

## Изучение возможности биостимуляции заживления ожоговых ран суспензией свежевыделенных и криоконсервированных мезенхимальных эмбриональных клеток

Е.Б. РЕВЕНКО, А.Ю. ПЕТРЕНКО, Е.И. ГОНЧАРУК, Н.А. ВОЛКОВА, Т.Ф. ПЕТРЕНКО, В.В. ВОЛИНА  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Study of Biostimulation Effect in Burn Healing with Suspension of Freshly Isolated and Cryopreserved Mesenchymal Embryonic Cells

E.B. REVENKO, A.YU. PETRENKO, E.I. GONCHARUK, N.A. VOLKOVA, T.F. PETRENKO, V.V. VOLINA  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Изучали влияние суспензии свежевыделенных и криоконсервированных мезенхимальных эмбриональных клеток (МЭК) на активность репаративных процессов в ожоговой ране. Полученные результаты показали, что жизнеспособные свежевыделенные и криоконсервированные эмбриональные клетки обладают способностью ускорять процессы реэпителизации раневого дефекта. Особенности их действия являются отсутствие грубого струпа в процессе восстановления кожного покрова и формирование косметической рубцовой ткани.

**Ключевые слова:** мезенхимальные эмбриональные клетки, криоконсервирование, ожоговая рана, репаративные процессы.

Вивчали вплив суспензії свіжовиділених і криоконсервованих мезенхімальних ембріональних клітин на активність репаративних процесів в опіковій рані. Отримані результати показали, що життєздатним свіжовиділеним і криоконсервованим ембріональним клітинам властива здатність прискорювати процеси реепітелізації ранового дефекту. Особливостями їх дії є відсутність грубого струпа в процесі відновлення шкіряного покриву та формування косметичної рубцевої тканини.

**Ключові слова:** мезенхімальні ембріональні клітини, криоконсервування, опікова рана, репаративні процеси.

The influence of both freshly isolated and cryopreserved mesenchymal embryonic cells (MEC) on reparative process activity in a burn wound was studied. Obtained results have shown the viable freshly isolated either cryopreserved embryonic cells are capable of accelerating the wound defect re-epithelization processes. No rough scar during the skin recovery process and cosmetic cicatrix tissue formation are peculiar for their effect.

**Key-words:** mesenchymal embryonic cells, cryopreservation, burn wound, reparation processes.

Несмотря на то, что закономерности заживления ран различной этиологии в клинике и эксперименте изучали многие авторы [1, 9], вопрос механизмов восстановительных процессов заживления ран остается актуальным.

Современная медицина использует большое количество биотехнологических методов для лечения ожоговых ран: коллагенопластика, пластика криоконсервированной ксенокожей, применение различных биополимеров, но эти методы далеко не всегда обеспечивают полноценное заживление дефектов кожного покрова [3].

Накоплен значительный положительный опыт по лечению ожоговых ран методами клеточной терапии путем введения в зону ожоговой травмы аллогенных культивированных клеток – кератиноцитов и фибробластов взрослого человека [7].

В отличие от клеток взрослого организма эмбриональные клетки обладают более высоким пролиферативным потенциалом, способны к мультипотентной дифференцировке в ответ на стимулы окружающей среды, они пластичны и вызывают меньшую иммунную реакцию со стороны организ-

Despite the fact that peculiarities of wound healing of different etiology in clinics and experiment have been studied by a number of authors [1, 9] the question on the mechanisms of recovering processes in wound healing has still remained unsolved.

Current medicine applies a great many biotechnological processes for burn treatment: collagenoplastics, plastics with cryopreserved xenoskin, use of various biopolymers, although those methods not always provide a complete healing of a skin surface defect [3].

There has been accumulated a considerable positive experience on burn treatment using the methods of cell therapy by injecting allogeneic cultured cells: adult human keratinocytes and fibroblasts [7].

In contrast to an adult organism the embryonic cells are known to possess higher proliferative potential, capable of multipotent differentiation in response to environmental stimuli, they have the properties of plasticity and cause less intense immune response in a recipient [8, 12]. Also, embryonic cells comparing to those derived from adults, comprise and produce a greater amount of various growth factors, antioxidants,

**Адрес для корреспонденции:** Ревенко Е.Б., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-11-19, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

**Address for correspondence:** Revenko E.B., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 772 1119, fax: +380 57 772 0084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

ма реципиента [8, 12]. Кроме этого, эмбриональные клетки содержат и продуцируют больше, чем клетки взрослого организма, различных ростовых факторов, антиоксидантов, противовоспалительных соединений, регуляторных пептидов. Обладая мощным биологическим потенциалом, быстрее и активнее вовлекая ресурсы организма реципиента [13], эмбриональные клетки предположительно могут воздействовать и на процессы репарации. Вышеперечисленные их свойства позволяют рассматривать как перспективный объект клеточной терапии для лечения ожоговых ран.

Разработанный в ИПКиК клеточный иммунобиологический препарат “Мезоклетки” – это гетерогенная клеточная суспензия эмбриона человека 7-12 недель гестации [11]. Первичная суспензия этих клеток представлена предшественниками различной степени дифференцировки мезодермального, эктодермального и эндодермального ростков гистогенеза, что обеспечивает значительный биологический резерв для формирования любой ткани, в том числе и кожного покрова.

Криоконсервирование суспензии МЭК дает возможность накапливать их в низкотемпературных банках, сохраняя высокую биологическую активность и жизнеспособность до момента использования [4].

До настоящего времени исследования по изучению эффективности применения свежесыведенных и криоконсервированных МЭК при лечении ожогов не проводились.

Объектом широкого обсуждения специалистов в области клеточной и тканевой терапии является вопрос репаративной роли живых МЭК в реализации клинического эффекта. Для выяснения данного вопроса в настоящей работе, наряду со свежесыведенными и криоконсервированными МЭК, использовали нежизнеспособные (разрушенные).

Цель работы – сравнительное изучение влияния суспензии свежесыведенных, криоконсервированных и нежизнеспособных МЭК на заживление экспериментальных ожоговых ран у крыс.

### **Материалы и методы**

Клетки получали путем мягкой ферментативной и механической дезагрегации мягких тканей эмбрионов человека 7-12 недель гестации. Для иммобилизации клетки при нанесении на раневую поверхность были заключены в метилцеллюлозный гель [8]. Криоконсервирование клеточной суспензии проводили по 3-этапной программе с использованием 5%-го раствора ДМСО как криопротектора [5]. Жизнеспособность клеток в суспензии определяли методом суправитального окрашивания трипановым синим [6]. Для свежесыведенных, регуляторных пептидов.

antiinflammatory compounds, regulatory peptides. Possessing a strong biological potential and more actively involving the recipient's potential, embryonic cells are also thought to affect the reparation processes. The mentioned above properties allow us to consider them as a perspective object of cell therapy for burn treatment.

“*Mesocells*”, immunobiological cell preparation elaborated at the Institute is a heterogenous cell suspension derived from 7-12 weeks' human embryos [11]. The primary suspension of these cells is represented by the precursors of various differentiation degree of mesoderm, ectoderm and endoderm histogenesis lineages, thus providing a wide biological stock for any tissue formation, including skin.

Cryopreservation of MEC suspension enables us to accumulate them in low temperature banks while maintaining a high biological activity and viability up to the moment of their use [4].

No studies have been carried out yet on the efficacy of freshly isolated and cryopreserved MEC application for burns treatment.

The question on living MEC reparative role in achieving clinical effect has been the object of a wide discussion among the experts in the field of cell and tissue therapy. To find out whether it is true along with freshly isolated and cryopreserved cells we also used non-viable (damaged) ones.

Comparative study of the effect of freshly isolated, cryopreserved and non-viable MEC suspensions on experimental burn healing in rats was the aim of research.

### **Materials and methods**

Cells were procured by mild enzymic and mechanical desaggregation of human embryos soft tissues of 7-12 gestation weeks. To immobilize the cells while applying over a wound surface they were included in methyl cellulose gel [8]. Cell suspension cryopreservation was accomplished according to a 3-step program using 5% DMSO solution as a cryoprotectant [5]. Cell viability in suspension was evaluated by the method of trypan blue supravital staining [6]. For freshly isolated MEC this index made 80-85%, for frozen-thawed ones it was not less than 50%.

The work was accomplished in 60 mature breedless white male rats of 150-200g in those there was modeled a 3<sup>rd</sup> grade thermal burn. Metal plate (2.5×2.5 cm) heated up to 200°C [10] was placed for 8 seconds to a epilated skin area in the back of animals being under ether narcosis.

The animals were afterwards divided into 4 experimental groups. The first, the control one composed the rats with non-treated burns, the second group contained the animals to those in 24 hours after trauma

выделенных МЭК она составляла 80-85, для де-консервированных – не менее 50%.

Работа выполнена на 60 половозрелых самцах беспородных белых крыс массой 150-200 г, у которых моделировали термический ожог III степени. Животным под эфирным наркозом к эпилированной коже в области спины на 8 с прикладывали металлическую пластинку размером 2,5×2,5 см, доведенную до 200°C [10].

Затем животные были разделены на 4 экспериментальные группы. Первую (контрольную) группу составили крысы с ожоговыми ранами, которые не обрабатывали. Вторую – животные, на ожоговую поверхность которых через 24 ч после травмы наносили суспензии нежизнеспособных МЭК (полученные 3-кратным замораживанием в жидком азоте с последующим отогревом). В 3-й и 4-й группах животных через сутки после нанесения ожога раны обрабатывали суспензией свежесыделенных и криоконсервированных МЭК соответственно.

Вся работа с животными проводилась в соответствии с положениями IV Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для научных целей ETS 123 (1986). Животных содержали в стандартных условиях вивария 4 недели, проводили визуальное наблюдение за динамикой заживления ожоговых ран, площадь которых измеряли на 3-и, 7-е, и 14-е сутки. При статистической обработке полученных результатов использовали пакет компьютерных программ Microsoft Excel и Statistic.

На 3-и, 7-е, и 14-е сутки животных выводили из эксперимента передозировкой эфирного наркоза. Из кожи, взятой в области раны, готовили гистологические препараты. Участки кожи фиксировали в 10%-м нейтральном формалине, затем заливали в целлоидин. Срезы толщиной 6-8 микрон окрашивали гематоксилином и эозином [6]. Микроскопию проводили в световом микроскопе ЛОМО.

### Результаты и обсуждение

Клинические наблюдения показали, что у животных как контрольной группы, так и у тех, которым вводили нежизнеспособные МЭК, отмечалась обильная плазморея по всей поверхности раны, а в некоторых случаях – отделение гнойного экссудата. При заживлении раневой поверхности образовывался грубый струп, который наблюдался до 14-х суток эксперимента. В то же время у крыс 3-й и 4-й групп уже к 7-м суткам имела место усиленная васкуляризация раневой поверхности, плазморея была резко снижена по сравнению с 1-й и 2-й группами. Характерным для животных 3-й и 4-й групп было заживление ран с образованием

the non-viable MEC suspensions (obtained by three-fold freezing in liquid nitrogen followed by thawing) were placed on a burn surface. In the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> animals groups in a day after a burn modeling the wounds were treated with the suspension of freshly isolated MEC and cryopreserved ones, correspondingly.

All the research in animals was done with keeping the regulations of the IV European Convention on vertebrates protection used for scientific aims ETS 123 (Strasbourg, 1986). Animals were kept under standard vivarium conditions for 4 weeks, and being visually watched at, especially the dynamics of burns healing, the areas of which were measured by the 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> days after cell suspension treatment. At statistical processing of obtained results there was used the package of Microsoft Excel and Statistic software. By the 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day the animals were withdrawn out of experiment by ether narcosis overdosage. Skin of a wound area was taken to prepare histological preparations. Skin sites were fixed in 10% neutral formalin with further embedding in celloidine. Slices of 6-8 μm were stained by hematoxylin and eosin [6]. Microscopy was done by LOMO light microscope.

### Results and discussion

Clinical observations have demonstrated that both in the 1<sup>st</sup> group animals and in those with non-viable MEC there was noted considerable plasmorrhoea along the wound surface, and in some cases purulent exudate separation. At a wound surface healing a rough crust was formed, which was observed by the 14<sup>th</sup> day of experiment. At the same time in the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> group rats an intense vascularisation of a wound surface was observed even by the 7<sup>th</sup> day, plasmorrhoea was greatly decreased comparing to the 1<sup>st</sup> and the 2<sup>nd</sup> groups. Wound healing with tender semi-transparent film-like crust formation was characteristic for the animals of the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> groups. It should be noted that in 86% of the 3<sup>rd</sup> group animals granulation tissue epithelisation along the wound surface was noticed in the place of burn even by the 7<sup>th</sup> day.

Healing process of burns was judged about on the reduction of wound surface area (Fig. 1). We observed a slight statistical difference in burn wound area in various animal groups by the 3<sup>rd</sup> day of experiment. Slight statistical difference in burn area was observed by the 3<sup>rd</sup> day in different animal groups. By the 7<sup>th</sup> day there was noted a 5-fold reduction of wound surface in the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> group animals comparing to those of the 1<sup>st</sup> group, where we used the damaged cells. The 3<sup>rd</sup> group had the burn surface lessening more manifested comparing to the 4<sup>th</sup> one.

By the 14<sup>th</sup> day in the majority of cases among the 3<sup>rd</sup> group animals we noted the adhesion of wound borders with thin cicatrix formation.



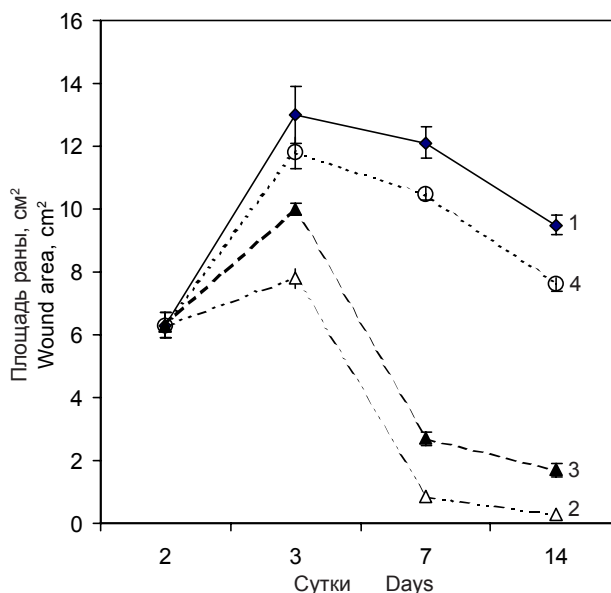
струпа в виде тонкой и нежной полупрозрачной пленки. Следует отметить, что у 86% животных 3-й группы уже на 7-е сутки на месте ожога наблюдалась эпителизация грануляционной ткани по всей раневой поверхности.

О процессе заживления ожоговых ран судили по скорости сокращения площади раневой поверхности (рис.1). Так, на 3-и сутки эксперимента наблюдалось небольшое статистическое отличие в площади ожоговых ран у разных групп животных. На 7-е сутки эксперимента было отмечено сокращение площади ожоговой поверхности у животных 3-й и 4-й групп в 5 раз по сравнению с 1-й группой, в которой применяли разрушенные клетки, в 3-й группе животных сокращение площади ожоговой поверхности было более выражено по сравнению с 4-й. Уже к 14-м суткам у животных 3-й группы в большинстве случаев наблюдалось сращение краев раны с образованием тонкого рубца.

У животных 1-й и 2-й групп к 14-м суткам площадь раневой поверхности оставалась на уровне 80% от первоначальной с образованием плотного струпа темно-коричневого цвета.

Гистологическое исследование экспериментального материала показало, что в 1-й группе на 3-е сутки после ожога в коже животных обнаруживались дистрофические и некротические изменения, характеризующиеся резким пикнозом ядер в клетках эпидермиса и дермы, гибелью всех слоев эпидермиса, клеток волосяных фолликулов, клеточных элементов сосочкового и сетчатого слоев дермы, а также мышечных волокон собственной мышцы кожи; полное разрушение волокнистых структур дермы; сильная воспалительная реакция, выражающаяся в инфильтрации некротически измененных участков мононуклеарами и макрофагами и, как следствие этого, слабое развитие грануляционной ткани к 14-м суткам (рис. 2). Аналогичная картина наблюдалась и у животных 2-й группы.

Картина заживления ожоговых ран при их обработке суспензией свежевыделенных МЭК в 3-й группе животных существенно отличалась от 1-й. Так, при гистологическом исследовании особенностей течения репаративного процесса в зоне раневого дефекта уже на 7-е сутки обнаруживалась формирующаяся, а к 14-м суткам зрелая грануляционная ткань с большим количеством микрососудов и капилляров (рис.3). Лимфоидная инфильтрация ткани не наблюдалась, в то же время отмечалось увеличенное количество клеток фибробластического ряда, небольшое количество лимфоцитов, а также нейтрофилов. Уже к 14-м суткам в половине наблюдений обнаруживалось ускорение эпителизации раневого дефекта с начинающейся

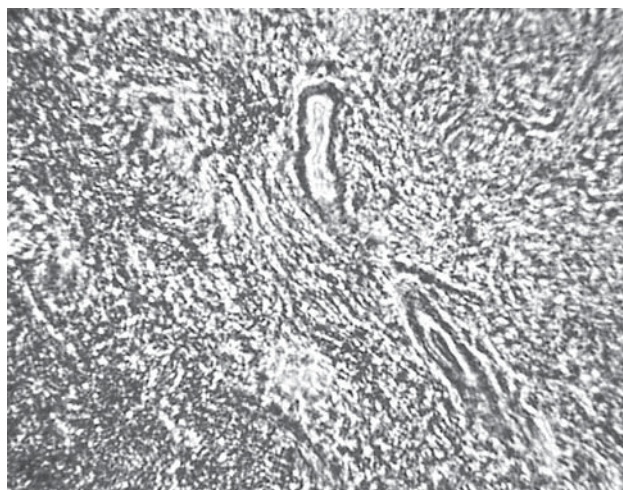


**Рис.1.** Скорость сокращения раневой поверхности. 1 – контроль; 2 – свежевыделенные клетки; 3 – криоконсервированные; 4 – нежизнеспособные.

**Fig. 1.** Rate of wound surface reduction. 1 – control; 2 – application of freshly isolated cells; 3 – application of cryopreserved cells; 4 – application of non-viable cells.

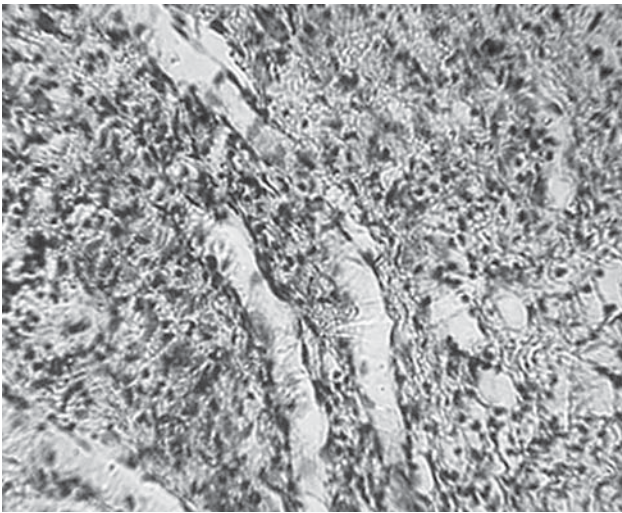
In those of the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> groups the wound surface area by the 14<sup>th</sup> day remained at the level of 80% of the primary one with dense dark brown crust formation.

Histological study of the experimental material showed dystrophic and necrotic alterations to occur in the 1<sup>st</sup> group on the 3<sup>rd</sup> day of burn, which were characterized by an intense nuclei pyknosis in epidermal and dermal cells, death of all epidermis layers, hair



**Рис. 2.** Интенсивная лейкоцитарная инфильтрация зоны ожогового некроза в контрольной группе на 14-е сутки после ожога. Слабое развитие грануляционной ткани. Окраска гематоксилин - эозином.  $\times 120$ .

**Fig. 2.** An intense leukocyte infiltration in burn necrosis area in control group on the 14<sup>th</sup> day after burn. Weak development of granulation tissue. Hematoxylin-eosin staining.  $\times 120$ .



**Рис. 3.** Зрелая грануляционная ткань с интенсивной васкуляризацией и новообразованными коллагеновыми волокнами на 14-е сутки после обработки ожога суспензией свежeweделенных МЭК. Окраска гематоксилин - эозином.  $\times 120$ .

**Fig. 3.** Mature granulation tissue with an intense vascularisation and newly formed collagen fibers on the 14<sup>th</sup> day after a burn treatment by freshly isolated MEC suspension. Hematoxylin-eosin staining.  $\times 120$ .

дифференциацией эпидермиса на слои и с большим количеством эпителиальных клеток, в цитоплазме которых было увеличенное количество гранул кератогиалина, что свидетельствует об активизации синтетических процессов.

В 4-й группе животных, ожоговые раны которых обрабатывали суспензией криоконсервированных МЭК, также имело место положительное, в сравнении с 1-й и 2-й группами, течение репаративного процесса. Значительное на 7-е сутки уменьшение в области ожога плотности клеток, в том числе и лейкоцитарного ряда, свидетельствует о более слабой, чем в контроле, воспалительной реакции. Новообразованный эпителиальный пласт был утолщен незначительно по сравнению с прилегающими участками. В нем обнаруживалась дифференциация клеток эпителия с формированием характерных слоев. Кератиноциты содержали гранулы кератогиалина. В зоне ожога на 14-е сутки в зрелой грануляционной ткани клетки фибробластического ряда в большинстве случаев располагались параллельно новообразованным пучкам коллагеновых волокон, формирующих дерму в данном участке (рис.4).

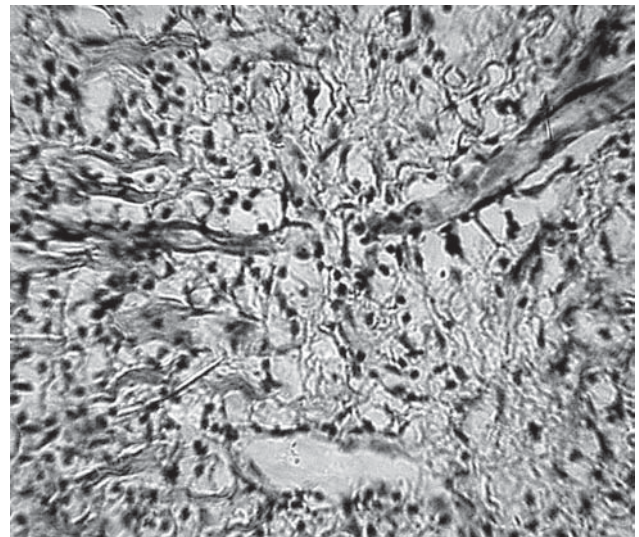
Иными словами, обнаруживались морфологические изменения, свидетельствующие о диффузной или очаговой регенерации. На это указывали: умеренный пикноз ядер клеток фибробластического ряда; сохранение глубоких слоев эпидермиса, части клеточных элементов дермы и части мышечных волокон собственной мышцы

follicle cell, cell elements of papillary and reticular derma layers, as well as muscular fibers of skin own muscle; overall damage of derma fibrous structures; strong inflammatory reaction manifested in infiltration of necrotically altered by mononuclears and macrophages sites and, as a result, a weak granulation tissue development by the 14<sup>th</sup> day (Fig. 2). Similar picture was also observed in the 2<sup>nd</sup> group animals.

Burn healing picture during wound treatment by freshly isolated MEC suspension in the 3<sup>rd</sup> group animals was found to differ dramatically from the 1<sup>st</sup> one. Thus during the histological study of reparation process the peculiarities in a wound defect zone already by the 7<sup>th</sup> day we observed the forming tissue, and by the 14<sup>th</sup> day the mature granulation one with a number of microvessels and capillaries (Fig.3). No tissue lymphoid infiltration was observed, although at the same time we noted an increased amount of fibroblast lineage cells, small number of lymphocytes, as well as neutrophiles. By the 14<sup>th</sup> day in half of observations we noted the acceleration of a wound defect epithelisation with the beginning of epidermal differentiation onto the layers and with higher amount of epithelial cells, in cytoplasm of which there was an increased amount of keratohyalin granules, that proves the synthetic processes activation.

In the 4<sup>th</sup> group, where the burns were treated with cryopreserved MEC suspension there also occurred a positive reparation course comparing to groups 1 and 2.

Considerable cell density decrease in burn area, also of leukocyte lineage, proves a weaker in-



**Рис. 4.** Созревающая грануляционная ткань с формированием коллагеновых волокон на 14-е сутки после обработки ожога суспензией криоконсервированных МЭК. Окраска гематоксилин-эозином.  $\times 120$ .

**Fig. 4.** Granulation tissue is getting mature with collagen fibers formation by the 14<sup>th</sup> day after a burn treatment by cryopreserved MEC suspension. Hematoxylin-eosin staining.  $\times 120$ .



кожи. Наблюдались слабо выраженная инфильтрация некробиотически измененных участков лейкоцитами и формирование зрелой грануляционной ткани. В этом случае заживление заканчивалось к 14-м суткам с диффузным восстановлением структур кожи. Отличительной его чертой явилась повторная эпителизация раневого дефекта.

Подводя итоги гистологического исследования репаративной активности суспензии свежeweделенных и криоконсервированных МЭК на модели ожоговых ран в сравнительном аспекте, можно с уверенностью утверждать, что применение суспензий как свежeweделенных, так и криоконсервированных МЭК уменьшает проявления воспалительной реакции, вызывает ускоренное формирование зрелой грануляционной ткани, богатой микрососудами и капиллярами, стимулирует реэпителизацию раневого дефекта, способствует формированию тонкой и нежной рубцовой ткани и, как следствие этого, косметичному заживлению ран.

При использовании суспензии криоконсервированных МЭК, несмотря на меньшее количество в ней жизнеспособных клеток, наблюдалось протекание репаративных процессов, сходное с применением свежeweделенных МЭК.

Можно предположить, что в основе действия клеточного трансплантата на репаративную регенерацию поврежденных тканей лежит реализация биологического потенциала клеток и ресурсов организма реципиента. Обнаруженное в цитоплазме эпителиальных клеток увеличенное количество кератогиалина свидетельствует об активизации синтетических процессов в ходе заживления ран. Известно, что кератиноциты способны продуцировать множество медиаторов воспаления и иммунного ответа. Под действием раздражающего стимула (гипоксия, травма, УФ-облучение и др.) они продуцируют колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов, тромбоцитарный фактор роста, фактор роста фибробластов и другие факторы [2].

## Выводы

1. МЭК стимулируют заживление ран после экспериментального ожога.

2. Клинические и гистологические исследования показали, что способностью стимулировать заживление ожоговых ран обладают как жизнеспособные свежeweделенные, так и криоконсервированные МЭК. Нежизнеспособные МЭК не оказывают влияния на регенерацию поврежденных тканей после ожога, и заживление происходит с образованием грубого струпа на поверхности раны и гипертрофированной рубцовой ткани, выполняющей раневую дефект.

inflammation reaction than in the control. The newly formed epithelial layer was slightly thickened comparing to the adjacent sites. We noted epithelium cell differentiation in it with characteristic layers formation. Keratinocytes contained keratinohyalin granules. By the 14<sup>th</sup> day the fibroblast lineage cells in mature granulation tissue in burn area were mainly located in parallel to newly-formed collagen fascicles, forming derma in this site (Fig. 4).

By other words, there were found morphological alterations which proved the diffuse and focal regeneration. All this was indicated by a moderate pyknosis of fibroblast lineage cell nuclei; preservation of deep epidermal layers, of a part of derma cellular elements and some of muscular fibers of own skin muscle. We noted a slightly manifested infiltration of necrobiotically altered by leukocytes sites and mature granulation tissue formation. In this case healing finished by the 14<sup>th</sup> day with a diffuse recovery of skin structures. Its characteristic trait was manifested in a wound defect repeated epithelisation.

Assuming the histological study of a reparative activity of freshly isolated and cryopreserved MEC in the model of burn wound in a comparative aspect, we can state both the application of freshly isolated and cryopreserved MEC suspensions to decrease the inflammatory reaction manifestation, cause an increased formation of mature granulation tissue enriched with microvessels and capillaries, to stimulate re-epithelisation in a wound defect, promote thin and tender scar tissue and, as a result, a wound cosmetic healing.

When using the cryopreserved MEC suspension, despite the less amount of viable cells in it we observed the reparation process course similar to the one when using freshly isolated MEC.

We may suppose the cell transplant effect on reparative regeneration of damaged tissue is based on realisation of cell biological potential and an a recipients' organism resources. Being found in epithelial cell cytoplasm an increased amount of keratoglyaline testifies to the synthetic processes activation during wound healing. Keratinocytes are known to be capable of producing a number of mediators for an inflammation and immune response. Under the effect of either hypoxia, trauma or UV-irradiation they produce granulocyte and macrophage colony stimulating factor, thrombocyte growth factor, fibroblasts growth factor and other factors [2].

## Conclusions

1. MEC are found to stimulate the wound healing after an experimental burn.

2. Clinical and histological studies show both freshly isolated viable cells and cryopreserved MEC are

3. Особенностью действия жизнеспособных МЭК является отсутствие грубого струпа и келоидного рубца.

4. Стимуляция репаративных процессов в области ожоговой раны введением свежeweыделенных и криоконсервированных МЭК может явиться основой для разработки новых эффективных методов в комбустиологической практике.

capable of stimulating burn healing. Non-viable MEC do not influence damaged tissue regeneration after burn, and healing occurs with rough crust formation on a wound surface and hypertrophied scar tissue filling in wound defect.

3. Viable MEC are characterized by the absence of both rough crust and keloid cicatrix.

4. Reparation process stimulation in burn area by injecting either freshly isolated or cryopreserved MEC may be the background for elaboration of novel effective methods in practical combustiology.

## Литература

1. *Волина В.В.* Деструктивные и восстановительные процессы после действия низких температур в нормальной и обожженной коже: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Харьков, 1982. – 23 с.
2. *Гистология (введение в патологию)* / Под. ред. Э.Г. Улумбекова, Ю.А. Чебышева. – М.: ГЭОТАР, 1997. – 960 с.
3. *Жилина Н.М., Иванов В.Б., Корень Н.Н. и др.* Сравнительный анализ кожной аутопластики традиционными методами и с использованием клеточной культуры фибробластов // Вестник новых мед. технологий. – 1997. – Т. 4. – №1. – С. 88.
4. *Криоконсервирование клеточных суспензий* / Под общ. ред. А.А. Цуцаевой. – Киев: Наук. думка, 1983. – 240 с.
5. *Культура животных клеток. Методы* / Под ред. Р. Фрешни. – М.: Мир, 1989. – 333 с.
6. *Лилли Р.* Патогистологическая техника и практическая гистохимия. – М.: Мир, 1969. – 624 с.
7. *Сологуб В.К., Донецкий Д.А., Борисов В.Я. и др.* Клиническое применение консервированных биопокрытий для ран и ожогов. – М., 1990. – С. 8.
8. *Сухих Г.Т., Малайцев В.В., Богданова И.М., Дубровина И.В.* Мезенхимальные стволовые клетки // Бюл. эксп. биол. мед. – 2002. – Т.133, №2. – Р. 124-131.
9. *Фенчин К.М.* Заживление ран. – Киев: Здоров'я, 1979. – 168 с.
10. *Хакимов З.З., Наджимутдинов К.Н., Мавлянов И.Р.* Фармакодинамика лекарственных веществ, метаболизирующихся в печени, при ожоговой травме у крыс // Фармакология и токсикология. – 1985. – №2. – С. 103-106.
11. *Пат. України №64540А*, Кл. А 61к 35/48, А 61к 35/407. Препарат "Ембриогель" для зовнішнього застосування та спосіб його отримання. О.І. Гончарук, С.В. Кошій, Т.П. Петренко, Г.О. Гапон, О.Б. Ревенко, В.І. Грищенко. Заявл. 24.06.03. Опубл. 16.02.04. Бюл. 2. – С. 4.42.
12. *Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I.* Cell surface antigens human marrow-derived mesenchymal cells mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies // Bone. – 1992. – Vol. 13. – P. 69-80.
13. *Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science. – 1999. – Vol. 284. – P. 143-147.

Поступила 22.09.2004

## References

1. *Volina V.V.* Destructive and recovery processes after the effect of low temperatures in normal and burnt skin: Author's thesis abstract of candidate of sciences (biology). – Kharkov, 1982. – 23 p.
2. *Histology (introduction into pathology)* / Ed. by Ulumbekova E.G., Chebysheva Yu.A. – Moscow: GEOTAR, 1997. – 960p.
3. *Zhilina N.M., Ivanov V.B., Koren N.N. et al.* Comparative analysis of skin autoplastics by traditional methods and using cell culture fibroblasts // Review of novel medical technologies. – 1997. – Vol.4. – N1. – P.88.
4. *Cell suspension cryopreservation* / Ed. by A.A. Tsutsaeva. – Kiev: Naukova dumka, 1983. – 240p.
5. *Animal cell culture. Methods* / Ed. by R. Freshny. – Moscow: Mir, 1989. – 333 p.
6. *Lilli R.* Pathohistological technology and practical histochemistry. – Moscow: Mir, 1969. – 624 p.
7. *Sologub V.K., Donetsk D.A., Borisov V.Ya. et al.* Clinical application of preserved biological covers for wounds and burns. Moscow, 1990. – 8 p.
8. *Sukhikh G.T., Malaytsev V.V., Bogdanova I.M., Dubrovina I.V.* Mesenchymal stem cells // Bull. Eksp. Biol. Med. – 2002. – Vol. 133, N2. – P. 124-131.
9. *Fenchin K.M.* Wound healing. – Kiev: Zdorovya, 1979. – 168p.
10. *Khakimov Z.Z., Nadzhimutdinov K.N., Mavlyanov I.R.* Pharmacodynamics of medicines metabolized in liver, at burn trauma in rats // Pharmakologia i toksikologia, 1985. – N2. – P. 103-106.
11. *Patent of Ukraine N64540A, Cl.A 61 k 35/48, A 61k 35/407.* "Embryogel" preparation for external use and way for its obtaining. E.I. Goncharuk, S.V. Koschii, T.P. Petrenko, A.A. Gapon, E.B. Revenko, V.I. Grischenko. Applied 24.06.03, issued in 16.02.04. Bul. 2, P. 4.42.
12. *Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I.* Cell surface antigens human marrow-derived mesenchymal cells mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies // Bone. – 1992. – Vol. 13. – P. 69-80.
13. *Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C. et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science. – 1999. – Vol. 284. – P. 143-147.

Accepted in 22.08.2004