляции, что связано с формированием грубого деформирующего послеожогового рубца.

В первой группе наблюдалось с 7-х суток появление тонкостенных новообразованных сосудов в более глубоких слоях дермы, из которых происходит их прорастание в более поверхностные слои, во второй же группе подобное явление происходило с 10-15 суток исследования, на 7 же сутки полностью отсутствовали новообразованные сосуды, более того, существующие сосуды были тромбированы.

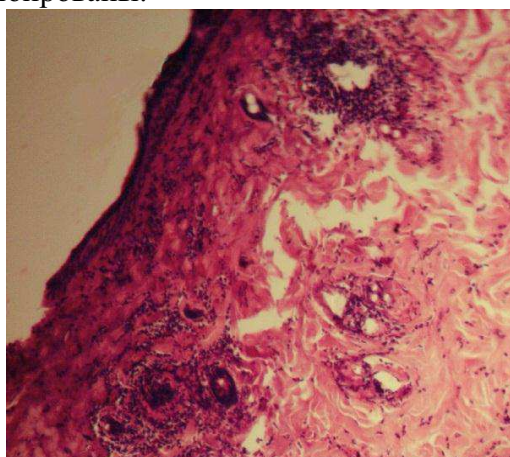


Рис. 2. Микрофото. Состояние ожоговой раны на 7-е сутки наблюдения. Лечение мазью «Левомеколь». Хорошо виден некротизированный эпителий, прилегающий эпителий раздражен, вокруг сосудов инфильтраты в виде муфт.

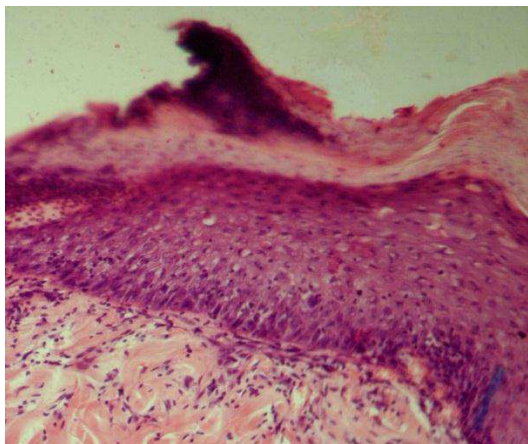


Рис. 3. Микрофото. Состояние ожоговой раны на 15-е сутки наблюдения. Лечение пересадкой ДАФБ. Хорошо виден «молодой» подрастающий эпителий, сосуды регенерации синусоидного типа.

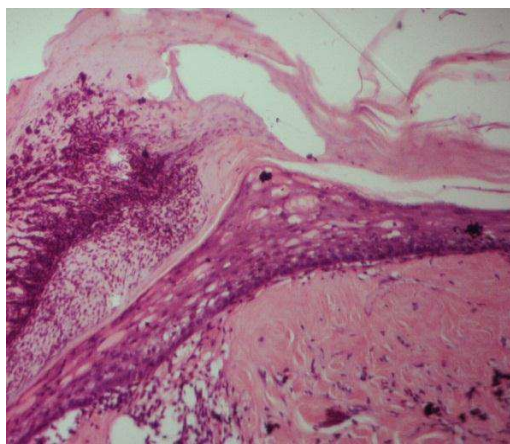


Рис. 4. Микрофото. Состояние ожоговой раны на 15-е сутки наблюдения. Лечение мазью «Левомеколь». Видна зона некроза, раздраженный эпителий, единичные сосуды регенерации синусоидного типа.



Рис. 5. Микрофото. Состояние ожоговой раны на 25-е сутки наблюдения. Лечение мазью «Левомеколь». Виден «молодой» эпителий, сосуды регенерации синусоидного типа.

Характерно на 10 сутки в группе лечения мазью «Левомеколь» появление сосудов регенерации синусоидного типа, количество и диаметр которых достигли максимума к 15 суткам, а затем наблюдалось их постепенное снижение с полным исчезновением только к 40 суткам. В первой же группе наличие сосудов регенерации синусоидного типа было отмечено еще на 7 сутки, когда наблюдалась максимальная их плотность и диаметр, с последующим снижением и практически полным исчезновением на 25 сутки исследования. Такая динамика изменения сосудов регенерации синусоидного типа связана с началом пролиферативно – регенераторных процессов в ожоговой ране.

Наблюдались изменения прилегающего эпидермиса: на 3 сутки в обеих группах он раздражен. Это проявилось в виде баллонизирующей дистрофии, акантоза, что наблюдалось и на 7 сутки исследования, когда в прилежащем к зоне повреждения эпителии в обеих группах наблюдался акантоз, балло-

низирующая дистрофия. На 10 и 15 сутки во второй группе сохранялись изменения прилегающего к зоне поражения эпителия в виде акантоза, баллонизирующей дистрофии с образованием пузырей, паракератоза, спонгиоза. В первой же группе вне зоны поражения не наблюдалось видимых признаков дезорганизации эпителия. К 25 суткам в группе леченной традиционным способом наблюдался паракератоз прилегающего к зоне поражения эпителия. В группе же с пересадкой культивированных ДАФБ не наблюдалось признаков дезорганизации эпителия.

Раздражение прилегающего к зоне поражения эпителия связано с острым воспалительным процессом в ожоговой ране, который затрагивал и прилегающую интактную кожу. По мере стихания воспалительного процесса и перехода к фазе регенерации дезорганизация прилегающего к месту поражения эпителия нивелировалась, что наблюдалось в первой группе к 10 суткам, во второй несколько позже – 25-30 сутки.

### Выводы:

Таким образом, анализ количественных и качественных показателей, характеризующих течение регенераторных процессов, показал, что после пересадки культуры ДАФБ темп стихания воспалительного и начала репаративно - резорбтивных процессов в ожоговых ранах был несколько выше. Это выразилось в ускорении смены фаз регенераторного процесса: сокращались сроки периода клеточной инфильтрации и ускорялся темп разрастания сосудистой сети и образования грануляционной ткани, быстрой смене клеточного состава грануляционной ткани с уменьшением числа нейтрофилов и достоверным резким увеличением процентного содержания фибробластов, появлением макрофагов, активно элиминирующих продукты распада коллагена и способствует быстрому переходу экссудативной фазы воспаления в продуктивную, что создавало условия для пролиферации аутоэпидермоцитов и адекватных процессов эпителизации. В отличие от этого, лечение ожоговых ран мазью «Левомеколь» не приводило к полноценному восстановлению структурно-функциональных свойств кожи. Регенераторный процесс в ожоговых ранах без клеточной терапии также имел место, но темп его был резко замедлен и протекал по типу подострого течения раневого процесса. Это выразилось в том, что фазы процесса заживления заметно сдвинуты: альтернативная фаза пролонгирована за счет прогрессирующих некроза и нагноения, фаза очищения раны замедлена в связи с угнетением макрофагальной реакции и фагоцитарной функции лейкоцитов. Характерно также торможение пролиферативного компонента воспаления, в частности развития капилляров и фибробластов грануляционной ткани.

### Список литературы

1. Алексеев А.А., Бобровников А.Э., Крутиков М.Г. Местное использование антимикробных средств для лечения ожоговых ран// Электронная версия журнала «Комбустиология». – 2011. - №45.
2. Сарбанова К.С. Реструктуризация республиканского ожогового центра Кыргызской республики (КР)// Электронная версия журнала «Комбустиология». – 2013. - № 49 – 50.
3. Алексеев А.А., Бобровников А.Э. Местное применение стимуляторов регенерации для лечения ожоговых ран// Электронная версия журнала «Комбустиология». – 2010. - №41.
4. Лаврухин Ю.Н., Чеглаков Е.В., Арефьев В.В. Методы лечения остаточных ран у обожжённых// Вестник неотложной и восстановительной медицины. - 2005. - Т.6. №2. - С. 386 - 387.
5. Кузин М.И., Костюченко Б.А. Раны и раневая инфекция: Руководство для врачей. - Москва: Медицина, 1990. - 592 с.
6. Богдан В.Г., С.С. Багатка, М.Ю. Юркевич, М.М. Зафранская, Ю.М. Гаин Влияние обогащенной тромбоцитами плазмы на жизнеспособность, скорость роста, морфо-фенотипические и секреторные особенности мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека// Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2013. - №3. – С. 159-164.
7. Дедовской С.Н. Анализ клинической эффективности применения фетальных и зрелых аллогенных диплоидных фибробластов в лечении пограничных ожогов// Успехи современного естествознания. - 2008. - №9. - С. 47-50.
8. Ямскова, В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. К вопросу о механизмах, лежащих в основе процессов восстановления и репарации в тканях// Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2010. - №1. - С. 32-35.
9. Колокольчикова Е.Г., Будкевич Л.И., Бобровников А.Э. и др. Патоморфологические изменения ожоговых ран после пересадки аллогенных фибробластов// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2001. - №1. - С.107-111.
10. Курамаева У.К. Способ нанесения термического ожога кожи на экспериментальных животных // Рационализаторское предложение №36/07 от 13.09.07 Кыргызская государственная медицинская академия.
11. Самаева Е.В., Тухватшин Р.Р. Способ культивирования аутофибробластов // Патент №1740 от 04.04.2014 КГ.