



Ярец Ю.И.

Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, Гомель, Беларусь

## Значимость исследования цитотоксичности бактериальной биопленки для оценки потенциальной способности микробиоты пролонгировать воспалительную фазу раневого процесса

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Финансирование:** исследование выполнено при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (БРФФИ) в рамках темы НИР «Жизнеспособность и функциональная активность фибробластов при взаимодействии с матриксом бактериальных биопленок» (договор № М19-007 от 02.05.2019), № госрегистрации 20191399 от 19.06.2019.

Подана: 16.04.2022

Принята: 06.06.2022

Контакты: artytut@mail.ru

### Резюме

**Введение.** Проявление цитотоксичного влияния клинических штаммов бактерий на культуру фибробластов, по данным ряда авторов, отражает патогенный потенциал микробиоты, расцениваемый как фактор риска развития осложнений, сопровождающихся снижением функциональной активности или гибелью клеток. Наличие в хронической ране бактерий – продуцентов биопленки, обладающих цитотоксичностью, способно пролонгировать фазу воспаления, что определяет показания к использованию эффективных методов обработки раны.

**Цель.** Установить критерии оценки цитотоксичности матрикса бактериальной биопленки по ассоциированному с этиологической структурой микробиоты эффекту влияния биопленки на культуру фибробластов и развитие процесса воспаления.

**Материалы и методы.** Проведена оценка цитотоксического влияния компонентов матрикса биопленки бактерий, выделенных из ран, на культуру фибробластов кожи на основании использования методов исследования жизнеспособности (количества поврежденных клеток по результатам ЛДГ-теста, количества CD95+ и 7-AAD+ клеток), пролиферативной активности (времени удвоения, индекса пролиферации), а также экспрессии поверхностных иммунофенотипических маркеров: эластазы (CD10), рецептора гиалуроновой кислоты и матриксных металлопротеиназ (CD44), экто-5'-нуклеотидазы (CD73), рецептора коллагена (CD49b/CD29), регулятора адгезии и миграции (CD90), корецептора для трансформирующего фактора роста (CD105), виментина (методом проточной цитофлуориметрии).

**Результаты.** Для первичных культур фибробластов грануляционной ткани острых ран был характерен более высокий уровень экспрессии основных маркеров, отражающих иммунофенотип фибробластов, – CD44, CD90, CD73, CD10 CD49b/CD29 (более 60–80% клеток), и более низкие значения 7-AAD+ и CD95+клеток (менее 22%),

чем таковые для фибробластов хронических ран, колонизированных бактериями – продуцентами биопленки. Показатели отражают нарушение состояния фибробластов в процессе хронизации воспаления и могут быть рекомендованы в качестве критериев дифференциальной диагностики острой и хронической раны с целью обоснования соответствующей лечебной тактики. Бактериальные компоненты матрикса биопленки *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis* проявляли цитотоксичное влияние на культуру фибробластов здоровой кожи в эксперименте, что выражалось в изменении показателей пролиферативной активности (времени удвоения, индекса пролиферации, количества поврежденных клеток по результатам ЛДГ-теста), нарушении экспрессии на фибробластах CD10 (маркер эластазы), CD44 (рецептор для гиалуроновой кислоты, коллагена и матричных металлопротеиназ), CD73 (экто-5'-нуклеотидаза), CD90 (регулятор адгезии, миграции фибробластов и организации их цитоскелета), CD49b/CD29 ( $\alpha 2\beta 1$ -интегрин – рецептор коллагена), развитии апоптоза (по CD95) и гибели (по 7-AAD) фибробластов. Для практического использования лабораторного метода оценки состояния фибробластов, испытывающих на себе влияние компонентов бактериальной биопленки, разработана таблица интерпретации результатов исследования, в которой проявление цитотоксичности выражается в % от показателей контрольной пробы. Метод отражен в инструкции по применению «Метод определения фазы раневого процесса хронической язвы кожи», которая утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь 16.12.2020, рег. № 127-1220.

**Выводы.** Результаты дополнительно подтверждают вклад микробного фактора в патогенез нарушения репарации и формирования длительно не заживающей раны. Проявление цитотоксичности бактерий, выделенных из хронической раны на культуру аутологичных фибробластов, обосновывает патогенный потенциал микробиоты в плане риска развития осложнений, обусловленных биомедицинским продуктом, – снижения функциональной активности или гибели клеток. Наличие в хронической ране бактерий – продуцентов биопленки, обладающих цитотоксичностью, является критерием пролонгации фазы воспаления и определяет показания к использованию эффективных методов обработки раны для стимуляции перехода фазы воспаления в фазу регенерации.

**Ключевые слова:** бактериальная биопленка, матрикс биопленки, острая рана, хроническая рана, фибробласты, цитотоксичность, этиологическая значимость

---

Yarets Y.

Republican Scientific and Practical Center for Radiation Medicine and Human Ecology,  
Gomel, Belarus

## Significance of Studying the Cytotoxicity of Bacterial Biofilm for Assessing the Potential Ability of the Microbiota to Prolong the Inflammatory Phase of the Wound Process

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Funding:** the study was carried out with the support of The Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (BRFFR) within the framework of the research topic "Viability and functional activity of fibroblasts in interaction with the matrix of bacterial biofilms" (contract no. M19-007 dated 02.05.2019), state registration no. 20191399 dated 19.06.2019.

Submitted: 16.04.2022

Accepted: 06.06.2022

Contacts: artyut@mail.ru

### Abstract

---

**Introduction.** The manifestation of the cytotoxic effect of clinical strains of bacteria on the culture of fibroblasts, according to a number of authors, reflects the pathogenic potential of the microbiota, regarded as a risk factor for the development of complications accompanied by a decrease in functional activity or cell death. The presence of biofilm-producing bacteria with cytotoxicity in a chronic wound can prolong the inflammation phase, which determines the indications for the use of effective methods of wound debridement.

**Purpose.** To establish criteria for assessing the cytotoxicity of the bacterial biofilm matrix according to the effect of its influence on the fibroblast culture and the development of the inflammation process associated with the etiological structure of the microbiota.

**Materials and methods.** The cytotoxic effect of the components of the biofilm matrix of bacteria isolated from wounds on the skin fibroblast culture was assessed based on the use of methods for studying viability (the number of damaged cells according to the results of the LDH test, the number of CD95+ and 7-AAD+ cells), proliferative activity (doubling time, proliferation index), as well as the expression of surface immunophenotypic markers: elastase (CD10), hyaluronic acid receptor and matrix metalloproteinases (CD44), 5'-ecto-nucleotidase (CD73), collagen receptor (CD49b/CD29), adhesion and migration regulator (CD90), co-receptor for transforming growth factor (CD105), vimentin (by flow cytometry).

**Results.** Primary cultures of fibroblasts from the granulation tissue of acute wounds were characterized by a higher level of expression of CD44, CD90, CD73, CD10 CD49b/CD29 (more than 60–80% of cells) and lower values of 7-AAD+ and CD95+ cells (less than 22%) than for chronic wound fibroblasts colonized by biofilm-producing bacteria. The indicators reflect the violation of the state of fibroblasts in the process of chronic inflammation and can be recommended as criteria for the differential diagnosis of acute and chronic wounds in order to justify the appropriate treatment tactics. Components of the biofilm matrix *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis* showed cytotoxicity on healthy skin fibroblast culture in the experiment, which was expressed in a change in proliferative

activity indicators (doubling time, proliferation index, number of damaged cells according to the results of the LDH test), impaired expression on fibroblasts of the main markers (CD10, CD44, CD73, CD90, CD49b/CD29), development of apoptosis (according to CD95) and death (according to 7-AAD) of fibroblasts. For the practical use of the laboratory method for assessing the state of fibroblasts under the influence of bacterial biofilm components, a table for interpreting the results of the study was developed, in which the manifestation of cytotoxicity is expressed as % of the control. The method is reflected in the instructions for use "Method for determining the phase of the wound process of chronic skin ulcers", which was approved by the Ministry of Health of the Republic of Belarus on December 16, 2020, reg. No. 127-1220.

**Conclusions.** The results additionally confirm the contribution of the microbial factor to the pathogenesis of repair disorders and the formation of a long-term non-healing wound. The manifestation of cytotoxicity of bacteria isolated from a chronic wound on a culture of autologous fibroblasts substantiates the pathogenic potential of the microbiota in terms of the risk of developing complications associated with a biomedical product - a decrease in functional activity or cell death. The presence of biofilm-producing bacteria with cytotoxicity in a chronic wound is a criterion for the prolongation of the inflammation phase and determines the indications for the use of effective debridement methods to stimulate the transition of the inflammation to the regeneration phase.

**Keywords:** bacterial biofilm, biofilm matrix, acute wound, chronic wound, fibroblasts, cytotoxicity, etiological significance

---

## ■ ВВЕДЕНИЕ

Под цитотоксичностью принято понимать появление патологических изменений в клетках при действии физических, химических и биологических агентов. В зависимости от силы и мишени воздействия возможен широкий спектр изменений, ограниченный, с одной стороны, цитостатическим эффектом, нарушающим прохождение клетки по клеточному циклу, а с другой – цитоцидным эффектом, ведущим клетку к гибели [1].

В основе нарушения процессов репарации дермы, формирования хронической раны лежат патобиологические изменения, ассоциированные с фибробластами. Фибробласты в норме контролируют состав и структуру межклеточного матрикса: секретируют биологически активные вещества, регулирующие пролиферацию, миграцию, дифференцировку, функциональную активность других клеток. Нарушение физиологического баланса в клеточной популяции фибробластов приводит к значительным изменениям нормального процесса репаративной регенерации и нарушает заживление раневого дефекта [2].

В Республике Беларусь действуют утвержденные Министерством здравоохранения инструкции по применению методов лечения ран различной этиологии с использованием аутологичных фибробластов: «Метод комплексного лечения пациентов с длительно незаживающими ранами с применением локальной светодиодной фототерапии и аутологичных культивированных дермальных фибробластов», «Метод лечения ожогов кожи с применением аутологичных фибробластов

и кератиноцитов» [3, 4]. Согласно описанию предложенных методов лечения, перед локальным применением биомедицинского клеточного продукта предусмотрена подготовка раны, одним из критериев эффективности которой является уменьшение общего микробного числа до значения менее  $10^3$  КОЕ/мл. Среди возможных осложнений отмечены снижение функциональной активности пересаженных клеток или их гибель (частичная или полная).

Микробная нагрузка является одним из факторов, нарушающих процесс раневого заживления. Однако, судя по данным литературы, количественные критерии не всегда определяют способность изолята вызывать заболевание; при определении же этиологической значимости необходимо ориентироваться на факторы патогенности микроорганизма [5]. К настоящему времени убедительно показано, что хронические раны являются типичной патологией, ассоциированной с биопленкой. Исследованиями многих авторов установлена трансформация бактерий из планктонной формы в биопленку, и доказана ее первостепенная патогенетическая роль в задержке раневого заживления [6]. Для хронической раны характерно состояние пролонгированного патологического воспаления, нарушение эпителиальной миграции и роста грануляционной ткани, что обусловлено повреждающим действием компонентов биопленки на клетки соединительной ткани [7].

Бактериальные биопленки состоят из ряда структур, в число которых входят клетки и окружающий их внеклеточный матрикс. Биопленочный матрикс определяют как биохимически активную систему, представляющую собой «резервуар ферментов», которые используются бактериями для адгезии/колонизации, инвазии и агрессии. Высвобождаясь во внутреннее пространство биопленки, ферменты микробной агрессии адсорбируются структурами матрикса, создавая тем самым патогенный потенциал биопленки [8]. Экспериментальными исследованиями показано действие матрикса биопленки *S. aureus* на миграцию, жизнеспособность, морфологию и индукцию апоптоза культуры фибробластов. Обнаружено также изменение уровня секреции фибробластами биологически активных веществ – цитокинов (интерлейкина-6, интерлейкина-8, фактора некроза опухоли), эндотелиального сосудистого и трансформирующего факторов роста, матриксных металлопротеиназ [9].

Бактериальная биопленка способна глубоко проникать в ткани, что объясняет сочетание наличия бактерий в толще грануляционной ткани с морфологическими признаками хронического воспаления и нарушения пролиферации [7, 10]. Использование различных способов подготовки ран способно влиять на качественный состав микрофлоры [11], а изменение метаболической активности бактерий, находящихся в составе биопленки, обуславливает вариабельность микробного числа по результатам посева образцов из ран, а также выделение значимых микроорганизмов после их дополнительного культивирования в среде обогащения [12].

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установить критерии оценки цитотоксичности матрикса бактериальной биопленки по ассоциированному с этиологической структурой микробиоты эффекту ее влияния на культуру фибробластов и развитие процесса воспаления.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явились фибробласты, выделенные из образцов грануляционной ткани (n=26) локальных раневых дефектов пациентов. Пациенты находились на лечении в ожоговом отделении ГУЗ «Гомельская городская клиническая больница № 1» с 2019 по 2020 г. В зависимости от срока существования раны все пациенты были разделены на 2 группы. В группу 1 (n=9) были включены пациенты с острыми ранами (ОР), со сроком существования раны от 10 до 21 суток. Группу 2 (n=17) составили пациенты с хроническими ранами (ХР) со сроком существования раны от 22 суток до 2 месяцев и более. Дефекты покровных тканей тела были представлены посттравматическими ранами (возникшими вследствие механических травм, термических ожогов); постнекротическими ранами (причинами которых явились гнойно-воспалительные заболевания кожи и подлежащих тканей); трофическими язвами (локализующимися на культиях нижних конечностей после длительного ношения протеза).

Пациенты исследуемых групп были сопоставимы по возрасту, полу, этиологии и локализации ран. Возраст пациентов колебался от 29 до 83 лет; из 26 пациентов было 16 мужчин (61,54%) и 10 женщин (38,46%). Образцы грануляционной ткани получали на амбулаторном этапе во время перевязки раны. Для сопоставления данных и проведения экспериментального исследования, которое заключалось в оценке цитотоксичности бактериальной биопленки, использовали фибробласты из образцов здоровой кожи (n=20) (группа сравнения), утилизируемых в процессе проведения пластических операций (блефаропластика).

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ГУ «РНПЦ РМиЭЧ» (протокол № 3 от 06.06.2019). Культивирование фибробластов выполнялось в условиях клиничко-диагностической лаборатории ГУ «РНПЦ РМиЭЧ». Для получения первичных культур использовали метод механической дезагрегации (метод эксплантатов).

Образцы ткани, измельченные скальпелем до размеров примерно 1–3 мм<sup>2</sup>, переносили на культуральные чашки Петри размером 35 мм, накрывали покровным стеклом и культивировали в 1 мл среды, состоящей из 90% DMEM, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, с добавлением раствора антибиотиков (концентрации 100 мг/л гентамицина, 100 мг/л ванкомицина, 50 мг/л амфотерицина В). Смена среды проводилась каждые 2–3 суток. После получения радиального роста фибробластов по периметру кожных фрагментов и образцов грануляционной ткани с формированием монослоя проводили субкультивирование фибробластов в новые чашки Петри. Для перевода клеток в суспензию монослой обрабатывали раствором трипсина (2,5 г/л) с раствором Версена (0,25 г/л) (в соотношении 1:3). Для пересева культуры применяли суспензию с концентрацией клеток 5×10<sup>4</sup>/мл. Пассаж проводили при достижении клетками 75–100%-ной конфлюэнтности. У фибробластов, выращенных из кожи и грануляционной ткани раны, определяли поверхностные иммунофенотипические маркеры с помощью проточной цитофлуориметрии. Клеточную суспензию фибробластов в количестве 3,5×10<sup>6</sup>кл / 1 мл фосфатно-солевого буфера инкубировали с панелью CD-маркерных моноклональных антител с флуорохромами. Измерения проводили с использованием проточного цитофлуориметра FACSCanto II с программным обеспечением FACSDiva (Becton Dickinson, США).

Кластеры дифференцировки (cluster of differentiation, CD) представляют собой специфические белки на поверхности клеточной мембраны, которые участвуют в различных каскадах сигнальных путей и способствуют взаимодействию клеток друг с другом. В большинстве случаев это лиганды, или рецепторы, либо белки клеточной адгезии. Для идентификации фибробластов и дифференциации их от других клеточных популяций оценивали следующие маркеры: CD34 (трансмембранный белок фосфолипидопротеина – специфичный маркер гемопоэтических стволовых клеток), CD31 (тромбоцитарно-эндотелиальный адгезин-1 – маркер тромбоцитов, эндотелиальных клеток, стволовых миелоидных клеток), CD45 (общий лейкоцитарный антиген), CD14 (рецептор для липополисахарид-связывающего антигена – маркер моноцитов и макрофагов), HLA-DR (человеческий лейкоцитарный антиген – маркер антигенпрезентирующих клеток – дендритных клеток, В-лимфоцитов, моноцитов, макрофагов, а также активированных Т-лимфоцитов), CD73 (экто-5'-нуклеотидаза), CD44 (рецептор для гиалуроновой кислоты, коллагена и матриксных металлопротеиназ), CD10 (эластаза), CD90 (гликозилфосфатидилинозитол-заякоренный белок суперсемейства иммуноглобулинов или тимоцит-дифференцировочный антиген 1 Thy-1), CD105 (эндоглин – корецептор для трансформирующего фактора роста), виментин (молекула цитоскелета), CD49b/CD29 ( $\alpha 2\beta 1$ -интегрин, маркер фибробластов). Оценку жизнеспособности культивированных фибробластов проводили с использованием флуоресцирующего ДНК-красителя 7-AAD (7-амино-актиномицин). В дополнение к этому оценивали наличие маркера апоптоза CD95.

Для исследования цитотоксического влияния биопленки на культуру фибробластов использовали клинические штаммы бактерий, выделенные из гранулирующих ран пациентов групп 1 и 2 по результатам проведения микробиологического посева. При этом раны пациентов не демонстрировали клинические признаки раневой инфекции или критической колонизации. В исследование включали *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis*. Выбор видов определялся вкладом в общую структуру микробиоты ОР и ХР [12], а также их установленным клиническим значением в качестве ESKAPE-патогенов [13]. Штаммы бактерий характеризовались выраженной способностью формировать биопленку, анализ которой проводили по разработанной нами методике (Патент Республики Беларусь № 20326) [14].

Для моделирования формирования биопленки использовали стерильные покровные стекла, которые помещали вертикально во флаконы с питательной средой. Во флакон вносили 1 мл бульонной культуры в концентрации  $5 \times 10^8$  КОЕ/мл, инкубировали 3 часа при температуре 37 °С и после этого добавляли питательную среду в объеме 40 мл. Биопленку выращивали в течение 72 часов. После окончания культивирования стекла из флаконов извлекали пинцетом, трижды промывали от неприкрепившихся клеток в буферном растворе. Для получения внеклеточного матрикса биопленку соскабливали с поверхности покровного стекла с помощью скребка для клеточных культур, добавляли минимальный объем раствора NaCl (9 г/л). Полученную суспензию фильтровали через мембранные фильтры с размером пор 0,2 мкм. Фильтрат матрикса биопленки в количестве 0,150 мл добавляли в питательную среду для фибробластов (4–5 пассажей), выращенных из образцов здоровой кожи (группа сравнения). Результаты оценки цитотоксичности компонентов матрикса биопленки представляли на 3-и сутки культивирования. Состояние монослоя контролировали с помощью инвертированного микроскопа (Nicon,

Япония). Для определения пролиферативной активности клеток определяли время удвоения (ВУ) культуры по формуле:

$$ВУ = t \times \lg 2 / \lg (Nt / N0),$$

где  $t$  – время инкубации (ч.);

$Nt$  – количество клеток, выросших за время  $t$ ;

$N0$  – начальная доза клеток на пластике.

Рассчитывали индекс пролиферации (ИП):

$$ИП = N2 / N1,$$

где  $N1$  – количество клеток монослоя, принятое как исходное;

$N2$  – количество клеток монослоя через 24 часа культивирования [15, 16].

Количество клеток оценивали с помощью анализатора Cell Dyn Ruby (Abbott, США). Плотность монослоя определяли исходя из количества клеток, образующихся в динамике. Для оценки цитотоксичности рассчитывали количество поврежденных клеток (ПК) на основании различий активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в питательной среде и клеточном лизате, для получения которого использовали метод двукратного замораживания-оттаивания [17]. Расчет ПК проводили по формуле:

$$ПК (\%) = (ЛДГс / ЛДГл + ЛДГс) \times 100,$$

где ПК – количество поврежденных клеток;

ЛДГс – активность ЛДГ в среде;

ЛДГл – активность ЛДГ в лизате.

Для определения ЛДГ использовали диагностические наборы производства Abbott Laboratories (Германия). Исследования выполняли на автоматическом биохимическом анализаторе Architect c8000, (Abbott, США).

В работе были применены общепринятые методы выражения результатов с использованием встроенных модулей лицензионной программы STATISTICA 6.1 (StatSoft Inc., США, регистрационный номер GS-35F-589). Результаты представляли в виде медианы и интерквартильного размаха (Ме [25-й; 75-й квартили]). Для сравнения показателей независимых выборок использовался ранговый U-критерий Манна – Уитни. Для проверки равенства медиан нескольких выборок применяли H-критерий Краскела – Уоллиса.

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При получении культуры фибробластов было отмечено, что скорость миграции клеток из биоптата грануляционной ткани ХР (группа 2) была ниже, чем из образцов здоровой кожи (группа сравнения) и грануляционной ткани ОР (группа 1). Так, радиальный рост фибробластов по периметру фрагментов ткани в группе 1 и группе сравнения наблюдался в среднем на 5–10-е сутки, с формированием монослоя через 14–18 суток, когда можно было проводить субкультивирование (рис. 1, 2).

Фибробласты грануляционной ткани ХР достигали допустимого для субкультивирования монослоя на 18–20-е сутки. Микробиологический анализ подтверждал отсутствие бактериальной и грибковой контаминации. При микроскопическом анализе культивированных клеток из пассажей, выполненном при помощи

инвертированного микроскопа, выявлялся присущий фибробластам характер роста (монослойный в виде завитков), клетки имели веретенообразную форму, 2–4 отростка, содержали овальное ядро, популяция клеток была однородной.

При гейтировании в процессе проточной цитофлуориметрии выделялась достаточная популяция клеток (85,9% [84,0; 92,5] по прямому и боковому светорассеянию SSC/FSC). На этой популяции не определялись основные иммунофенотипические маркеры, характерные для гемопоэтических и эндотелиальных клеток (трансмембранный белок фосфогликопротеина, тромбоцитарно-эндотелиальный адгезин-1, общий лейкоцитарный антиген, рецептор для липополисахарид-связывающего антигена, человеческий лейкоцитарный антиген): CD31, CD34 (1,6% [1,1; 2,3]), CD45 и CD14 (0,9% [0,3; 1,6]), HLA-DR (0,1% [0,05; 0,2]). Выделенные в рамках гейта клетки имели иммунофенотип: CD44+, CD90+, виментин+, CD73+, CD10+, CD105+, CD49b/CD29+.

Как известно, оценка иммунофенотипа фибробластов позволяет определить подлинность культуры, а также позволяет косвенно охарактеризовать основные клеточные процессы, такие как активация, пролиферация, миграция, межклеточная кооперация и т. д. Так, маркер CD10 идентифицирует поверхностную нейтральную эндопептидазу (Zn-зависимая металлопротеиназа, неприлизин) и является общим маркером лимфоидных предшественников. Вне лимфоидной системы CD10 экспрессируется на многих стромальных и эпителиальных клетках, в фибробластах кожи соответствует белку-эластазе [18]. Поверхностный клеточный антиген CD90 регулирует адгезию фибробластов, организацию цитоскелета и миграцию клеток; CD105 представляет собой корецептор для трансформирующего фактора роста. CD44 играет важную роль в межклеточных взаимодействиях, клеточной адгезии и миграции. Это рецептор для гиалуроновой кислоты, а также для коллагена и металлопротеиназ матрикса [18, 19]. Флуоресцирующий краситель 7-AAD используется для изучения проницаемости цитоплазматической мембраны в результате потери транспортной функции, что позволяет отличить живые клетки от мертвых и апоптотических. Наличие CD95 является маркером апоптоза [20]. CD49b/CD29 определяет  $\alpha 2\beta 1$ -интегрин, функция которого заключается в связывании с коллагеном I типа и ламинином, что позволяет фибробластам вовлекаться в межклеточную и клеточно-матриксную адгезию.

Установлен более низкий уровень экспрессии поверхностных иммунофенотипических маркеров на фибробластах грануляционной ткани, что отличало последних от культуры фибробластов контрольной группы. Это позволяет предположить, что колонизация раны бактериями – продуцентами биопленки, компоненты которой оказывают повреждающее действие на фибробласты формирующейся грануляционной ткани, способствует нарушению процесса заживления. Так, у всех пациентов были предшествующие этапы неэффективного амбулаторного лечения. С увеличением давности существования раны изменялась экспрессия иммунофенотипических маркеров на фибробластах грануляционной ткани в первичной культуре, что позволило определить межгрупповые различия. Для первичных культур фибробластов в группе 1 уровень экспрессии поверхностных маркеров был выше, чем в группе 2: CD44+, CD90+, CD73+ более 60,0% клеток, CD10+ более 75,0% клеток. Наиболее существенной была разница между экспрессией  $\alpha 2\beta 1$ -интегрином (CD49b/CD29). В группе 2 экспрессией  $\alpha 2\beta 1$ -интегрина характеризовались менее 50% клеток. Первичные культуры фибробластов XP демонстрировали более высокий процент 7-AAD+ (более 24,0%) и CD 95+ (более 22,0%) клеток. Указанные показатели

отражают нарушение состояния фибробластов в процессе хронизации раневого процесса и могут быть рекомендованы в качестве дополнительных критериев дифференциальной диагностики ХР.

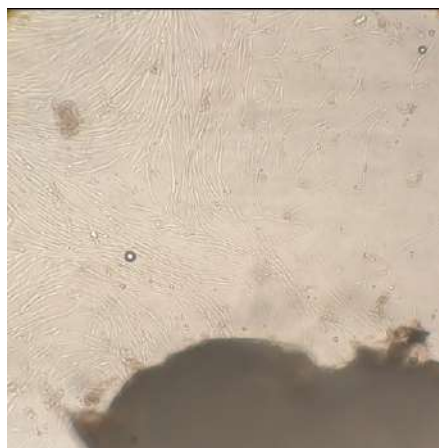
Доказано, что пониженная экспрессия и функция  $\alpha\beta 1$ -интегринов, связывающихся с ламинином и коллагеном I типа, обуславливает снижение миграционной способности фибробластов дермы. Следствием снижения пролиферативной активности фибробластов является повышение количества апоптозов и снижение их жизнеспособности [2, 21]. В эксперименте установлено, что фибробласты хронических ран характеризуются снижением митотической активности по сравнению с таковой аналогичных культур, полученных из острых ран. Также показано, что снижение способности фибробластов ХР к синтезу коллагена I типа с нарушением состава внеклеточного матрикса может быть одной из предпосылок развития отсроченной реэпителизации [22]. В эксперименте *in vitro* фибробласты, выделенные из биологического материала, забранного в области трофической язвы на фоне хронической венозной недостаточности, демонстрировали сниженную способность к росту и проявляли свойства «старения» с более низкой подвижностью и миграционной активностью по сравнению с таковыми фибробластов здоровой ткани [23].

Культуры фибробластов 4–5-го пассажей экспрессировали основные поверхностные маркеры – CD44, CD90, CD73, CD10 на более чем 88% клеток. Количество 7-AAD+ и CD95+ клеток не превышало 10%. Значения поверхностных иммунофенотипических маркеров фибробластов группы 1 и 2 на 4–5-м пассаже были аналогичными таковым для фибробластов группы сравнения. Наиболее постоянно определялась экспрессия маркеров виментина и CD105, составившая более 80% для первичных культур фибробластов сравниваемых групп и более 90% – для фибробластов 4–5-го пассажей. По данным маркерам производилось гейтирование фибробластов. Результаты сравнительного анализа иммунофенотипа фибробластов представлены в табл. 1.

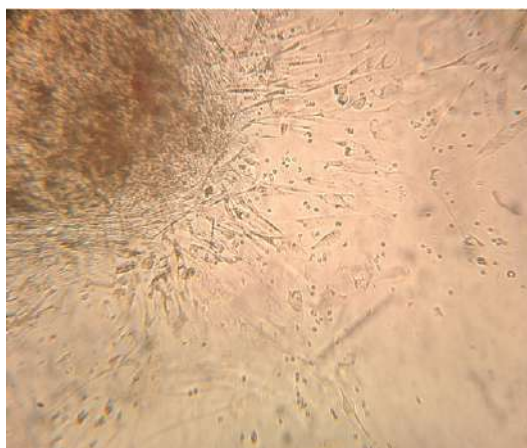
**Таблица 1**  
**Экспрессия основных поверхностных маркеров на фибробластах**  
**Table 1**  
**Expression of major surface markers on fibroblasts**

Маркер клетки	Первичная культура фибробластов группы 1 (n=9)	Первичная культура фибробластов группы 2 (n=17)	Фибробласты 4–5-го пассажа (n=26)	Фибробласты 4–5-го пассажа группы сравнения (n=20)
CD44	69,5% [66,0; 74,0]	60,6% [59,1; 63,7]*	95,0% [87,0; 98,5]**	94,0% [88,5; 98,3]
CD90	76,3% [72,5; 82,0]	66,0% [59,7; 69,0]*	93,0% [91,5; 95,0]**	93,0% [90,5; 95,0]
CD73	79,5% [77,0; 82,1]	60,5% [58,5; 62,0]*	95,3% [93,0; 97,0]**	93,8% [93,1; 96,9]
CD70	86,0% [79,0; 94,0]	77,4% [75,0; 80,0]*	95,0% [95,0; 98,0]**	96,5% [94,3; 98,0]
CD49b/ CD29	81,6% [79,5; 90,0]	51,0% [48,5; 59,0]*	93,0% [90,5; 94,0]**	94,0% [90,5; 95,5]
7-AAD	20,0% [18,0; 24,0]	24,0% [21,0; 26,0]*	5,0% [4,5; 7,0]**	5,8% [5,0; 7,5]
CD95	18,8% [16,4; 20,0]	22,0% [21,0; 25,0]*	6,0% [5,0; 8,5]**	6,5% [5,5; 8,5]
Виментин	88,0% [85,0; 93,0]	86,0% [84,5; 91,0]	91,0% [90,0; 94,0]	92,0% [91,0; 95,0]
CD105	89,0% [89,0; 95,2]	87,0% [85,0; 92,0]	92,0% [91,0; 94,0]	92,0% [91,0; 95,0]

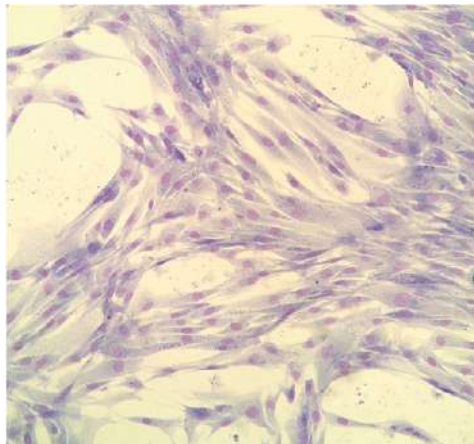
Примечания: \* обозначены различия между группами 1 и 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* обозначены различия между первичной культурой фибробластов и аналогичными культурами 4–5-го пассажа.



**Рис. 1.** Культура фибробластов здоровой кожи, 2 недели культивирования методом экплантатов. Радиальная миграция клеток, сформированный монослой. Нативный препарат, инвертированный микроскоп  
**Fig. 1.** Healthy skin fibroblast culture, 2 weeks culture by explant method. Radial cell migration, formed monolayer. Native preparation, inverted microscope



**Рис. 2.** Культура фибробластов грануляционной ткани раны, 1,5 недели культивирования методом экплантатов. Радиальная миграция клеток, сформированный монослой. Нативный препарат, инвертированный микроскоп  
**Fig. 2.** Fibroblast culture of the granulation tissue of the wound, 1.5 weeks of cultivation by the explant method. Radial cell migration, formed monolayer. Native preparation, inverted microscope



**Рис. 3.** Формирующийся монослой фибробластов здоровой кожи (группа сравнения), 5-й пассаж, окраска по Романовскому – Гимзе  
**Fig. 3.** Forming monolayer of healthy skin fibroblasts (comparison group), passage 5, Romanovsky – Giemsa staining

Таким образом, полученные результаты позволяют полагать, что колонизация раны бактериями – продуцентами биопленки способствует нарушению состояния фибробластов в виде частичной потери поверхностных CD маркеров на первичной культуре клеток и их восстановления в процессе пересева фибробластов к 4–5-му

пассажу. На следующем этапе проведено экспериментальное исследование, направленное на оценку цитотоксичности матрикса биопленки бактерий, выделенных из раневого отделяемого, по характеру воздействия на культуру фибробластов здоровой кожи (группа сравнения). Для исследования использованы культуры фибробластов 4–5-го пассажа. Клетки монослоя имели характерную веретенообразную форму с ядром овальной формы, гомогенной цитоплазмой и отростками. С помощью отростков фибробласты соединялись с соседними клетками, формируя конфлюэнтный монослой. Пример монослоя клеток, окрашенных по Романовскому – Гимзе, представлен на рис. 3.

Компоненты матрикса бактериальной биопленки оказывали влияние на пролиферативную активность фибробластов. Так, значения ИП после культивирования с суспензией матрикса *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* составляли 52–85% от контроля. Время удвоения культуры увеличилось в опыте с *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, увеличилось в 1,3–1,9 раза по сравнению с таковым в «контроле» (или 130–190% от «контроля»). Исключение составляли показатели опыта с *E. faecalis*, которые были минимальны: ИП составляло 76–95% от «контроля», ВУ увеличивалось в 1,05–1,2 раза от «контроля» (или 105–120% от «контроля») (табл. 2).

**Таблица 2**  
**Показатели пролиферативной активности фибробластов на 3-и сутки культивирования**  
**Table 2**  
**Indicators of proliferative activity of fibroblasts on the 3rd day of cultivation**

Показатель	Me [25-й; 75-й квартили]				
	Контроль	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
Плотность монослоя, кл/мм <sup>2</sup>	530 [495; 580]	<b>380</b> <b>[365; 392]</b>	<b>200</b> <b>[170; 250]*</b>	<b>400</b> <b>[350; 420]</b>	<b>480</b> <b>[452; 489]</b>
Индекс пролиферации, отн. ед.	2,2 [2,1; 2,9]	<b>1,6 [1,5; 1,8]</b>	<b>1,2 [1,1; 1,5]*</b>	<b>1,8 [1,6; 2,0]</b>	<b>2,1 [1,9; 2,2]</b>
Время удвоения, ч.	21 [20,8; 21,5]	<b>29,5 [27,0; 33,0]</b>	<b>36 [31; 40,8]*</b>	<b>29 [27,0; 31]</b>	<b>23 [22,0; 26,0]</b>

Примечания: \* отмечены наибольшие различия среди сравниваемых групп; жирным шрифтом выделены значимые различия по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ .

**Таблица 3**  
**Результаты ЛДГ-теста и относительное количество поврежденных клеток**  
**Table 3**  
**Results of the LDH test and the relative number of damaged cells**

Показатель	Активность ЛДГ в среде, ЕД/л	Активность ЛДГ в лизате клеток, ЕД/л	% поврежденных клеток в чашке Петри, Me
	Me [25-й; 75-й квартили]		
Контроль	35 [28; 43]	220 [190; 250]	14
<b>Опыт</b>			
<i>K. pneumoniae</i>	<b>110 [100; 140]</b>	<b>225 [230; 320]</b>	<b>32,8</b>
<i>P. aeruginosa</i>	<b>170 [160; 180]*</b>	<b>249 [240; 310]*</b>	<b>40,5*</b>
<i>S. aureus</i>	<b>97 [90; 120]</b>	<b>232 [220; 243]</b>	<b>29,5</b>
<i>E. faecalis</i>	<b>86 [82; 95]</b>	<b>225 [205; 230]</b>	<b>27,6</b>

Примечания: \* отмечены наибольшие значения среди сравниваемых групп; жирным шрифтом выделены значимые различия по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ .

Необходимо отметить, что компоненты матрикса оказывали воздействие и на адгезию клеток, а также на их способность распластываться и формировать монослой. Так, на 3-и сутки культивирования с матриксом биопленки *P. aeruginosa* наблюдалось отсутствие фиксации части клеток к пластику, фибробласты находились в питательной среде, имели округлую форму. При совместном культивировании с матриксом биопленки других видов бактерий также выявлялись клетки с нарушением структурной организации – цитоплазматические включения, вакуоли, пикноз ядра.

Наряду с угнетением пролиферативной активности фибробластов компоненты матрикса биопленки *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* оказывали цитотоксическое действие, что проявлялось в увеличении относительного содержания ПК по результатам ЛДГ-теста в 2,1–2,89 раза от «контроля» (или 210–289% от «контроля»). При культивировании фибробластов с матриксом биопленки *E. faecalis* содержание ПК увеличивалось менее чем в 2 раза от «контроля» (табл. 3).

Повреждающее действие компонентов бактериальной биопленки проявлялось в увеличении относительного содержания 7-AAD+ и CD95+ фибробластов, отражающих апоптоз и гибель фибробластов, а также нарушении экспрессии основных иммунофенотипических маркеров. Фибробласты, положительные по маркерам CD44, CD90, CD73, CD10, CD49b/CD29, составляли менее 75% от «контроля». Степень экспрессии виментина и CD105 оставалась достаточной на 3-и сутки и составляла более 80% для опытных групп и более 95% для «контроля» (табл. 4).

**Таблица 4**  
**Изменение экспрессии поверхностных маркеров фибробластов после культивирования с матриксом бактериальной биопленки**  
**Table 4**

**Changes in the expression of fibroblast surface markers after cultivation with a bacterial biofilm matrix**

Маркер	Опыт, % положительных клеток, Me [25-й; 75-й квартили]				Контроль	Н, р
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>		
CD44	60,6 [59,1; 63,7]	52,1 [48,0; 55,0]	69,6,0 [66,0; 74,0]	65,5 [64,2; 67,0]	94,0 [88,5; 98,3]	29,5 p<0,001
CD90	49,1 [45,0; 52,0]	66,0 [59,7; 69,0]	39,2 [35,0; 41,0]	76,3 [72,5; 82,0]	93,0 [90,5; 95,0]	42,5 p<0,001
CD73	53,3 [49,7; 56,7]	79,5 [77,0; 82,1]	48,4 [46,7; 52,0]	60,5 [58,5; 62,0]	93,8 [93,1; 96,9]	41,5 p<0,001
CD10	77,4,0 [75,0; 80,0]	81,2 [80,0; 85,0]	86,0 [79,0; 94,0]	75,8 [72,0; 78,0]	96,5 [94,3; 98,0]	29,9 p<0,001
CD49b/ CD29	66,2 [61,0; 75,0]	67,0 [64; 72,0]	68,0 [64,5; 72,0]	72,0 [71,0; 75,0]	94,0 [90,5; 95,5]	24,3 p<0,001
7-AAD	35,0 [33,0; 37,0]	39,3 [37,0; 41,0]	31,0 [29,0; 33,0]	28,7 [25,5; 30,5]	5,8 [5,0; 7,5]	37,6 p<0,001
CD95	33,0 [29,0; 37,5]	40,5 [39,7; 41,0]	31,5 [29,0; 33,0]	19,8 [18,4; 21,0]	6,5 [5,5; 8,5]	41,8 p<0,001
Виментин	82,0 [80,0; 84,0]	86,0 [81,5; 89,0]	85,0 [80,0; 86,0]	87,5 [85,0; 91,0]	92,0 [91,0; 95,0]	16,5 p=0,01
CD105	84,0 [82,0; 89,0]	82,0 [79,0; 85,0]	86,0 [79,0; 91,0]	81,0 [80,0; 84,0]	92,0 [91,0; 95,0]	15,8 p=0,01

Примечание: Н – критерий Краскела – Уоллиса, обозначены различия между опытом и контролем (p<0,05).

Таким образом, результаты эксперимента свидетельствовали о влиянии компонентов матрикса биопленки клинических штаммов бактерий, выделенных из ран пациентов, на состояние культуры фибробластов здоровой кожи при проведении совместного культивирования *in vitro*. Полученные результаты подтверждают вклад микробного фактора в патогенез нарушения репарации и формирования длительно не заживающей раны. Изоляты, обнаруженные в том числе в количестве  $10^3$  КОЕ/мл, могут иметь этиологическое значение, что предполагает необходимость оценки их цитотоксичного влияния на культуру фибробластов перед применением для лечения раневых дефектов различной этиологии и сроков давности.

Для создания возможности практического использования лабораторного метода оценки состояния фибробластов, измененного под влиянием компонентов бактериальной биопленки, разработана таблица интерпретации результатов оценки, в которой проявление цитотоксичности выражается в % от контрольной пробы. Пороговые значения показателей пролиферации, цитотоксичности, экспрессии поверхностных иммунофенотипических маркеров выбраны на основании результатов, полученных в настоящем исследовании (табл. 5).

Проявление цитотоксичности клинических штаммов бактерий, устанавливаемое по характеру их влияния на культуру фибробластов, будет отражать патогенный потенциал микрофлоры в плане оценки риска развития осложнений, связанных биомедицинским продуктом – в виде констатируемого снижения функциональной активности или гибели клеток. Наличие в ХР бактерий – продуцентов биопленки, обладающих цитотоксичностью, может быть критерием пролонгации фазы воспаления и определяет показания к использованию эффективных методов обработки раны для стимуляции перехода фазы воспаления в фазу регенерации.

Полученные данные имеют фундаментальное значение в области исследования процессов репаративной регенерации, выяснения механизмов пролиферации

**Таблица 5**  
**Интерпретация результатов определения цитотоксичности**  
**Table 5**  
**Interpretation of cytotoxicity results**

Показатель	Проявление цитотоксичности на культуру фибробластов
	% от контроля*
ПК, %	≥210
ВУ, час.	≥130
ИП, отн. ед.	≤85
CD73, %	≤70
CD44, %	≤75
CD10, %	≤75
CD90, %	≤70
CD49b/CD 29	≤75
7-AAD+, %	≥300
CD95+, %	≥230
Визуальное состояние монослоя	Признаки нарушения адгезии клеток, наличие нефиксированных фибробластов в питательной среде

Примечание: \* контрольные значения устанавливаются индивидуально для каждой лаборатории.

и функционирования клеток в условиях инфекции. Данные о доминирующей роли определенного вида бактерий – продуцентов биопленки в возникновении нарушений состояния фибробластов могут быть использованы в разработке новых методов лечения ран, направленных на разрушение матрикса биопленки и мониторинг его эффективности. Результаты выполненного исследования явились основанием для разработки инструкции по применению, утвержденной в Министерстве здравоохранения Республики Беларусь: «Метод определения фазы раневого процесса хронической язвы кожи» (16.12.2020, рег. № 127-1220), в которой изложен лабораторный метод оценки состояния фибробластов в условиях влияния компонентов бактериальной биопленки [24].

## ■ ВЫВОДЫ

1. Установлено, что для первичных культур фибробластов грануляционной ткани острых ран характерен более высокий уровень экспрессии поверхностных маркеров CD44, CD90, CD73 – более 60%, CD10 – более 75%, CD49b/CD29 – более 80% и более низкие значения 7-AAD+ (менее 21%) и CD95+ (менее 22%) клеток, чем для фибробластов хронических ран, колонизированных бактериями – продуцентами биопленки ( $p < 0,05$ ). Приведенные показатели отражают нарушение состояния фибробластов в процессе хронизации раневого процесса и могут быть рекомендованы в качестве критериев дифференциальной диагностики острой и хронической раны.
2. Компоненты матрикса биопленки *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis* проявляли цитотоксичное влияние на культуру фибробластов здоровой кожи в эксперименте, что выражалось в изменении показателей пролиферативной активности (времени удвоения, индекса пролиферации, количества поврежденных клеток по результатам ЛДГ-теста), нарушении экспрессии на фибробластах основных маркеров (CD10, CD44, CD73, CD90, CD49b/CD29), развитии апоптоза (по CD95) и гибели (по 7-AAD) фибробластов.
3. Для практического использования лабораторного метода оценки состояния фибробластов при влиянии компонентов бактериальной биопленки разработана таблица интерпретации результатов исследования, в которой проявление цитотоксичности выражается в % от контрольной пробы. Метод отражен в инструкции по применению «Метод определения фазы раневого процесса хронической язвы кожи»: утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь 16.12.2020 (рег. № 127-1220).

---

## ■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ortega-Pena S., Hidalgo-Gonzalez C., Robson M.C., Krutzsch E. (2017) In vitro microbicidal, anti-biofilm and cytotoxic effects of different commercial antiseptics. *Int Wound J*, vol. 14, pp. 470–479. Available at: <http://doi.org/10.1111/iwj.12625>
2. Shurygina I., Shurygin M., Ayushinova N., Kanya O. (2012) Fibroblasts and their role in the development of connective tissue. *Siberian Medical Journal*, vol. 110, no 3, pp. 8–12. (in Russian).
3. Tretyak S., Baranov E., Buravsky A., Volotovskiy I., Kvacheva Z., Vasilevich I. (2016) *Instructions for use: «The method of complex treatment of patients with long-term non-healing wounds using local LED phototherapy and autologous cultured dermal fibroblasts»* 17.02.2017 №066-1016, Minsk. 7 pp. (in Russian).
4. Podgaisky V., Chasnoit A., Volotovskiy I., Kvacheva Z., Vasilevich I., Serebryakov A., Putik V., Basalai V. (2019) *Instructions for use: «Method for the treatment of skin burns using autologous fibroblasts and keratinocytes»* 26.12.2019 №173-1219, Minsk, 8 pp. (in Russian).
5. Young L. (2012) Identifying infection in chronic wounds. *Wound Practice and Research*, vol. 20, no 1, pp. 38–44.

6. Kirker K.R., James G.A. (2017) In vitro studies evaluating the effects of biofilms on wound-healing cells: a review. *APMIS*, vol. 125, no 4, pp. 344–352. Available at: <http://doi.org/10.1111/apm.12678>
7. Marano R.J., Wallace H.J., Wijeratne D., Fear M.W., Wong H.S., O'Handley R. (2015) Secreted biofilm factors adversely affect cellular wound healing responses in vitro. *Scientific Reports*, vol. 5, ID13296. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep13296>
8. Tchebotar I., Mayanskiy A., Mayanskiy N. (2016) Matrix of Microbial Biofilms. *CMAC*, vol. 18, no 1, pp. 9–19. (in Russian).
9. Kirker K.R., James G.A., Fleckman P., Olerud J.E., Stewart P.S. (2012) Differential effects of planktonic and biofilm MRSA on human fibroblasts. *Wound Repair Regen*, vol. 20, no 2, pp. 253–61. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2012.00769.x>
10. Yarets Y., Slavnikov I., Dundarov Z., Shibaeva N. Informativeness of cytological and histological research methods for assessing the state of inflammatory and proliferative reparation phases of granulated wounds. *Medical and Biological Problems of Life Activity*, vol. 19, no 1, pp. 86–94. (in Russian).
11. Rubanov L., Yarets Y., Dundarov Z. (2016) The comparative analysis of the efficiency of standard and hardware methods of chronic wound bed preparation to skin grafting. *Surgery Eastern Europe*, vol. 5, no 4, pp. 604–615. (in Russian).
12. Yarets Yu., Shevchenko N., Eremin V. (2021) Methodology of microbiological analysis of wound swabs within the framework of modern concepts of wound infection process. *Laboratory Service*, vol. 10, no 3, pp. 33–42. Available at: <https://doi.org/10.17116/labs20211003133> (in Russian).
13. Dinesh K., Karthick M. (2018) A study on ESKAPE pathogens the bad bug with no drug. *Tropical Journal of Pathology & Microbiology*, vol. 4, Issue 2, pp. 134–138. Available at: <https://doi.org/10.17511/jopm.2018.i02.02>
14. Yarets Y., Shauchenka N. (2016) The new method of bacterial biofilm analysis in medicine. *Science and Innovation*, vol. 164, no 10, pp. 64–68. (in Russian).
15. Gilmutdinova I., Rossinskaya V., Boltovskaya V., Kulagina L. (2015) Research of biological compatibility of bioplastic material «Hyamatrix» in dermal fibroblast culture. *Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, vol. 17, no 2 (2), pp. 268–272. (in Russian).
16. Ponomareva J. Alternative model for evaluation of biocompatibility of synthetic polypropylene meshes for hernia. *Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, vol. 17, no 5 (3), pp. 913–916. (in Russian).
17. Kotelnikov G., Kolsanov A., Nikolaenko A., Volova L., Rossinskaya V., Boltovskaya V., Popov N., Shcherbovskih A., Prihod'ko S. (2018) Testing of additive materials in human fibroblast cell cultures. *Clinical and experimental surgery. Petrovsky Journal*, vol. 6, no 2, pp. 67–73. Available at: <https://doi.org/10.24411/2308-1198-2018-12009> (in Russian).
18. Pavlova S., Sergeevichev D., Chepeleva E., Kozyreva V., Malakhova A., Zakharova I., Grigor'eva E., Pokushalov E., Zakiyan S. (2015) Comparative analysis of bone marrow derived mesenchymal stromal cells, cardiac regional stem cells and human skin fibroblasts. *Circulation Pathology and Cardiac Surgery*, vol. 19, no 4–2, pp. 12–19. (in Russian).
19. Trusov G., Chaplenko A., Semenova I., Melnikova E., Olefir Yu. (2018) Use of Flow Cytometry for Quality Evaluation of Biomedical Cell Products. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*, vol. 18, no 1, pp. 16–24. Available at: <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-1-16-24> (in Russian).
20. Voitkva V. (2010) Study of apoptosis with use of flow cytometry (review of literature). *Acta Biomedica Scientifica (East Siberian biomedical Journal)*, vol. 76, no 6, part 1, pp. 220–225. (in Russian).
21. Grytsenko M. (2015) Age features of certain fibroblasts properties. *The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University*, vol. 24, no 1153, pp. 110–116. (in Russian).
22. Korchak O. (2010) Possibility of stimulation of proliferative activity of fibroblasts of chronic venous ulcers of the lower extremities in vitro. *Bulletin of the Ukrainian Medical Dental Academy*, vol. 6, no 1–2, pp. 172–179. (in Russian).
23. Bogdan V., Tolstov D., Zafranskaya M. (2014) Evaluation stimulating influence platelet rich plasma in experimental models fibroblast cultures of patients with trophic ulcers of venous etiology. *Medical news*, no 9, pp. 87–89. (in Russian).
24. Yarets Yu., Shevchenko N., Slavnikov I., Rozhko A., Dudarov Z. (2020) Instructions for use: «Method for determining the phase of the wound process of chronic skin ulcers» 16.12.2020 №127-1220, Minsk. 6 p. (in Russian).