

DOI: <https://doi.org/10.51922/1818-426X.2022.3.24>

*А. Ч. Часнойть<sup>1</sup>, И. Б. Василевич<sup>2</sup>, З. Б. Квачева<sup>2</sup>,  
А. В. Бутенко<sup>2</sup>, К. А. Матиевский<sup>2</sup>, В. М. Басалай<sup>1</sup>,  
Т. Э. Владимирская<sup>1</sup>, В. Н. Подгайский<sup>1</sup>, И. Д. Волотовский<sup>2</sup>*

## **ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ ОЖОГОВОЙ ТРАВМЫ НА МОДЕЛИ СПЛОШНОГО И МОЗАИЧНОГО ОЖОГОВ У ЖИВОТНЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТКАНЕВОГО ЭКВИВАЛЕНТА КОЖИ**

*ГУО «БелМАПО»,<sup>1</sup>*

*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии» НАН Беларуси,  
Минск, Беларусь<sup>2</sup>*

*Исследована эффективность лечения термических ожогов у экспериментальных животных с использованием разработанного тканевого эквивалента кожи на основе культивированных фибробластов и кератиноцитов кожи (ТЭК).*

*Изучены сроки заживления ран в опытных и контрольных группах животных с термическими ожогами IIIAB-IV степени. Проведен анализ с использованием морфологических методов исследования срезов биоптатов ожоговых ран кожи животных на различных сроках заживления. Выявлен стимулирующий эффект ТЭК на регенеративные процессы в ранах. При использовании ТЭК у животных со сплошными и мозаичными ожогами, наблюдалось укорочение сроков заживления ран в 1,64 раза по сравнению с контрольной группой нелеченых животных.*

**Ключевые слова:** *фибробласты, кератиноциты, мозаичный и сплошной ожоги, тканевой эквивалент кожи, животные.*

*A. Ch. Chastoits, I. B. Vasilevich, Z. B. Kvacheva,  
A. V. Butenka, K. A. Matsiyevski, V. M. Basalai,  
T. E. Vladimirskaya, V. N. Podgaiski, I. D. Volotovski*

## **EFFICIENCY OF TREATMENT OF INJURY ON A MODEL OF SOLID AND MOSAIC BURNS IN ANIMALS USING A TISSUE EQUIVALENT OF THE SKIN**

*The effectiveness of the treatment of thermal burns in experimental animals using the developed skin tissue equivalent based on cultured skin fibroblasts and keratinocytes (TES) was studied.*

*The terms of wound healing in experimental and control groups of animals with thermal burns IIIAB-IV degree were studied. An analysis was carried out using morphological methods for studying sections of biopsy specimens of burn wounds of the skin of animals at various periods of healing. The stimulating effect of TES on regenerative processes in wounds was revealed. When using TES in animals with solid and mosaic burns, there was a shortening of the wound healing time by 1.64 times compared with the control group of untreated animals.*

**Key words:** *fibroblasts, keratinocytes, mosaic and solid burns, tissue equivalent of the skin, collagen gel, animals.*

**П**роблема восстановления раневого дефекта кожи при заболеваниях и повреждениях различной этиологии остается актуальной во всем мире, несмотря на значительный рост уровня ме-

дицинской помощи и появление технологически более совершенных перевязочных средств [2, 7–10]. В Республике Беларусь за медицинской помощью ежегодно обращается около 30 000 человек с тер-

мической травмой, среди которых более 15 % составляют дети. Около 6000 человек из них проходят стационарное лечение в специализированных ожоговых отделениях. По разным данным сразу после выписки из стационара инвалидами признаются 6–9 % пациентов от общего числа лечившихся (более 80 % инвалидов составляют лица трудоспособного возраста). При потере кожи (ожоги III Б – IV степени) самостоятельное восстановление кожи невозможно без дополнительного вмешательства. Заживление происходит месяцами и сопровождается образованием грубых патологических рубцов, с развитием деформаций и контрактур, приводящих к инвалидизации пациентов. Пограничные мозаичные ожоги III степени могут заживать самостоятельно, но эпидермальные производные при этом находятся под угрозой гибели.

В настоящее время в мире разработан ряд перевязочных средств для лечения глубоких ожогов, позволяющих снизить риск инфекционного заражения, потерю белка и жидкости. К ним относятся биологические повязки: аллогенная консервированная кожа, в том числе и кадаверная, ксенотрансплантаты, амниотическая оболочка, препараты на основе коллагена – Комбутек, Alloderm [6] и др. Кроме того, используются также препараты растительного происхождения (Альгипор) и синтетические покрытия (Синкрит, Сис – пурдерм, различные пленки и др.). Однако при глубоких ожогах большой площади в условиях относительно и абсолютного дефицита донорских ресурсов требуется пересадка кожи. В связи с успехами в области клеточных технологий и начало их применения в различных областях медицины, получило активное развитие новое направление и в комбустиологии [3–5]. Хороший клинический эффект от применения клеточных технологий в комбустиологии в ряде стран и отсутствие данного метода лечения в нашей стране является обоснованием разработки биомедицинского клеточного продукта на основе культивированных клеток кожи (фибробластов и кератиноцитов) и испытания его на эффективность и биобезопасность. Ранее нами был разработан ТЭК, дана характеристика входящих в его состав компонентов, отобраны критерии контроля качества данного препарата [1].

Цель данной работы: провести исследования эффективности и безопасности разработанного ТЭК на основе культивированных клеток кожи на модели ожогов у лабораторных животных.

**Экспериментальные животные.** В эксперименте использовали лабораторных животных – беспородные крысы, с массой тела 250 г, самцы. Содержание животных осуществлялось в виварии, по санитарно-гигиеническим характеристикам соответствующим существующим в РБ. До начала эксперимента животные находились под карантинным наблюдением в течение двух недель в виварии. В исследование выбирали активных животных без видимых признаков заболевания с гладким, блестящим шерстным покровом, нормальной окраской видимых слизистых оболочек, охотно поедающих корм. После взвешивания на электронных весах были сформированы сходные по массе (разница не более 10 %), поведению и состоянию контрольные и опытные группы. По истечении срока наблюдения животные (опытных и контрольных групп) выведены из эксперимента с соблюдением принципов биоэтики (в соответствии со стандартами GLP) на фоне внутривенного тиопенталового наркоза из расчета 1 мл 5 % тиопентала натрия на 100 грамм веса животного.

Метод моделирования сплошного и мозаичного термических ожогов у лабораторных животных. Экспериментальным животным, после предварительной и предоперационной подготовки (выбрития шерсти на спине) был смоделирован термический контактный ожог кожи с использованием паяльной станции (паяльника) с возможностью регулировки температуры, к которой присоединены круглые пластины заданной площади (цельная – для моделирования полнослойного ожога и перфорированная – для мозаичного ожога, по 20 животных в каждой группе). При проведении экспериментальных исследований руководствовались Инструкцией МЗ РБ 1.1.11-12-35-2004; МУ «Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)» (Руководящий нормативный документ РД-126-91. М., 1992); МР «Правила работы с использованием экспериментальных животных» (утв. 16.06.2004 г. ректором БелМАПО).

**Приготовление ТЭК.** Эксплантация биоптата кожи у экспериментальных животных проводилась после предварительной анестезии. Обезболивание достигалось внутримышечным введением фентанила 0,05 % + дроперидола 0,25 % (в соотношении 1:2) в дозе 0,3 мл на 100 г массы.

Доставка биоматериала в лабораторию для последующего приготовления культур фибробластов и кератиноцитов осуществлялась в стерильных транспортных закрытых флаконах с физиологиче-



Рисунок 1. Вид раны после некрэктомии и нанесения охранительной камеры на рану после трансплантации ТЭК (5 сутки после ожога)

ским раствором в специальном контейнере, поддерживающем температуру не ниже 4 °С с учетом временных параметров.

Культуры фибробластов и кератиноцитов приготавливали по ранее разработанным методикам [1]. Для приготовления культур разных типов клеток кожи биоптат обрабатывали раствором диспазы для отделения эдермиса от дермы.

*Культуры дермальных фибробластов* приготавливали методом эксплантов с использованием питательной среды DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Для накопления биомассы клеток проводилось их субпассирование (2–3 пассажа), путем пересева клеток в новые культуральные пластиковые флаконы в дозе  $1,5-2,0 \times 10^4 / \text{см}^2$  (25 см<sup>2</sup>, затем 75 см<sup>2</sup>). Монослой фибробластов формировался в течение 5–7 суток. Для получения взвеси клеток монослой клеток обрабатывали 0,25 % раствором трипсина в 0,02 % растворе ЭДТА.

*Культуру кератиноцитов* приготавливали из эпидермиса с использованием раствора трипсин/ЭДТА. Культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением сыворотки и ИТС (инсулин, трансферин, селенит натрия), эпидермального фактора роста, 5 % ЭТС.

Контроль качества клеток проводили согласно методам и критериям описанным в статье [1].

Для приготовления ТЭК использовали клетки 2-го пассажа, которые переводили в суспензию и в 1 % коллагеновом Коллост-геле послойно наносили на раневое покрытие из хитозана. Доза клеток составляла порядка 50 тысяч клеток на 1 см<sup>2</sup> площади раны.

Условия проведения аллогенной трансплантации ТЭК. Через 3–5 суток после моделирования

термического контактного ожога выполнялась некрэктомия нежизнеспособных тканей до видимо здоровых. Рана санировалась физиологическим раствором 0,9 % NaCl. Затем выполнялась аллотрансплантация ТЭК и нанесение атравматичного раневого покрытия (повязка мазевая Д4). Тканевой эквивалент кожи фиксировался под прозрачной охранительной камерой для предотвращения травматизации биотрансплантата и позволяющей визуально оценивать состояние его и повязки (рисунок 1).

На 7, 21, 35, 90 суток в послеоперационном периоде после трансплантации ТЭК проводились наблюдения с макроскопической оценкой состояния раны (фотодокументирование, измерение раны, описание характера и количества раневого отделяемого, а так же состояние биотрансплантатов) с последующим забором биопсийного материала для морфологических исследований в опытной и контрольной группах животных.

Морфологические исследования. Для приготовления препаратов срезов биоптатов раны использовали общепринятые методы. Окраска проводилась гематооксилин-эозином.

**Статистическая обработка результатов.** Использовался пакет программ «STATISTICA 10.0» (Version10-Index, StatSoftInc., США). Для определения статистической значимости различий между показателями групп использовали ранговый анализ вариаций значений в выборке Крускала-Уолиса (Н-критерий). Данный анализ предназначен для проверки равенства медиан нескольких выборок и позволяет сравнивать средние значения трёх и более групп. Различия считались достоверными при  $p \leq 0,05$  (вероятность выше 95 %) и высоко достоверными при  $p < 0,001$  (вероят-

Таблица 1. Динамика заживления ран в контрольных и опытных группах животных с ожогами\*

Группы	Время наблюдения, сутки				Полная эпителизация, сутки
	Площадь раны, см <sup>2</sup> *				
	1	7	21	35	
Сплошной ожог (контроль)	26,49	23,55	18,56	10,38	78
Мозаичный ожог (контроль)	27,51	21,07	15,68	8,13	69
Сплошной ожог (опыт)	31,39	26,25	9,97	3,71	47
Мозаичный ожог (опыт)	22,48	20,43	11,6	3,02	42

\* Статистическая оценка достоверности измерений площадей раневых поверхностей в ходе эксперимента проводилась с использованием значений процентилей, показывающих, каков процент значений в выборке находится ниже определенного уровня, при этом значение коэффициента достоверности в опыте составляло  $\leq 0,05$  (см. Материалы и методы).

ность выше 99,9 %). За нулевую гипотезу принималось утверждение, что наблюдаемые различия между одноименными признаками в исследуемых группах находятся в пределах случайных отклонений, т. е. различия не достоверны. Кроме того, достоверность полученных данных по лечению ожогов у выборки экспериментальных животных оценивалась по значениям процентилей.

Характеристика регенеративного процесса в контрольной (не леченных) и опытных группах животных с термическими ожогами

Как видно из таблицы 1, полная эпителизация ран в контрольной группе животных со сплошным термическим ожогом наблюдалась на 78 сутки (25 %–75 % процентиля = 74–81, min-max = 64–97), а в группе с мозаичным ожогом – на 69 сутки, что достоверно раньше на 9 суток (25 %–75 % процентиля = 74–81, min-max = 64–97) (критерий Wilcoxon,  $p < 0,05$ ).

В группе животных со сплошным термическим ожогом после трансплантации ТЭК полная эпителизация ран наблюдалась на 47 сутки (25 %–75 % процентиля = 45,5–51,5, min-max = 42–61), что достоверно быстрее на 31 сутки по сравнению с контрольной группой. При этом в ранах макроскопически формировался розовый рубец без признаков гипертрофии и воспаления узкой формы, обусловленный сокращением площади раны по длиннику ввиду контракции раны в процессе заживления.

Полная эпителизация ран у лабораторных животных с мозаичным ожогом наблюдалась на 42 сутки после трансплантации ТЭК (25 %–75 % процентиля = 42–44, min-max = 40–51) (критерий Wilcoxon,  $p = 0,013$ ), что достоверно быстрее на 27 дней по сравнению с контрольной группой животных.

Таким образом, при использовании ТЭК для восстановления кожного покрова у животных со сплош-

ными и мозаичными ожогами, наблюдалось укорочение сроков заживления ран в 1,64 раза по сравнению с контрольной группой нелеченых животных.

Критериями оценки скорости и полноты регенерации служили следующие морфологические критерии: формирование демаркационного лейкоцитарного вала, отторжение струпа, полнота эпителизации ожоговой поверхности, степень зрелости грануляционной и фиброзной ткани, очаги нерезорбированного некроза, очаги сегментоядерной лейкоцитарной инфильтрации в дерме. В таблице 2 дана выраженность морфологических критериев оценки скорости заживления и полноты регенерации ран контрольных и опытных групп животных.

Как видно из данных таблицы, применение ТЭК в лечении ожоговых ран у животных не только ускоряет восстановление кожного покрова, но и качественно изменяет морфологическую картину регенеративного процесса в ранах. Так, на примере сравнительного анализа препаратов срезов биоптатов из ран животных в контрольной и опытной группах на 35-е сутки наблюдения отмечена активация эпителизации и раннее формирование ГТ, созревание фиброзной ткани в опытной группе животных с мозаичным ожогом (рисунок 2). Как видно из данного рисунка, зажившая часть раны представлена узкой полосой эпидермиса по всей поверхности среза. Под эпидермисом видны хорошо дифференцирующиеся сосочковый и сетчатый слои дермы с сальными железами и волосными луковицами (рисунок 2, Б). В контрольной группе основная масса ткани представлена объемной зоной незрелой и созревающей ГТ в нижней трети дермы (рисунок 2, А). Таким образом, морфологические исследования ран опытной и контрольных групп животных подтверждают стимулирующий эффект ТЭК на генеративные процессы заживления ран.

Таблица 2. Морфологическая оценка регенерации ожоговых ран крыс

Сроки наблюдения	Контроль	Трансплантация
Мозаичный ожог		
7 сутки	ГТ незрелая, открытая поверхность раны, сегментоядерные лейкоцитарные (СЯЛ) инфильтраты	Грануляционная ткань (ГТ) созревающая, струп частично отслоен, частично спаян
28 сутки	Прослеживается на небольших участках демаркационный вал. Очаги некроза дермы. Незрелая ГТ	Начальные проявления краевой эпителизации. Созревающая ГТ. Незрелая фиброзная ткань.
35 сутки	Появляется демаркационный лейкоцитарный вал, ГТ незрелая	Активная краевая эпителизация. Созревающая ГТ. Зрелая фиброзная ткань
90 сутки	Эпителизация неполная. Очаги нерезорбированного некроза. Незрелая фиброзная ткань	Эпителизация полная. Очаг нерезорбированного некроза. Мелкие участки ГТ. Зрелая фиброзная ткань
Сплошной ожог		
7 сутки	Коагуляционный некроз эпидермиса и дермы. Открытая раневая поверхность	Струп спаян с раной. Коагуляционный некроз эпидермиса и дермы
28 сутки	Прослеживается на небольших участках демаркационный вал. Очаги некроза дермы. Незрелая ГТ	Отслоение струпа через формирование демаркационного вала. Созревающая ГТ
35 сутки	Струп спаян с раневой поверхностью. Очаги открытой раневой поверхности. ГТ незрелая и созревающая	Струп с демаркационным лейкоцитарным валом. ГТ зрелая. Фиброзная ткань созревающая
90 сутки	Неполная эпителизация, сохраняется струп, частично спаян с раневой поверхностью. Очаги зрелой ГТ. Фиброзная ткань созревающая и зрелая	Полная эпителизация. Фиброзная ткань зрелая

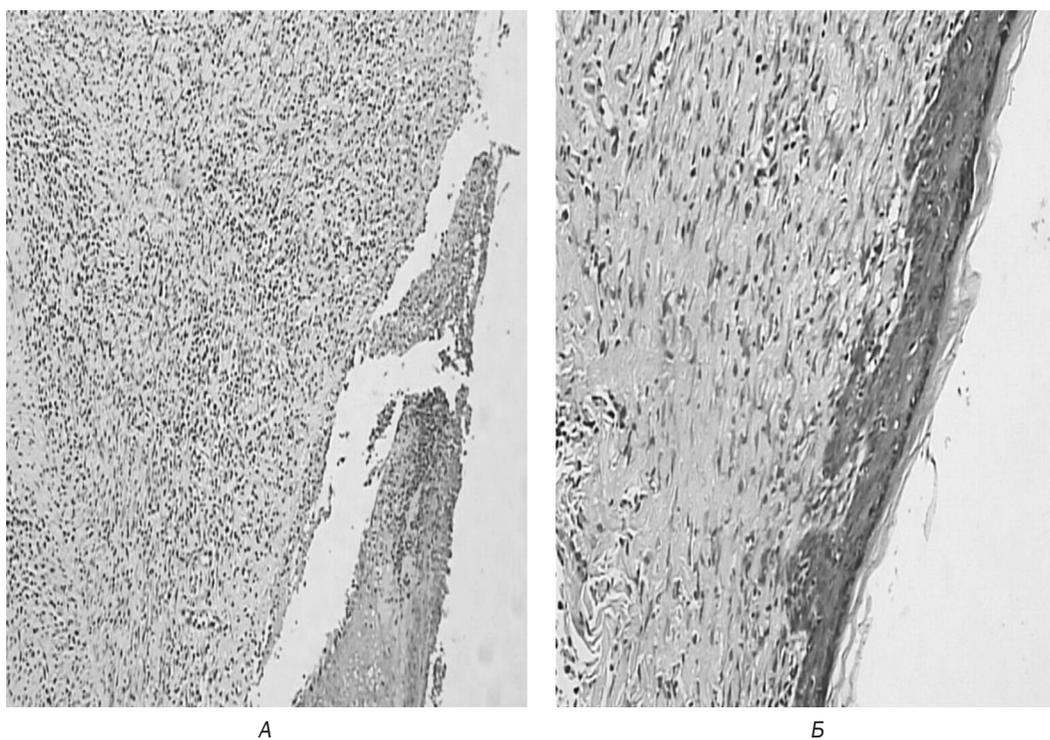


Рисунок 2. Морфологическая картина ран в опытной и контрольной группах животных с ожогами (35-е сутки наблюдения). Окраска гематоксилин-эозином: А – мозаичный ожог, контроль (без лечения). Ув.  $\times 100$ ; Б – мозаичный ожог после трансплантации ТЭК. Ув.  $\times 200$

**Заключение.** В результате проведенных экспериментов изучена эффективность применения ТЭК на восстановление кожного покрова животных со сформированным термическим IIIA-B-IV степени с поражением эпидермиса, сосочкового и большей части сетчатого слоя дермы в случае мозаичного ожога, и с тотальным поражением на всю

глубину кожи подкожно-жировой клетчатки в случае сплошного термического ожога. Заживление происходило путем краевой эпителизации, формирования росткового слоя эпидермиса за счет пролиферирующих эпителиоидных клеток дермы и грануляционной ткани в случае сплошного глубокого ожога и краевой, островковой эпителиза-

ции в случае мозаичного. Наибольшая скорость и полнота регенерации наблюдалась в группах с трансплантацией ТЭК.

Полученные данные свидетельствуют об эффективности применения разработанного ТЭК в восстановлении кожного покрова у ожоговых животных путем стимуляции регенеративных процессов в ране. Это открывает перспективу дальнейшего изучения и разработки биомедицинского клеточного продукта – тканевого эквивалента кожи, с последующим его внедрением в клиническую практику ожоговых отделений Республики Беларусь.

### Литература

1. Бутенко, А. В., Квачева З. Б., Василевич И. Б., Часнойть А. Ч., Волотовский И. Д. Тканевой эквивалент кожи - клеточный продукт на основе кератиноцитов и фибробластов кожи человека: свойства компонентов эквивалента и перспективы использования продукта на практике // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук». – 2021. – Т. 66, № 4. – С. 391–401.
2. Кузнецов, Я. О, Лишаков В. Б., Поликашкина А. С. Лечение острых и хронических раневых поверхностей интерактивными повязками // Рецепт. – 2008. – № 5 (61). – С. 121–127.
3. Малахов, С. Ф., Парамонов Б. А. Новые подходы к лечению тяжелых ожогов: трансплантация выращенных в культуре кератиноцитов // Военно-медицинский журнал. – 1997. – Т. 318, № 9. – С. 16–19.
4. Подгайский, В. Н. Современные биотехнологии в лечении ожогов / В. Н. Подгайский. – Минск: БелМАПО, 2017. – 58 с.
5. Пинаев, Г. П., Богданова М. С., Кольцова А. М. Клеточные технологии для регенеративной медицины. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2011. – 333 с.
6. Прокопчук, Н. Р., Меламед В. Д., Прищепенко Д. В. Инновационные раневые покрытия с нановолокнами хитозана // Труды БГТУ. – 2017. – Сер. 2, № 1 – С. 15–22.
7. Alsarra, I. A. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds // Int J Biol Macromol. – 2009. – Vol. 45. – P. 16–21.
8. Bi, H., Jin Y. Current progress of skin tissue engineering: Seed cells, bioscaffolds, and construction strategies // Burns Trauma. – 2013. – Vol. 1. – P. 63–72.

9. Bhardwaj, N., Sow W. T., Devi D. Silk fibroin-keratin based 3D scaffolds as a dermal substitute for skin tissue engineering // Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano. Macro. – 2015. – Vol. 7. – P. 53–63.

10. Longinotti, C. The use of hyaluronic acid based dressings to treat burns: a review // Burns Trauma. – 2014. – Vol. 2. – P. 162–168.

### References

1. Butenko, A. V., Kvacheva Z. B., Vasilevich I. B., Chasnojt' A. Ch., Volotovskij I. D. Tkanevoj ekvivalent kozhi – kletocchnyj produkt na osnove keratinocitov i fibroblastov kozhi cheloveka: svojstva komponentov ekvivalenta i perspektivy ispol'zovaniya produkta na praktike // Izvestiya Nacional'noj akademii nauk Belarusi. Seriya biologicheskikh nauk». – 2021. – T. 66, № 4. – С. 391–401.
2. Kuznecov, Ya. O., Lishakov V. B., Polikashkina A. S. Lechenie ostryh i hronicheskikh ranevyh poverhnostej interaktivnymi povyazkami // Recept. – 2008. – № 5 (61). – С. 121–127.
3. Malahov, S. F., Paramonov B. A. Novye podhody k lecheniyu tyazhelyh ozhogov: transplantaciya vyrashchennyh v kul'ture keratinocitov // Voenno-meditsinskij zhurnal. – 1997. – T. 318, № 9. – S.16–19.
4. Podgajskij, V. N. Sovremennye biotekhnologii v lechenii ozhogov / V. N. Podgajskij. – Minsk: BelMAPO, 2017. – 58 s.
5. Pinaev, G. P., Bogdanova M. S., Kol'cova A. M. Kletochnye tekhnologii dlya regenerativnoj mediciny. – SPb.: Izd-vo Politekh. un-ta, 2011. – 333 s.
6. Prokopchuk, N. R., Melamed V. D., Prishchepenka D. V. Innovacionnye ranevye pokrytiya s nanovoloknami hitozana // Trudy BGTU. – 2017. – Ser. 2, № 1 – S. 15–22.
7. Alsarra, I. A. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds // Int J Biol Macromol. – 2009. – Vol. 45. – P. 16–21.
8. Bi, H., Jin Y. Current progress of skin tissue engineering: Seed cells, bioscaffolds, and construction strategies // Burns Trauma. – 2013. – Vol. 1. – P. 63–72.
9. Bhardwaj, N., Sow W. T., Devi D. Silk fibroin-keratin based 3D scaffolds as a dermal substitute for skin tissue engineering // Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano. Macro. – 2015. – Vol. 7. – P. 53–63.
10. Longinotti, C. The use of hyaluronic acid based dressings to treat burns: a review // Burns Trauma. – 2014. – Vol. 2. – P. 162–168.

Поступила 01.03.2022 г.