

Programul CERES

Raport Final de Activitate Contract CERES nr.3-103/12.11.2003

Denumirea proiectului : Modele celulare pentru studiul *in vitro* a mecanismelor moleculare care stau la baza reparării leziunilor pielii

Perioada acoperita:12.11.2003-10.06.2005

Data prezentarii:08.07.2005

Bugetul proiectului

An	Conform contractului de finantare	Modificari prevazute prin act aditional
2003	150.000.000	150.000.000
2004	600.000.000	654.000.000
2005	600.000.000	654.000.000
Total	1.350.000.000	1.458.000.000

Obiective

- Ob.1. Realizarea a trei tipuri de modele experimentale de studiu a reparării leziunilor pielii
- Ob.2. Studii comparative în vederea alegerii unui model optim pentru cercetarea mecanismelor moleculare care stau la baza reparării leziunilor pielii [
- Ob.3. Simularea unor leziuni ale pielii pe modelul experimental ales și studiul modificărilor morfologice și biochimice induse
- Ob.4. Evaluarea dinamicii interacțiilor dintre celule și matricea extracelulară în cursul reparării leziunilor

1.

Rezultate experimentale

1. Realizarea unor modele experimentale

În această etapă s-au obținut culturile primare de KC (după separarea epidermei de dermă prin tratament enzimatic cu dispază II, într-un mediu selectiv KMK-2 Sigma ce conține antibiotice) și de FB (prin tehnica explantului, în mediu de cultură DMEM la care se adaugă 15 % ser fetal bovin și antibiotice). Cultivarea celulelor s-a realizat, într-o atmosferă umedă cu 5% CO₂ și 95% O₂ la 37°C până celulele ating confluență. Mediul de cultură se înprospătează la fiecare 2-3 zile. Recoltarea și subcultivarea celulelor s-a realizat prin tripsinizare. Celulele pot fi crioconservate la o densitate celulară de 4×10⁶ /cm² la — 80°C într-o soluție cu 80 % DMEM, 10% dimetil sulfoxid și 15% ser fetal bovin.

Experimental, s-au obținut șase modele experimentale: (I) culturi 3-D de FB cultivate în gel de colagen care flotează; (II) culturi 3-D de FB cultivate în gel de colagen atașat; (III) culturi 3-D de FB în gel de colagen înrețelată cu glutaraldehidă în care s-a incorporat condroitin sulfatul; (IV) culturi 3-D de KC pe plăci de cultură acoperite cu colagen tip I, fibronectină sau

laminină ; (V) co-culturi de KC crescute pe FB post-mitotice («feeder») și (VI) sistem de cultură organotipică în care KC expuse la aer sunt crescute pe un gel de colagen în care au fost înglobate FB proliferative.

2. Caracterizarea modelelor experimentale

Pe modelele celulare s-au realizat studii de viabilitate (numărare celule și testul cu Trypan Blue), proliferare (tehnicile cu MTT și a incorporării BrdU cu kit ELISA), morfologice (observații la microscopul de inversie, colorații Hematoxilin-Eozină, van Gieson, Heidenhain's Azan), studiul imunocitochimic al unui marker al diferențierii KC: citokeratina K19 și al unui marker al constituirii structurii tisulare: actina, precum și studiul acțiunii unui compus cu acțiune hiperproliferativă- KGF (*keratinocyte growth factor*) asupra epidermalizării modelului dermei. Dintre cele două tipuri celulare luate în studiu, KC - distribuite în mai multe straturi celulare (bazal și suprabazale) ale epidermei - suferă un program de diferențiere complex și înalt ordonat, care conduce la regenerarea totală a epidermei în 2-3 săptămâni. Datorită restricțiilor fizice, majoritatea culturilor organotipice nu cresc, proliferarea fiind limitată la nivelul straturilor celulare externe. Din acest motiv culturile de organ nu pot fi propagate, fiecare studiu fiind realizat pe o cultură nouă, ceea ce presupune activități laborioase și îndelungate. Noi am ales doi markeri ai stopării creșterii și a diferențierii celulare: actina (marker tisular) și citokeratina 19 (marker a celulelor epiteliale). Filamentele subțiri de actină (microfilamente cu un diametru de 7-9 nm) sunt componente ale citoscheletului celular care contribuie atât la menținerea/modificarea formei celulei cât și în migrarea celulelor. Keratinele sunt proteinele majore ale rețelei de filamente intermediare din KC și le conferă funcția de protecție a epidermei. Cea mai mică keratină – K19 –nu este exprimată în țesutul epitelial al epidermei adulte, expresia ei se modifică temporal și spațial în cursul dezvoltării celulei epidermale în fetusul uman ; supresia expresiei K19 în straturile celulare suprabazale ale epiteliiilor nekeratinizate poate fi corelată cu procesul keratinizării epidermei. Factorul de creștere KGF influențează proliferarea și diferențierea celulelor epiteliale, fiind implicat în procesele de reparare a leziunilor pielii. Bazându-ne pe aceste considerente s-au studiat efectele KGF asupra unor modele celulare realizate în cadrul acestui proiect.

Dintre cele șase modele, cultura organotipică VI care are o capacitate proliferativă ce crește de circa 12 ori după 7 zile de cultivare, permite o stratificare a modelului epidermic și popularea compozitului cu un număr mai mare de celule. KC marginale se agregă adoptând o formă aplatizată, în timp ce cele localizate mai profund formează protuberanțe late (lamelipodia) care se anastomozează cu FB din gelul de colagen, în contrast cu KC crescute în monostrat ce formează protuberanțe ascuțite și scurte (filopodia). Apariția și dimensiunile acestor filamente (lamelipode) depind de timpul de cultivare, fiind observate după o zi de la inițierea co-culturii și dezvoltându-se ulterior, sugerând intensificarea interacțiilor dintre celule, sub acțiunea unor factori eliberați de FB prezente în cocultură. Studiile citochimice cu rodamină-faloidină arată distribuția filamentelor de actină pe marginile lamelipodelor, deci organizarea citoscheletului. Studiul expresiei citokeratinei K19 - după 1, 7 și 15 zile de cultivare arată prezența ei numai în co-cultura de 7 zile, evidențiindu-se cu mai mare claritate stratificarea epidermei și KC proliferative. Lipsa K19 în co-cultura de 1 zi poate sugera faptul că celulele epiteliale nu s-au adaptat în modelul elaborat, fapt confirmat și de studiile de proliferare. După 7 zile de cultivare, KC se află într-o stare proliferativă optimă, începe stratificarea epidermei, se formează filamente de actină (citoscheletul) și exprimă K 19, ca în cazul epidermei embrionare. După 15 zile de cultivare, K19 nu se mai exprimă sugerând începutul keratinizării epidermei, fapt care se observă și la inspecția co-culturii la microscopul în contrast de fază. Pentru testarea acțiunii KGF, s-a adăugat în mediul co-culturii KC-FB proliferative de 1 zi, două concentrații de KGF 25 ng/ml și 100 ng/ml și s-au studiat efectele acestor tratamente asupra proliferării celulare, observându-se că KGF stimulează proliferarea celulară într-o manieră proporțională cu doza. La concentrația maximă (100 ng/ml) KGF nu afectează proliferarea celulară în primele 7 zile de cultivare, după care factorul de creștere activează acest proces de 1,85 ori la 10 zile și de 2,97 ori la 15 zile - în raport cu co-cultura netratată. Datele sugerează că KGF întârzie diferențierea terminală a KC și probabil procesul de keratinizare – deoarece la 15 zile proliferarea celulară este în creștere.

3. Alegerea unui model experimental optim

În alegerea modelului celular s-au luat în considerație următoarele aspecte:

i. Rănile pielii care apar zilnic în practica medicală sunt heterogene, putând fi mari, mici, deschise, închise, profunde, superficiale, etc. În funcție de profunzime, rănilor pot afecta diferite tipuri de țesuturi – ceea ce presupune mecanisme diferite de reparare.

ii. Studiile pe sisteme multi-celulare, constituite cel puțin din KC și FB, permit investigarea interacțiilor celulă-celulă dar nu permit elucidarea implicării fiecărui tip celular în procesul reparativ deoarece ambele tipuri celulare produc aceleași metaloproteinaze matriceale (MMP) și citokine pro-inflamatorii ;

iii. Scopul unor astfel de investigații este de a simplifica condițiile de studiu în vederea elucidării comportamentului unui singur tip celular în repararea leziunilor pielii ;

iv. Deși profilul producției citokinelor este cunoscut la nivelul pielii, a fost insuficient investigată contribuția diferitelor tipuri celulare la elaborarea acestor stimuli.

Având în vedere aceste considerații am ales ca model de studiu al mecanismelor de reparare a leziunilor pielii - echivalentul dermic cu FB în gel de colagen atașat la recipientul de cultură, care permite creșterea optimă a celulelor în cursul a 15 zile de cultivare.

4. Mimarea leziunilor pielii

Modelul experimental ales a fost supus unor tratamente pentru a mima diferite tipuri de leziuni.

- A. Pentru a mima leziunile mecanice înainte de plasarea și gelificarea soluției de colagen, baza internă a plăcii de cultură a fost deteriorată cu ajutorul unui bisturiu steril.
- B. Leziunile hipertermice au fost simulate prin încălzirea plăcii de cultură cu echivalentul dermic timp de 5 minute la 70°C, după care au fost răcite brusc și termostatare la 37°C.
- C. Pentru a simula situația *in vivo* în care stratul dermic este expus la aer și apar leziuni oxidative, echivalentul dermic a fost tratat timp de 20 minute cu 100 μM H₂O₂,
- D. Dintre multitudinea de agenți iritanți ai pielii s-a ales dodecilsulfatul de sodiu (SDS) ; tratamentul fiind realizat cu 35 μM SDS, timp de 20 minute.
- E. Echivalentul dermic a fost iradiat o sursă de Co⁶⁰ cu 4 Gy la o rată a dozei de 0,0629 Gy/sec, la temperatura camerei pentru a mima leziuni produse de exemplu la iradierea gamma a pielii.

5. Monitorizarea celulelor din echivalentul dermic supus diferitelor leziuni

Modelul celular a fost monitorizat la un microscop în contrast de fază Nikon, cu/ fără fixare și colorare cu hematoxilin-eozină. În cazul culturilor 3-D de FB control, realizate după 3 și respectiv 7 zile de creștere a celulelor la 37°C, se observă clar creșterea gradului de populare a matricei de colagen cu celule. Monitorizarea echivalentului dermic (ED) timp de 14 zile după obținerea lui (ziua 0) permite evidențierea unui proces de contracție a matricei 3-D. După 14 zile ED are o grosime mai mică cu 68 %, în raport cu ziua 0, în timp ce densitatea celulară pare a fi nemodificată.

Lezarea mecanică a suportului în care se realizează gelifierea colagenului în care au fost incluse FB nu permite creșterea normală a acestor celule în zonele cu defect. Tratamentul termic al ED, prin incubarea plăcilor Petri timp de 5 minute la 70°C, urmat de răcire bruscă și relaxare 24 ore la 37°C - afectează rețeaua 3-D de colagen, observându-se celule vii atât în matricea colagenică cât și celule vii ieșite din gel. Tratamentele chimice ale culturilor 3-D de FB în gel de colagen, timp de 20 minute cu 100 μM H₂O₂ și cu 35 μM SDS afectează viabilitatea celulelor, dar și structura suportului, într-un grad mai mare în primul caz. Iradierea γ (4 Gy) a culturii 3-D de FB conduce la o accentuare a gradului de contracție a gelului de colagen fără afectarea evidentă a componentei celulare a ED.

Studiul viabilității FB după digestia enzimatică a gelului de colagen arată că tratamentul mecanic are efectele cele mai nocive, după 14 zile ED ne mai având celule vii. După 1 zi de la tratamentul termic 88 % din celule rămân vii, dar după 14 zile componenta celulară moare. Cele mai mici efecte sunt observate în cazul tratamentului iritant, când după 14 zile se determină aceeași viabilitate ca ED control. Tratamentul cu 100 μM H₂O₂ conduce la moartea a 46,4 %

celule crescute în gel de colagen, după 1 zi, în raport cu experimentul control. După 14 zile, același tratament conduce la creșterea viabilității la 68,3 % ceea ce sugerează intervenția sistemului antioxidant de apărare, din FB. Iradierea γ nu afectează semnificativ viabilitatea celulelor după o oră de la tratament, dar produce scăderea considerabilă a numărului de FB vii din modelul celular după 14 zile.

S-a studiat nivelul a IL-1 α și β din mediul de cultură în cazul experimentului control, a leziunilor oxidative și a celor produse prin iradiere, după 1 zi și 14 zile de la tratament. În cazul experimentului control, nivelul IL-1 β este mai mare decât cel al IL-1 α - cu 33,8 % în prima zi și cu 80,9 % în cea de a 14-a zi de cultivare a ED. Nivelul ambelor IL-1 scade pe parcursul a 14 zile de cultivare, cu 72,7 % în cazul IL-1 α și cu 63,1 % în cazul IL-1 β , arătând o diminuare a semnalizării prin aceste citokine pro-inflamatoare, corelat cu scaderea numărului de celule viabile din ED supus tratamentului traumatic. Incubarea ED cu 100 μ M H₂O₂ (20 minute) a fost monitorizat după 1 zi și după 14 zile de relaxare, de la data tratamentului. După 1 zi, se remarcă o creștere marcantă (de circa 38 ori) a nivelului extracelular (proteina) al IL-1 β și o creștere mai mică (de 1,37 ori) după 14 zile. Iradierea γ a culturii 3-D de FB conduce la creșteri mai mici (8,5 ori) a nivelului IL-1 β și numai după 1 oră de relaxare. Datele noastre arată că dintre cele două forme IL-1, IL-1 β predomină extracelular. Nivelul proteic al ambelor forme IL-1 crește după 1 oră de la inducerea stresului și se diminuează pe parcursul celor 14 zile de cultivare a ED.

S-a studiat evoluția nivelului MMP-2 și MMP-9, corelat cu concentrația IL-1 β , în special la o zi după tratamentul traumatic. S-a pornit de la ipoteza că IL-1 β poate afecta gradul de activare al formei latente pro-MMP-2 și poate promova căi de semnalizare care în final activează un factor de transcripție (AP-1 și NF- κ B) ce stimulează biosinteza MMP. Prin analize de Western blot s-a demonstrat că în cazul aplicării unui tratament traumatic oxidant - în primele 3 zile post-tratament activitatea extracelulară gelatinolitică este reprezentată de MMP-9 indusă, probabil, de leziune. În aceeași perioadă nivelul IL-1 β este deosebit de crescut. MMP-9 se găsește în formă activă, deci procesul de activare a proformei a avut deja loc. După 5 zile post-tratament, activitatea gelatinolitică extracelulară este reprezentată de MMP-9 și de MMP-2 (forma activă și pro-forma). După 7 zile de la tratament, cantitățile MMP-9, pro-MMP-2 și MMP-2 scad, pentru ca în ziua a 10-a această scădere a activității gelatinolitică să se accentueze, fiind reprezentată practic numai de MMP-2. După 14 zile de la tratament nu se mai decelează prezența MMP-2 sau MMP-9, în ciuda faptului că viabilitatea celulară crește cu 56 %. Rezultatele obținute prin determinări cantitative ELISA confirmă evaluările semi-cantitative obținute prin analize Western blotting, sugerând că la 24 ore după traumă are loc o creștere marcantă în nivelul IL-1 β ce induce sinteza MMP-9 până în ziua 5 când atinge o valoare maximă. Nivelul MMP-2 arată profilul constitutiv al acestei gelatinaze care are o valoare maximă tot în ziua 5 post-tratament, probabil prin acțiunea IL-1 β asupra procesului de activare a proformei latente.

6. Studiul acțiunii post-leziune a insulinei, hidrocortizonului și vitaminei A

Influența acestor compuși asupra procesului de reparare a leziunilor a fost studiată pe FB crescute în monostrat (aflate la 70 % confluență) și pe ED. În toate variantele experimentale s-au practicat leziuni mecanice cu aceeași formă și dimensiuni pentru a avea aceleași caracteristici mecanice la vindecare. În ambele modele, celulele au fost private de ser fetal bovin (SFB) timp de 24 ore înainte de începerea tratamentului - care constă dintr-o leziune mecanică și din introducerea în mediu a celor trei compuși în trei concentrații diferite: insulină (0,1 μ g/ml; 1 μ g/ml; 5 μ g/ml), hidrocortizon (0,01 mg/ml; 0,1 mg/ml; 1 mg/ml) și vitamină A (0,5 μ g/ml; 1 μ g/ml; 5 μ g/ml). Studiul reparării leziunilor în modelul bi-dimensional a fost monitorizat timp de 8 ore la un microscop în contrast de fază Nikon TS 100 F echipat cu o cameră foto automată și cu *Quantiment 500 MC imaging system*, Leica - ce permite capturarea imaginilor după fiecare oră și analiza dimensiunilor leziunilor. S-a pus în evidență că cea mai rapidă acoperire a suprafeței lezate s-a observat în cazul FB incubate cu mediu DMEM + 1 μ g/ml insulină.

Incorporarea FB într-o matrice 3-D (gel de colagen) constituie un model mai realist de ED decât culturile în monostrat ale acelorași celule. Proliferarea și metabolismul mai lent al

celulelor mimează într-un grad mai mare evenimentele care au loc în tegumentul viu. Una dintre principalele caracteristici ale FB este capacitatea lor de a contracta rețeaua de collagen datorită reorganizării (mai compactă) fibrilelor de collagen și excluderii lichidelor printr-un proces care amintește de contracția răni *in vivo*. Acest model și testul contractibilității gelului de collagen oferă o modalitate utilă de studiu a efectelor diferitelor substanțe asupra reparării rănilor pielii. Contractilitatea FB a fost determinată prin evaluarea modificărilor suprafeței gelurilor de collagen, mediată de fibroblaste dermice umane, după practicarea unei leziuni mecanice și pe parcursul a 120 ore de incubare post-leziune, în diferite condiții : (i) cu DMEM în lipsa SFB; (ii) cu DMEM + SFB; (iii) cu DMEM + 5 $\mu\text{g/ml}$ vitamină A; (iv) cu DMEM + SFB + 5 $\mu\text{g/ml}$ vitamină A; (v-vii) cu DMEM + 0,1 μg / 1 μg / 5 μg insulină/ml; (viii-x) cu DMEM + SFB + 0,1 μg / 1 μg / 5 μg insulină/ml. Contractia gelurilor de collagen a fost înregistrată prin fotografia gelurilor utilizând o cameră digitală Nikon Cool Pix 4500 și descărcarea imaginilor pe un computer dotat cu un program de planimetrie. Modificarea suprafeței (% contracție) a fost exprimată ca raportul suprafeței gelului în raport cu suprafața inițială. Rezultatele acestui studiu au arătat că: 1) în lipsa SFB nu are loc contracția gelului, iar mărimea contracției crește cu concentrația SFB; 2) tratamentul cu 5 $\mu\text{g/ml}$ vitamină A inhibă contracția gelului, chiar în prezența a 10 % SFB; 3) Introducerea în mediu a insulinei într-o concentrație de 1 $\mu\text{g/ml}$ crește gradul de contracție a gelului de către FB, sugerând rolul pozitiv al acestui hormon în vindecarea rănilor pielii (dermice). Modificarea suprafeței gelului (% contracție) - evaluată în raport cu suprafața inițială a gelului - a fost calculată pe parcursul celor 120 zile de monitorizare a tratamentelor cu insulină, utilizând un program de analiză cantitativă SigmaScan și cu ajutorul mediului software MedCalc. Această analiză confirmă că insulina facilitează reorganizarea rețelei de collagen sub acțiunea FB, probabil printr-un proces mediat de integrine, care sunt un grup de receptori de pe suprafața celulei, cu structură heterodimerică $\alpha\beta$, ce sunt responsabili pentru migrarea celulelor și comunicarea cu matricea lor extracelulară.

Studiul modificărilor morfologice induse de diverse tratamente a fost realizat prin observare directă a culturii în monostrat și prin colorație cu hematoxilin-eozină și marcarea cu hipericină a culturii 3-D. Inspectarea culturilor de FB în monostrat a pus în evidență două tipuri morfologice celulare: primul miofibroblastic și al doilea fibroblastic. Noi considerăm că primul tip miofibroblastic – stelat și cu procese citoplasmice arborizate, ce apare în grupuri celulare și umple treptat spațiul leziunii în primele 24 ore, corespunde țesutului de granulație. Este posibil ca acest tip morfologic să fie corelat cu apariția unor elemente contractile și a α -SM actinei, ceea ce facilitează procesul de reparare a leziunii (proliferarea celulară, stabilirea de contacte celulă-celulă și refacerea matricei extracelulare). Studiile citomorfologice prin colorație cu Hematoxilin-Eozină, pe culturi 3-D de FB, au arătat că tratamentul post-leziune cu 1 $\mu\text{g/ml}$ insulină + 10 % SFB este urmat de migrarea celulelor spre situsul leziunii, care pare a începe după 2 ore, se amplifică la 5 ore și este un proces complet după 120 ore de la inițierea tratamentului. Tratamentul cu vitamină A nu a stimulat filmul desfășurării acestor evenimente în modelul ED tratat post leziune numai cu DMEM + 10 % SFB. Marcarea cu hipericină a FB crescute în gel de collagen și analiza culturii 3-D în epifluorescență a permis pe de o parte a evidenția numărul, forma și poziția celulelor în diferite etape ale experimentului, dar și gradul de proliferare a culturii datorită localizării perinucleare a acestui foto-sensibilizator. Se constată că tratamentul ED cu mediu DMEM + 10 % SFB în prezență de insulină (1 $\mu\text{g/ml}$) sau vitamină A (5 $\mu\text{g/ml}$) influențează diferit evoluția celulelor la situsul leziunii. În cazul tratamentului post-leziune cu insulină (1 $\mu\text{g/ml}$), se observă că după 48 ore - situsul leziunii este deja populat cu FB, a cărui număr crește vizibil după 72 ore de incubare. După 120 ore, în situsul leziunii se observă celule aproape la confluență, grupate în jurul unui centru de nucleație. Aceiași distribuție « în vârtej » poate fi observată și pe secțiuni fixate și colorate cu Hematoxilin-Eozină. În cazul tratamentului post-leziune cu vitamină A (5 $\mu\text{g/ml}$) se observă o întârziere în migrarea FB la situsul leziunii, după care gradul de acoperire a acestui situs este aproximativ similar ca în cazul tratamentului cu insulină, dar nu apare fenomenul de agregare a celulelor. În microfotografiile de 48 ore se observă zona de delimitare între situsul leziunii și restul gelului populat cu celule. Datele noastre arată clar că efectele post-leziune ale insulinei și vitaminei A se datorează unor mecanisme diferite de acțiune a celor doi compuși, care se reflectă în special la nivelul migrării celulelor și a contactelor celulă-celulă.

Evoluția post-leziune a ED a fost studiată și prin evaluarea viabilității celulelor din gel după 120 ore - utilizând testul cu Trypan Blue și prin dozarea activității metabolice la 72 și 120 ore post-leziune – utilizând testul MTT. Se constată că în ED supus unei leziuni mecanice în urmă cu 120 ore are în constituție celule cu o mare viabilitate, de circa 60 %, indiferent dacă s-a realizat sau nu tratamentul cu vitamină A. În schimb, tratamentul cu insulină crește viabilitatea celulară de la 62 % la 88,4 %, demonstrând un efect anti-apoptotic sau anti-necrotic al acestui hormon. Testul MTT, evaluat după 96 și 120 zile post-leziune, arată că numai insulina este un agent care stimulează proliferarea celulară în raport cu un experiment control realizat cu SFB.

Utilizând kituri ELISA *Chemicon* s-a determinat cantitatea a două gelatinaze : MMP-2 și MMP-9 în mediul de cultură a ED în care s-a practicat o leziune mecanică, tratată cu insulină și vitamină A. În experimentul control post-leziune (incubare cu DMEM + 10 % SFB) nivelul MMP-2 este menținut relativ constant pe parcursul celor 120 ore de monitorizare, iar conținutul MMP-9 crește de circa 4,7 ori după 60 ore și de 3,7 ori după 120 ore. După 60 ore de la tratamentul cu insulină 1 $\mu\text{g/ml}$ se observă creșterea nivelului MMP-2 și MMP-9, în timp ce în intervalul 60 - 120 ore crește numai concentrația MMP-9 (de ~ 5,3 ori). Introducerea vitaminei A (5 $\mu\text{g/ml}$) în mediu de creștere al ED post-leziune induce numai creșterea nivelului MMP-9 de 4 ori în intervalul 90-120 ore post-leziune. Aceste date confirmă eficiența tratamentului cu insulină 1 $\mu\text{g/ml}$ în remodelarea MEC a ED (în special după 90 ore) prin inducția biosintezei MMP-9, probabil prin acțiune pozitivă asupra promotorului genei.

Demonstrarea modelului experimental s-a realizat în cadrul unui experiment pe un iepure care avea o plagă veche, deschisă și neinfectată la nivelul spatelui. După dezinfectarea plăgii s-a aplicat un pansament ocluziv care avea aderat pe partea internă gelul de collagen cu FB crescute 120 ore. După 3 zile s-a îndepărtat pansamentul și s-au recoltat fragmente de piele pentru analize histologice, fără sacrificarea animalului. Atât îndepărtarea pansamentului cât și recoltarea de piele s-a efectuat sub anestezie locală cu xilină. Piese de piele au fost fixate, permeabilizate, dehidratate și incluse în parafină. După realizarea de secțiuni s-au realizat colorări cu hematoxilin-eozină, observându-se formarea țesutului de granulație bogat în FB, depunerea țesutului conjunctiv lax, angiogeneza și compatizarea răni. De asemenea, se observă zone în care matricea este înalt organizată, ceea ce marchează contracția răni - tablou care indică formarea unei cicatrici stabile.