

ВИКОРИСТАННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ОБОЛОНОК ПЛОДА В ТЕРАПІЇ ТРОФІЧНИХ ВИРАЗОК В ЕКСПЕРИМЕНТІ

О. О. Роєнко, В. Ю. Прокопюк, О. В. Фалько, Н. О. Шевченко, О. С. Прокопюк

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

APPLICATION OF CRYOCONSERVED FETAL MEMBRANES IN THERAPY OF TROPHIC ULCERS IN EXPERIMENT

O. O. Royenko, V. Yu. Prokopyuk, O. V. Fahlko, N. O. Shevchenko, O. S. Prokopyuk

Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine, Kharkiv

У теперішній час ТВ є одним з поширених захворювань в усьому світі. Вони виникають в 1 — 2% хворих працездатного віку, у 4 — 5% хворих похилого віку [1].

Утворення ТВ пов'язане з порушенням іннервації та локальної гемодинаміки артеріальної, венозної, лімфатичної систем, що ініціюють патологічні зміни на тканинному, клітинному та мікроциркуляторному рівні, спричиняють деструкцію тканин. Найбільш поширеними етіологічними чинниками виникнення ТВ є захворювання вен (посттромбофлебітичний синдром, варикозна хвороба нижніх кінцівок), артерій (облітеруючий ендартеріт, атеросклероз), ендокринної (цукровий діабет) та нервової систем, інфекційні захворювання [2]. Найчастіше трофічні виразки формуються на кінцівках.

Оптимізація методів лікування хворих є однією з важливих проблем сучасної медицини. Тому необхідне створення нових ефективних засобів лікування ТВ.

У загальноприйнятому комплексі лікувальних заходів за наявності ТВ особливу роль відіграє місцеве лікування.

Незважаючи на значний прогрес при використанні препаратів для місцевого лікування, тривалість загоєння виразок у більшості пацієнтів становить у середньому близько 2 — 3 міс. У багатьох хворих вони не гояться роками, частота рецидивів при консервативному лікуванні сягає 60 — 80% [3].

У світовій практиці домінує концепція лікування ТВ у вологому се-

Реферат

У модельному експерименті доведено, що лікування трофічних виразок (ТВ) кінцівок шляхом використання кріоконсервованих фрагментів оболонок плода людини (амніотичної та хоріальної) як ранового покриття дозволяє прискорити загоєння виразкового дефекту, сприяє активізації протизапальної та імунокоригувальної складових саногенезу, швидкому відновленню функціонування ураженої кінцівки, покращенню стану тварин. Застосування кріоконсервованих оболонок плода сприяє нормалізації кількості лейкоцитів у крові тварин, збільшенню кількості фагоцитів, посиленню їх поглинальної здатності, збільшенню кількості бластних форм лімфоцитів.

Ключові слова: трофічна виразка; кріоконсервована хоріальна й амніотична оболонки плода; експеримент.

Abstract

There was proved in a model experiment, that treatment of the extremities trophic ulcers, using cryoconserved fragments of human fetal membranes (amniotic and chorionic one) as the wounds cover, permits to accelerate the ulcer defect healing, promoted activation of anti-inflammatory and immunocorrecting components of sanogenesis, rapid restoration of the extremity affected functioning, improvement of the animal state. Application of cryoconserved fetal membranes promotes normalization of the blood leukocytes quantity in animals, a phagocytes quantity enhancement, their saturation capacity strengthening, and enhancement of the blast lymphocytes forms quantity.

Keywords: trophic ulcer; cryoconserved chorionic and amniotic fetal membranes; experiment.

редовищі. Для цього застосовують різні покриття на рану, що забезпечують аутолітичне очищення виразки, поглинання ранового ексудату, вологе середовище для міграції клітин, проліферації, диференціювання та утворення нових судин, термозахист та стабільність температури поверхні виразки, захист від зовнішнього інфікування, безболісне та атравматичне видалення пов'язки.

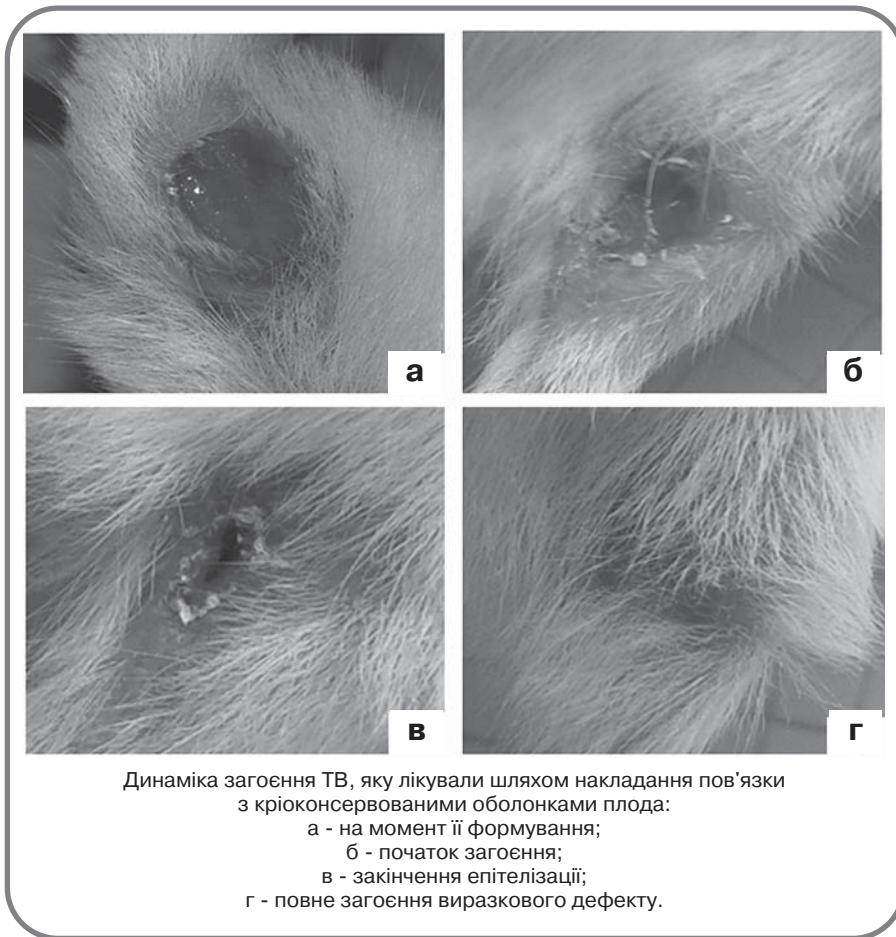
На наш погляд, для лікування ТВ ефективним може бути застосування амніотичної та хоріальної оболонок плаценти людини. Такий підхід оснований на здатності цього біоматеріалу прискорювати обмін речовин, сприяти регенерації та проліферації тканин, нормалізувати мікроциркуляцію [4]. Застосування

кріобіологічних технологій дозволяє зберігати біологічну активність сполук у складі оболонок плода з метою їх подальшого застосування в схемах лікування [5].

Мета роботи: дослідження впливу кріоконсервованих фрагментів амніотичної та хоріальної оболонок плаценти людини на організм тварин, у яких моделювали ТВ, на різних стадіях патологічного процесу.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження були хоріальна та амніотична оболонки, отримані з посліду породіль, які були поінформовані та надали письмову згоду на його використання з



Динаміка загоєння ТВ, яку лікували шляхом накладання пов'язки з кріоконсервованими оболонками плода:
 а - на момент її формування;
 б - початок загоєння;
 в - закінчення епітелізації;
 г - повне загоєння виразкового дефекту.

експериментальною метою. Оболонку плода розрізали на фрагменти площею до 1 см² та кріоконсервували у стерильних кріопробірках ("Nunc", Німеччина) під захистом 10% розчину диметилсульфоксиду ("Sigma", Німеччина) на живильному середовищі DMEM ("BioWest", Франція) зі швидкістю 1° за 1 хв до -70 °С у контейнері для заморожування Mr. Frosty ("Thermo Scientific" США), з подальшим зануренням у рідкий азот. Біооб'єкти розморожували шляхом занурення кріопробірок у водяну баню ("ВБ-4", Китай) за температури 40°С.

Для експерименту *in vivo* відбрали 63 білих лабораторних мишей—самців лінії Valb C масою тіла 20 г; віком 6 міс, у 60 з них формували ТВ шляхом одноразового введення 0,1 мл 9% розчину оцтової кислоти внутрішньошкірно в ділянку правого стегна. Наступної доби здійснювали термокоагуляцію судинно-нервового пучка у ділянці розгалу-

ження загальної клубової та стегнової артерій і вен з використанням високочастотного електрохірургічного апарата (ЕХВЧ М-50РХ "Надія-2", Україна) у режимі коагуляції, що спричиняло порушення кровообігу та іннервації кінцівки [6].

Після формування ТВ (3—тя доба експерименту) тварини розподілені на п'ять груп:

1—ша — інтактні, без виразки (n=3);

2—га — з ТВ без лікування (група мимовільного регресу), контроль (n=15);

3—тя — з ТВ, на яку накладали кріоконсервований фрагмент хоріальної оболонки (n=15);

4—та — з ТВ, на яку накладали кріоконсервований фрагмент амніотичної оболонки (n=15);

5—та — з ТВ, яким на всю виразку стерильним шпателем наносили мазь Солкосерил, Швейцарія (n=15).

Лікування ТВ проводили протягом 10 діб. Пов'язки накладали на 24

год, замінювали через кожні 48 год. Після зняття пов'язки вимірювали площу виразки. На 3—тю (момент формування виразки), 7, 14, 21—шу і 28—му добу від початку експерименту у мишей для отримання периферійної крові надрізали кінчик хвоста, у ці самі строки по 3 тварини виводили з експерименту шляхом декапітації, забирали кров для дослідження функціонального стану лімфоцитів.

Загальну кількість лейкоцитів крові обчислювали у камері Горяєва. Лейкоцитарну формулу визначали у мазках крові, забарвлених за Романовським — Гімза. Фагоцитарну активність лейкоцитів оцінювали за показниками: 1) фагоцитарний індекс (ФІ) — кількість лейкоцитів, здатних фагоцитувати тест-об'єкт (суспензія клітин дріжджів, НВЛ "Гранум", Україна); 2) фагоцитарне число (ФЧ) — кількість тест-об'єктів, поглинутих фагоцитом, за загальноприйнятою методикою. Імунну реактивність тварин оцінювали за реакцією бластної трансформації лімфоцитів, спонтанної (сРБТЛ) та індукованої мітогенами фітогемаглютиніну (іРБТЛ). Функціональну активність нижніх кінцівок оцінювали за тестом "помилка ніг" за кількістю хибних кроків [7]. Довжина драбини 70 см, відстань між щаблями 1,2 см. Результати досліджень обробляли з використанням загальноприйнятих статистичних методів.

Експерименти на тваринах виконували відповідно до "Загальних принципів експериментів на тваринах", схвалених III Національним конгресом з біоетики (Київ, 2007) і погоджених з Положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1985). Всі експерименти з участю лабораторних тварин погоджені з комітетом з біоетики Інституту.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За результатами модельного експерименту встановлено, що на 3—тю добу утворювалася ТВ площею у

середньому 64 мм². За даними тесту "помилка ніг", тварини груп 2 — 5, не спіраючись на ушкоджену кінцівку, важко долали драбину.

Краї виразок рівні, не спаяні з глибше розташованими тканинами, без серозного та гнійного ексудату (див. рисунок). У крові тварин спостерігали лейкоцитоз — кількість лейкоцитів збільшилася з $(8,2 \pm 1,8)$ до $(18,6 \pm 2,9) \times 10^9$ в 1 л, без змін лейкоцитарної формули. Відзначене збільшення функціональної активності лімфоцитів, про що свідчило збільшення показників іРБТЛ.

Показники ФІ та ФЧ не відрізнялися від таких в інтактних тварин. Таким чином, зміни гематологічних та імунних показників і загального стану тварин свідчили про формування запального процесу і порушення функцій кінцівки.

На 7—му добу експерименту (дворазове накладання пов'язки) загальний стан тварин усіх груп поліпшувався. Вони ставали більш рухливими, зменшувався набряк ушкодженої кінцівки. Площа ТВ кінцівки зменшувалася і вірогідно не відрізнялась між групами тварин. Загоєння виразки після накладання кріоконсервованих оболонок плода відбувалося рівномірно, поверхня рани чиста, без гною, не вкрита струпом. Тварини 3—ї та 4—ї груп робили вірогідно менше хибних кроків під час проходження тест—драбини у порівнянні з цим показником у 2—ї і 5—ї групах.

На тлі лейкоцитозу — кількість лейкоцитів $(13,8 \pm 3,2) \times 10^9$ в 1 л у тварин усіх груп спостерігали зсув лейкоцитарної формули ліворуч, кількість паличкоядерних нейтрофільних гранулоцитів збільшувалася з 2,6 до 16%, сегментоядерних — з 28 до 40%. Такі зміни розподілу форм лейкоцитів свідчили про виражений запальний процес в організмі. При цьому у тварин 3—ї та 4—ї груп збільшувалася кількість фагоцитів, про що свідчило збільшення ФІ, підвищувалася поглинальна здатність активних нейтрофільних гранулоцитів, про що свідчило збільшення ФЧ.

На 7—му добу у тварин 2—ї групи показники сРБТЛ та іРБТЛ досто-

вірно не відрізнялися від таких в інтактних тварин. Укриття ТВ кріоконсервованими фрагментами оболонок плода сприяло вірогідному збільшенню кількості бластних форм лімфоцитів після активації мітогеном, що свідчило про підвищення функціональної активності імунокомпетентних клітин. Застосування мазі Солкосерил не впливало на здатність лімфоцитів крові до бласттрансформації.

Таким чином, застосування кріоконсервованих фрагментів хоріальної та амніотичної оболонок в моделі ТВ у мишей вже через 4 доби лікування забезпечило відновлення функціональної активності ушкодженої кінцівки та активацію клітинної ланки імунної системи, що може свідчити про позитивний прогноз саногенезу ТВ.

По закінченні лікування (на 14—ту добу експерименту) у тварин 3—ї та 4—ї груп стан нормалізувався. Під час проходження тест—драбини миші робили значно менше хибних кроків у порівнянні з тваринами 2—ї та 5—ї груп. Площа ТВ у тварин цих груп була достовірно меншою, ніж у тварин 2—ї групи. Поверхня рани суха, загоєння відбувалося без утворення грубого рубця. Після застосування мазі Солкосерил площа виразки кінцівки була найбільшою, на нашу думку, це пов'язане з тим, що накладання пов'язки з маззю створювало умови для розмокання поверхні рани, уповільнення процесу регенерації тканин.

Лейкоцитоз у крові зберігався лише у тварин 2—ї групи — кількість лейкоцитів до $13,6 \times 10^9$ в 1 л. У тварин всіх груп нормалізувався розподіл форм лейкоцитів.

При аналізі імунних показників виявлене збільшення ФІ та ФЧ, а також показників іРБТЛ тільки у тварин 3—ї та 4—ї груп. При застосуванні мазі Солкосерил зміни цього показника не спостерігали.

На 21—шу добу експерименту у більшості тварин 3—ї та 4—ї груп ТВ повністю загоїлися, проте, шерстяний покрив в усі строки спостереження (до 45 днів) не відновився. Всі тварини проходили тест "помилки ніг" без хибних кроків. У тварин 2—ї

та 5—ї груп площа виразки становила у середньому близько 7 мм²; вони робили по 3 хибні кроки на тест—драбині. Імунні показники не відрізнялися від таких на 14—ту добу спостереження.

На 28—му добу всі тварини 3—ї та 4—ї груп повністю одужали, у 2—ї і 5—ї групах одужали 86% мишей. У тварин площа незагоєних виразок становила у середньому 0,5 — 0,8 мм²; вони робили по одному хибному кроку.

За результатом аналізу імунних показників у тварин 3—ї та 4—ї груп виявлене вірогідне зменшення ФІ, ФЧ, а також здатності лімфоцитів до бласттрансформації. У тварин 2—ї та 5—ї груп ці показники не відрізнялися від таких на 14—ту та 21—шу добу спостереження і були вірогідно меншими, ніж у тварин 3—ї та 4—ї груп.

Таким чином, у тварин з ТВ, яких лікували з застосуванням кріоконсервованих фрагментів хоріальної та амніотичної оболонок, функціональна активність ушкодженої кінцівки повністю відновлювалася значно раніше, відбувалася активація клітинної ланки імунної системи, що зумовлювало припинення запального процесу в організмі. Раніше було показано, що використання кріоконсервованих хоріальної та амніотичної оболонок як укриття ТВ стимулює активну проліферацію та диференціацію фібробластів в ділянці рани, що відбувається одночасно з ангіогенезом та сприяє росту грануляційної тканини, загоєння відбувається без утворення грубих келоїдних рубців [8]. Після закриття рани активізується репарація у ТВ, що характеризується нормалізацією структури шкіри, утворенням ніжної волокнистої сполучної тканини у ділянці виразки, її повноцінної епітелізацією. За даними гістологічного дослідження країв і дна моделюваної ТВ, у мишей 2—ї та 5—ї груп виявлені виражені порушення мікроциркуляції, дистрофія, слаба проліферативна здатність фібробластів (що в умовах хронічного запалення набувала ознак неповної грануляційної тканини з схильністю до вторинного некрозу), грубі трофічні

розлади, що повільно зникали через патологічну регенерацію.

Отже, запропонований метод лікування ТВ у модельному експерименті виявився ефективним. Засто-

сування кріоконсервованих фрагментів хоріальної та амніотичної оболонки у вигляді укриття виразкового дефекту сприяло зменшенню тривалості загоєння виразки, від-

новленню функціонування кінцівки, протизапальна та імуностимулююча дія більш виражені, ніж препарату порівняння — Солкосерилу.

ЛІТЕРАТУРА

1. The VCP Coordinators Epidemiology of chronic venous disorders in geographically diverse populations: results from the Vein Consult Program // E. Rabe, J. J. Guex, A. Scuderi, F. Fernandez Quesada // *Int. Angiol.* — 2012. — Vol. 31, N 2. — P. 105 — 115.
2. Хроническая рана: обзор современных методов лечения / В. Н. Оболенский // *РМЖ.* — 2013. — Т. 21, № 5. — С. 282 — 289.
3. Комплексный подход в лечении обширных трофических язв голени в многопрофильном стационаре / Ю. Л. Шевченко, Ю. М. Стойко, В. Г. Гудымович, А. К. Иванов // *Вестн. эксперим. и клин. хирургии.* — 2014. — Т. 7, № 3. — С. 221 — 227.
4. Litwiniuk M. Amniotic membrane: new concepts for an old dressing / M. Litwiniuk, T. Grezla // *Wound Repair Regeneration.* — 2014. — Vol. 22, N 4. — P. 451 — 456.
5. Safety of placental, umbilical cord and fetal membrane explants after cryopreservation / V. Yu. Prokopyuk, O. S. Prokopyuk, I. B. Musatova [et al.] // *Cell and Organ Transplantation.* — 2015. — Vol. 3, N 1. — P. 34 — 38.
6. Пат. 100068 А Україна, МПК G09B 23/28. Спосіб моделювання нейротрофічних виразок / В. Ю. Прокопюк, О. С. Прокопюк, Н. О. Шевченко [та ін.] (Україна); заявник і власник патенту ІПКіК НАН України. — № u201413722; заявл. 22.12.14; опубл. 10.07.15. Бюл. № 13.
7. Stratification substantially reduces behavioral variability in the hypoxic—ischemic stroke model / J. Pollak, K. P. Doyle, L. Mamer, M. Shamloo // *Brain and Behavior.* — 2012. — Vol. 2, N 5. — P. 698 — 706.
8. Влияние кріоконсервированных плодовых оболочек на структуру моделированной трофической язвы / А. А. Роечко, В. Ю. Прокопюк, В. В. Волина [и др.] // *Морфология.* — 2015. — Т. 9, № 2. — С. 69 — 77.

