

ISSN 1810-5033

НОВОСТИ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

NEWS OF BIOMEDICAL SCIENCES

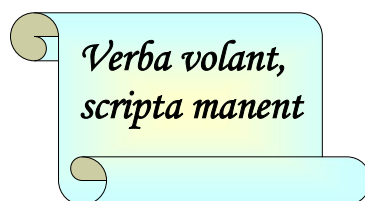
Научно-практический и научно-теоретический журнал

*НБ
МЖ*

*Издается с января 2001 года
Published since January, 2001*

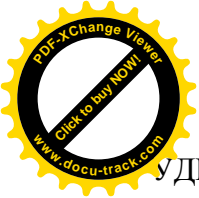
ВНМ

*Выходит четыре раза в год
Published quartely*



2017, Т. 15, № 2

Минск



УДК [61 + 57] (051.2)

**РЕДАКЦИОННАЯ
КОЛЛЕГИЯ:**

В. С. Улащик (*главный редактор*),
В. А. Кульчицкий (*зам. главного редактора*),
А. Г. Чумак (*зам. главного редактора*),
М. О. Досина (*ответственный секретарь*),
Л. И. Арчакова, Ф. И. Висмонт,
И. В. Залуцкий, С. Л. Кабак, В. Н. Калиунов,
Л. М. Лобанок, А. Г. Мрочек,
В. Н. Никандров, Е. И. Слобожанина,
В. В. Солтанов, Н. Ф. Сорока,
Л. А. Федотова, С. Н. Черенкевич

**EDITORIAL
BOARD:**

V. S. Ulashchik (*Editor-in-Chief*),
V. A. Kulchitsky (*Associate Editor-in-Chief*),
A. G. Chumak (*Associate Editor-in-Chief*),
M.O. Dosina (*Responsible Secretary*),
L. I. Archakova, F. I. Vismont,
I. V. Zalutskii, S. L. Kabak, V. N. Kaliunov,
L. M. Lobanok, A. G. Mrochek,
V. N. Nikandrov, E. I. Slobozhanina,
V. V. Soltanov, N. F. Soroka, L.A. Fedotova,
S. N. Cherenkevich

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ (EDITORIAL COUNCIL):

К. В. Анохин (Москва, Россия) **Ю. А. Владимиров** (Москва, Россия), **А. И. Григорьев**
(Москва, Россия), **Д. П. Дворецкий** (Санкт-Петербург, Россия), **В. В. Зинчук** (Гродно,
Беларусь), **Ю. Д. Игнатов** (Санкт-Петербург, Россия), **А. И. Кубарко** (Минск, Беларусь),
В. А. Матюхин (Москва, Россия), **А. Д. Ноздрачев** (Санкт-Петербург, Россия),
Г. Н. Пономаренко (Санкт-Петербург, Россия), **А. Н. Разумов** (Москва, Россия),
В. Ф. Сагач (Киев, Украина), **В. О. Самойлов** (Санкт-Петербург, Россия), **И. Н. Семененя**
(Минск, Беларусь), **В. А. Труфакин** (Новосибирск, Россия), **G. Burnstock** (United Kingdom),
M.-A. Custaud (France), **N. Dale** (United Kingdom), **D. Djuric** (Serbia), **R. Gerstberger**
(Germany), **M. J. Kluger** (USA), **K. M. Spyer** (United Kingdom), **M. Szekely** (Hungary),
W. Winlow (United Kingdom)

**Адрес
редакции:**

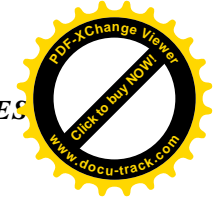
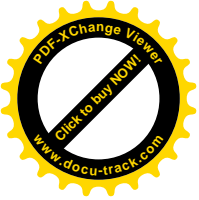
Институт физиологии НАН Беларуси
к. 203, ул. Академическая 28,
220072, Минск, Республика Беларусь
Тел./Факс: +375-17-284-16-30;
Электронная почта: biblio@fizio.bas.-net.by

**Address
of the Editorial Office:**

Institute of Physiology, NAS of Belarus
room 203, Akademicheskaya str. 28,
220072, Minsk, Republic of Belarus
Phone/Fax: +375 17 284-16-30;
E-mail: biblio@fizio.bas.-net.by



© Институт физиологии НАН Беларуси,
Institute of Physiology, NAS of Belarus
© Новости медико-биологических наук
News of Biomedical Sciences



БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

УДК 616.5-006.327-089.843-092.4

Е. В. БАРАНОВ¹, А. В. БУРАВСКИЙ¹, З. Б. КВАЧЕВА², И. Б. ВАСИЛЕВИЧ²,
С. И. ТРЕТЬЯК¹

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ И КЛЕТОЧНЫХ КОМПОЗИЦИЙ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЦЕЛОСТНОСТИ КОЖНЫХ ПОКРОВОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

¹Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь;
²Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

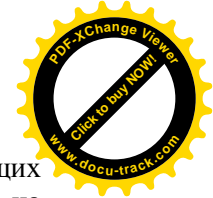
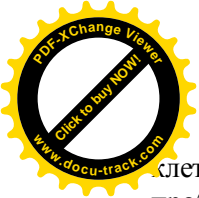
Исследование выполнено на 68 крысах линии Wistar с массой тела 180–200 г. с экспериментальными чистыми ранами диаметром 2,5 см. (4 группы по 17 животных в каждой). В первой группе (контроль) клеточные биопрепараты не применялись. Во второй группе для лечения использовали локальное инъекционное введение культивированных фибробластов кожи крысы (ФКК) в количестве $5,0 \times 10^5$ на каждый раневой дефект (однократно). В третьей группе дважды (с интервалом в 7 суток) вводили локально по $2,5 \times 10^5$ ФКК в каждую рану. В четвертой группе на третьи сутки лечебная доза мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) составила $2,5 \times 10^5$ на каждый раневой дефект, а на 10 сутки – было введено по $2,5 \times 10^5$ ФКК. К 28-и суткам эксперимента площади раневых дефектов у животных контрольной группы уменьшились на 81,7 [80,7; 84,0] % по отношению к исходным данным, а полное заживление ран наступило на 35-е–36-е сутки. Во второй и третьей группах площади раневых дефектов уменьшились к 28-м суткам на 84,3 [83,5; 86,5] % и 95,7 [94,8; 97,9] %, а раны зажили на 31-е–32-е и 29-е–30-е сутки соответственно. У животных четвертой группы полное заживление ран наступило к 23-м–24-м суткам наблюдения. Таким образом, локальная трансплантация ФКК в виде монотерапии и при комбинированном применении с ММСК приводит к ускорению смены фаз раневого процесса и способствует сокращению сроков заживления экспериментальных ран.

Ключевые слова: дермальные фибробласты, мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, локальная трансплантация, лечение ран.

Введение. На современном этапе развития медицины в клинической практике достаточно часто приходится сталкиваться с различными заболеваниями, резистентными к традиционным методам лечения. Это является поводом для непрерывного поиска, разработки и внедрения новых технологий, направленных на улучшение результатов терапии. К категории проблемных патологий относятся трофические язвы (ТЯ) и длительно незаживающие (хронические) раны [1, 5, 7].

В большинстве случаев ТЯ трудно поддаются лечению, многократно рецидивируют и существенно ухудшают качество жизни пациентов – вплоть до получения инвалидности в 10–30% случаев [5, 9]. Комплексное лечение ТЯ должно включать устранение причинного этиопатогенетического фактора (основного заболевания), приводящего к трофическим нарушениям в коже, системную терапию по показаниям, а также методы локального воздействия непосредственно на язвенный дефект, направленные на санацию раневой микрофлоры и стимуляцию процессов регенерации. Однако результаты традиционного лечения этой категории пациентов, несмотря на большое количество предложенных ранее методов, часто являются неудовлетворительными [1, 5, 6, 8]. В связи с этим дальнейшие разработки новых технологий в местном лечении трофических дефектов являются весьма актуальными.

В последние годы все более широкое распространение получают прикладные биомедицинские исследования, направленные на разработку биотехнологий с применением культивируемых клеток человека. Потенциальное использование дермальных фибробластов и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при лечении повреждений кожных покровов – как в виде суспензий, так и биоинженерных клеточно-тканевых конструкций – указывает на появление и формирование в настоящее время нового перспективного направления современной медицины – регенеративной и реконструктивно-восстановительной хирургии [2–4, 6]. Однако широкое клиническое внедрение методов лечения, связанных с локальным применением



клеточных технологий, является научно-практической перспективой, а решение основополагающих проблем регенеративной медицины, как мультидисциплинарного направления, находится на начальном поисковом уровне [3, 6]. Поэтому разработка и научное обоснование эффективных методов локального лечения раневых дефектов с учетом выбора способов доставки, количества и кратности введений клеточного биоматериала является перспективным и необходимым направлением дальнейших экспериментальных и клинических исследований.

Цель исследования. На основании сравнительного анализа объективных показателей заживления ран в динамике течения раневого процесса оценить возможность локальной трансплантации культивируемых фибробластов кожи крыс (ФКК) в виде монотерапии и при комплексном применении с мезенхимальными мультипотентными стволовыми клетками (ММСК) из жировой ткани (ЖТ) для лечения повреждений кожного покрова в эксперименте.

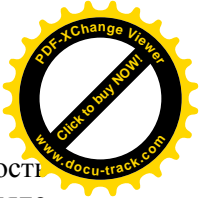
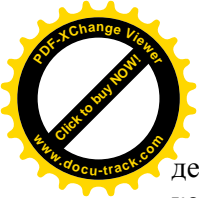
Материалы и методы. Экспериментальные исследования *in vitro* выполнялись на базе лаборатории молекулярной биологии клетки ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси».

Культивирование ФКК. Первичную культуру дермальных ФКК готовили методом эксплантов [4] в нашей модификации. Культивирование клеток проводили в питательной среде DMEM (Sigma) с 10% содержанием сыворотки плодов коров (HyClone) в CO₂-инкубаторе при +37°C, 5% CO₂. Смену среды осуществляли каждые 3–4 суток. После миграции клеток из эксплантов и образования первичного монослоя культуры выполняли субпассирование в течение 3–6 пассажей для накопления необходимой биомассы клеток – (25–30)×10⁶. В экспериментах использовали культуры ФКК на поздней стадии логарифмического роста после образования монослоя (4–5 сутки). Для перевода биоматериала из монослоя в суспензию культуры обрабатывали растворами 0,25% трипсина и 0,02% версена в соотношении 1:2. Для трансплантации использовали суспензию дермальных фибробластов в концентрации (2,5–5,0)×10⁵ клеток/мл.

Культивирование ММСК ЖТ. Все манипуляции по выделению и культивированию ММСК проводили по методике, описанной в работе Р.А. Zuk, М. Zhu, Н. Mizuno, с небольшими модификациями [10]. Полученную ЖТ измельчали. Затем гомогенат ткани подвергали ферментативной обработке в растворах коллагеназы и/или диспазы в результате чего получали клеточную суспензию, из которой путем фильтрования и центрифугирования отделяли фракцию стромальных клеток. Клеточный осадок ресуспендировали в полной питательной среде, высевали на культуральные флаконы и помещали в CO₂-инкубатор. Полную смену ростовой среды проводили каждые 72 часа. При достижении 75%-й конfluenceности монослоя клеток в первичной культуре ММСК пересевали. Плотность посадки клеток составляла 1,0×10⁴ клеток на 1 см² поверхности культурального пластика. Оценку жизнеспособности клеток проводили путём окраски раствором красителя трипанового синего. Дальнейшую смену среды проводили каждые 3–4 суток. Культивирование клеток проводили в CO₂-инкубаторе при 37°C во влажной атмосфере при постоянном давлении 5% CO₂. Морфологию клеток, способность формировать колонии оценивали ежедневно в динамике роста культуры с помощью инвертированного микроскопа «Биолам П2-1» (ЛОМО, Россия). Подсчет клеток проводили в камере Горяева. Фенотипирование осуществляли на проточном цитофлуориметре «FACScanto II» («Becton Dickinson», США). Для идентификации и характеристики культивируемых клеток были использованы наборы моноклональных антител (CD105, CD90, CD44, CD34, CD45), которые являются маркерами, характерными для мезенхимальных клеток-предшественниц. Для трансплантации применяли суспензию ММСК ЖТ (2-го и 3-го пассажей) в концентрации 2,5×10⁵ клеток/мл.

Экспериментальная часть работы *in vivo* выполнялась на базе вивария НИЧ УО БГМУ. Исследования проводили на 68 крысах-самцах (8–10 недельных) линии Wistar с массой тела 180–200 г. Животные содержались в отдельных клетках в стандартных условиях со свободным доступом к пище и воде. Условия кормления и содержания всех лабораторных крыс были одинаковыми. Операции выполнялись с соблюдением правил асептики и антисептики с использованием щадящей методики обезболивания.

Методика моделирования раны и способы проведения трансплантации. В условиях операционной после внутрибрюшинного введения 0,5–0,7 мл 1% раствора натрия тиопентала и экспозиции 15–20 минут лабораторное животное фиксировали в положении prone. Затем на спине крысы выбривали участок кожи размером 3×3 см. На депилированной коже раствором бриллиантового зеленого намечали контур будущей раны и обрабатывали дважды антисептиком. Наносили рану округлой формы диаметром 2,5 см, иссекая кожно-фасциальный лоскут. Раневой



дефект укрывали стерильным прозрачным перевязочным покрытием, которое снижало вероятности контаминации раны извне, обеспечивало адекватный влаго- и газообмен, а также позволяло визуально контролировать течение раневого процесса.

Локальную пересадку клеточного биоматериала выполняли путем инъекций суспензии клеток по периметру и в центральную область раневого дефекта. Количество трансплантируемого материала равномерно распределяли при введении в места инъекций. Общий объем введенного в процессе эксперимента клеточного биоматериала составил $5,0 \times 10^5$ клеток на одну крысу.

Структура эксперимента. Общая выборка разделена на 4 экспериментальные группы. В каждой группе 6 крыс выводили поэтапно в контрольных точках эксперимента для выполнения гистоморфологического исследования раны и около раневых тканей. Остальные животные были предназначены для макроскопической оценки динамики заживления раневых дефектов с применением планиметрического метода исследования.

В первой группе (контроль, $n=17$) заживление кожного дефекта проходило посредством самостоятельной, спонтанной, не стимулированной регенерации (клеточные технологии не применялись). Во второй группе ($n=17$) выполняли локальную трансплантацию ФКК в количестве $5,0 \times 10^5$ каждой крысе (на третьи сутки эксперимента, однократно). В третьей группе ($n=17$) каждой крысе проводили локальную трансплантацию ФКК дважды по $2,5 \times 10^5$ клеток с интервалом 7 суток (на третьи и десятые сутки эксперимента). В четвертой группе ($n=17$) каждой крысе сначала выполняли локальную трансплантацию ММСК ЖТ в количестве $2,5 \times 10^5$ (третьи сутки исследования), а затем через семь суток (на десятые сутки эксперимента) проводили локальную трансплантацию ФКК в количестве $2,5 \times 10^5$ клеток.

С учётом невозможности содержания животных и проведения экспериментов в гнотобиологических условиях всем крысам в наблюдаемых группах с целью профилактики инфицирования ран проводили противовоспалительную терапию. В течение первых семи суток эксперимента ежедневно вводили внутримышечно по 5 мг препарата «Цефтриаксон» (из расчета 25 мг/кг)

Все исследования выполняли в строгом соблюдении принципов биоэтики, согласуясь с рекомендациями «Всемирного общества защиты животных» (WSPA) и требованиями «Европейской конвенции по защите позвоночных животных» (Страсбург, 1986 г.).

Планиметрические методы исследования. При проведении экспериментальных исследований каждый осмотр ран в контрольные сроки наблюдения за животными включал их измерение. Для определения площади раневого дефекта применяли методику компьютерной планиметрии – проводили фотосъемку раны цифровой камерой «Canon PowerShot A460» (China) на фоне линейки. Затем полученное изображение переносили в компьютер и осуществляли обработку графической информации с использованием анализатора изображения «Universal Desktop Ruler v3.3.3269». Полученные данные использовали для изучения показателей динамики заживления экспериментальных ран.

1. Показатель изменения площади раневой поверхности в динамике (ΔS , %):

$$\frac{(S_0 - S_n) \times 100\%}{S_0},$$

где S_0 – исходная площадь раны; S_n – площадь раны на n -е сутки.

2. Относительная скорость уменьшения площади раневого дефекта ($v_{\text{зак.}}$, %/сут):

$$\frac{(S_0 - S_n) \times 100\%}{S_0 \times n},$$

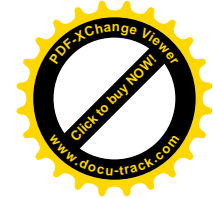
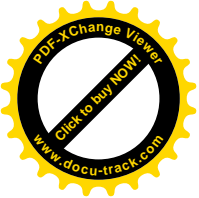
где S_0 – исходная площадь раны, S_n – площадь раны на n -е сутки, n – порядковый номер суток эксперимента.

3. Показатель скорости эпителизации раны ($v_{\text{эпит.}}$, $\text{см}^2/\text{сут}$):

$$\frac{S_0 - S_n}{T},$$

где S_0 – исходная площадь раны; S_n – площадь раны на n -е сутки; T – число суток между измерениями.

Статистическая обработка результатов исследований проведена с использованием непараметрических методов, данные представлены в виде «медиана и квартили» – $Me [Q_{25}; Q_{75}]$. Для сравнения независимых выборок применяли метод Краскела–Уоллиса и U -критерий Манна–Уитни, связанных – метод Фридмана и критерий Вилкоксона с поправкой Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при вероятности безошибочного прогноза не менее 95% ($p < 0,05$).



Результаты и обсуждение.

Сравнительная характеристика течения раневых дефектов в экспериментальных группах.

Сравнительный анализ значений исходных площадей раневых дефектов позволил сделать заключение об отсутствии достоверных различий между группами ($N=0,18$, $p=0,98$). В течение первых 3–4 суток наблюдения во всех группах экспериментальных животных отмечалось некоторое увеличение площадей раневых дефектов до 7,0 [6,9;7,1] см² (диапазон значений – от 6,5 до 7,3 см²). Выявленная особенность обусловлена развитием гистоморфологических изменений в фазу асептического воспаления, что и приводило к деформации ран и изменению их начального размера. Парное сравнение размеров раневых дефектов на третьи сутки эксперимента также не выявило статистически значимых различий между группами ($p>0,05$ во всех случаях). Это обстоятельство имело немаловажное значение для последующей объективной сравнительной оценки полученных данных с помощью планиметрического метода, вычисления основных расчетных показателей динамики заживления (ΔS , $v_{\text{зак.}}$, $v_{\text{эпит.}}$) и проведения статистической обработки.

В результате этапной визуальной макроскопической оценки состояния раневых дефектов у лабораторных животных (7-е, 10-е, 14-е, 21-е, 28-е, 35-е сутки эксперимента), а также сравнения данных планиметрического исследования в динамике были отмечены различия между группами – как в сроках смены фаз раневого процесса, так и окончательного заживления ран (табл. 1).

Табл. 1. Динамика показателей ΔS в экспериментальных группах

Группа	Площадь раневой поверхности в процессе терапии (ΔS , %) – Me [Q ₂₅ ;Q ₇₅]				
	7-е сутки	10-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	28-е сутки
Первая (контроль) (n=11)	26,8 [25,9; 28,8]	38,5 [36,6; 43,7]	54,3 [52,7; 56,1]	66,7 [64,5; 70,5]	81,7 [80,7; 84,0]
Вторая (n=11)	33,8 [32,3; 36,2] * $p=0,001$	53,5 [50,7; 56,1] * $p=0,001$	63,8 [61,3; 65,5] * $p=0,001$	75,7 [73,8; 77,4] * $p=0,001$	84,3 [83,5; 86,5]
Третья (n=11)	29,7 [28,2; 31,9]	45,2 [42,3; 46,5] ** $p=0,001$	70,0 [66,2; 71,2] * $p=0,001$ ** $p=0,03$	85,1 [82,5; 86,7] *** $p=0,001$	95,7 [94,8; 97,9] *** $p=0,001$
Четвёртая (n=11)	38,1 [36,3; 38,7] ** $p=0,03$ */*/* $p=0,001$	54,0 [52,9; 56,8] */*/* $p=0,001$	86,8 [85,7; 90,5] */*/* $p=0,001$ *** $p=0,001$	95,8 [94,4; 98,5] */*/* $p=0,001$ *** $p=0,001$	100 */*/* $p=0,001$ *** $p=0,01$
Тест Краскела–Уоллиса	$H=30,35$ $p=0,0001$	$H=32,96$ $p=0,0001$	$H=38,20$ $p=0,0001$	$H=39,40$ $p=0,0001$	$H=36,23$ $p=0,0001$

Примечание – U-критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони: * – значимость различий с первой группой; ** – значимость различий со второй группой; *** – значимость различий с третьей группой

В контрольных точках эксперимента после локальной клеточной трансплантации в большинстве случаев было зарегистрировано статистически значимое ($p<0,05$) увеличение показателей ΔS по сравнению с соответствующими значениями в группе контроля (исключение – отсутствие значимых различий с показателями в третьей группе на седьмые и десятые сутки эксперимента – $p=0,18$ и $p=0,14$ соответственно, а также с результатом во второй группе на 28 сутки – $p=0,71$). При парном сравнении показателей ΔS не выявлено значимых различий между второй (трансплантация ФК на третьи сутки в количестве $5,0 \times 10^5$ клеток каждой крысе) и третьей (трансплантация ФК на третьи сутки в количестве $2,5 \times 10^5$ клеток каждой крысе) группами на седьмые сутки ($U=24,0$ и $p=0,16$), а также между второй и четвертой (трансплантация ММСК ЖТ на третьи сутки в количестве $2,5 \times 10^5$ клеток каждой крысе) группами на 10 сутки ($U=47,0$ и $p=0,37$) эксперимента. Максимальные показатели ΔS на 7-е, 14-е, 21-е и 28-е сутки были зарегистрированы в четвертой группе (рис. 1).

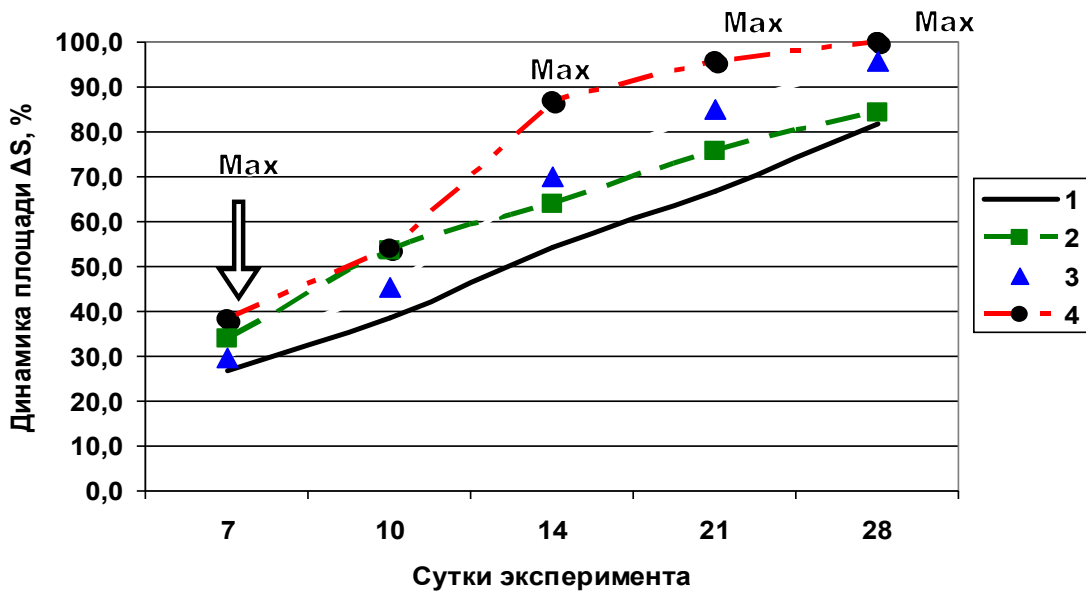
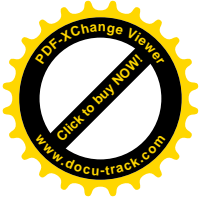
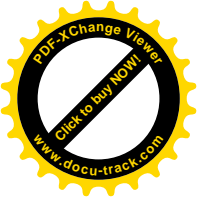


Рис. 1. Межгрупповые различия динамики площади ΔS

Проведение повторной локальной клеточной трансплантации (третья и четвертая группы) приводило к значимому уменьшению размеров раневых дефектов по отношению к таковым после однократной трансплантации ФК (вторая группа), при этом в четвертой группе полное заживление ран отмечено к 23–24 суткам наблюдения.

В ходе анализа полученных данных было установлено наличие внутригрупповой динамики и значимых различий относительной скорости заживления $v_{зж.}$ в группах во второй и четвертой в зависимости от схемы проведения локальной клеточной трансплантации (табл. 2).

Табл. 2. Динамика показателей скорости заживления раневого дефекта

Группа	Относительная скорость заживления раневого дефекта (%/сутки) Me [Q ₂₅ ; Q ₇₅]					метод Фридмана
	7	10	14	21	28	
Первая (контроль) (n=11)	3,8 [3,7; 4,1]	3,8 [3,6; 4,4]	3,9 [3,7; 4,0]	3,2 [3,1; 3,4] ****p=0,03 **p=0,05	2,9 [2,9; 3,0] ****p=0,03 ****p=0,03	ANOVA Chi Sqr.=35,1 p=0,0001
Вторая (n=11)	4,8 [4,6; 5,2]	5,3 [5,1; 5,6]	4,6 [4,4; 4,7] **p=0,03	3,6 [3,5; 3,7] ****p=0,03	3,0 [3,0; 3,1] ****p=0,03	ANOVA Chi Sqr.=40,3 p=0,0001
Третья (n=11)	4,2 [4,0; 4,6]	4,5 [4,2; 4,6]	5,0 [4,7; 5,1]	4,1 [3,9; 4,1] **p=0,04 ***p=0,03	3,4 (3,4; 3,5) ****p=0,03	ANOVA Chi Sqr.=33,8 p=0,0001
Четвёртая (n=11)	5,4 [5,2; 5,5]	5,4 [5,3; 5,7]	6,2 [6,1; 6,5] **p=0,03	4,6 [4,5; 4,7] *p=0,04 **/**p=0,03	Рана зажила на 23-24 сутки	ANOVA Chi Sqr.=26,6 p=0,0001

Примечание – достоверность различий по критерию Вилкоксона с поправкой Бонферрони при сравнении с результатами на: * – 7-е, ** – 10-е, *** – 14-е и **** – 21-е сутки

Наиболее высокие показатели относительной скорости заживления $v_{зж.}$ регистрировались в каждой из опытных групп на протяжении 3–7 суток после инъекций клеточных биопрепаратов. После однократной трансплантации (вторая группа) снижение данного показателя $v_{зж.}$ было отмечено к 14-м суткам наблюдения. В случаях повторного применения клеточных трансплантатов (третья и четвертая группы) относительная скорость заживления раневых дефектов оставалась на достаточно высоком уровне не менее 14 суток, а значимое ее снижение наблюдалось лишь с 21-х суток эксперимента (рис. 2).

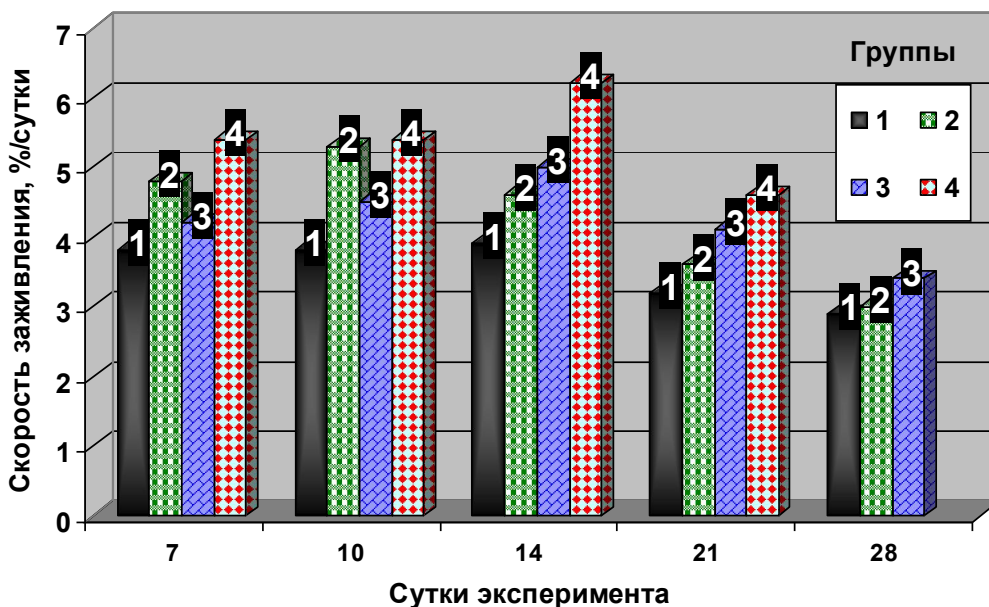


Рис. 2. Скорость заживления раневых дефектов

Минимальные значения скорости заживления на всех этапах эксперимента были зарегистрированы в первой группе (при сравнении с результатами остальных групп $p < 0,05$ во всех случаях, за исключением второй группы на 28-е сутки – $U=32,0$; $p=0,052$). Результаты во второй и четвертой группах на 10-е сутки эксперимента не имели статистических различий ($U=47,0$; $p=0,37$). При парном сравнении изучаемого показателя максимумы на 7-е, 14-е и 21-е сутки зарегистрированы в четвертой группе ($p < 0,05$ во всех случаях). Таким образом, с 7-х по 21-е сутки эксперимента относительная скорость заживления после проведения локальной клеточной трансплантации была значимо больше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$ во всех случаях).

Сравнительный анализ экспериментальных данных, полученных при различных схемах клеточной трансплантации, с использованием метода Спирмена выявил статистически достоверное ($p < 0,05$ во всех случаях) наличие прямой корреляционной связи между количеством трансплантированных клеток и скоростью заживления раневых дефектов (первая, вторая и третья группы): умеренной – на 7-е сутки ($p=0,736$), сильной – на 10-е сутки ($p=0,846$), умеренной – на 14-е ($p=0,526$) и 21 ($p=0,432$) сутки эксперимента. Между кратностью применения клеточных технологий и скоростью заживления (вторая, третья и четвертая группы) отмечена умеренная прямая корреляция на 14-е ($p=0,701$) и сильная прямая – на 21-е ($p=0,816$) сутки ($p < 0,05$ в обоих случаях).

В результате анализа были выявлены существенные изменения, а также меж- и внутригрупповые различия показателей скорости эпителизации раневых дефектов в процессе проведения эксперимента. Максимальные внутригрупповые показатели ее в первой, второй и третьей группах наблюдались в интервале «3–10 сутки», в дальнейшем было отмечено прогрессивное уменьшение скорости эпителизации. В четвертой группе не менее 14-и суток наблюдались стабильно высокие значения скорости эпителизации и значимое ее снижение зарегистрировано в период «14–21 сутки» (табл. 3).

Парное межгрупповое сравнение значений скорости эпителизации раны позволило установить значимое превышение показателей второй группе над результатами контрольной группы в интервале «3-е–10-е сутки» ($p=0,0001$), отсутствие различий с контролем в периоды «7-е–14-е сутки» и «14-е–21-е сутки» ($U=41,5$; $p=0,207$ и $U=52,0$; $p=0,566$, соответственно), а также значимое снижение данного показателя во второй группе в период «21-е–28-е сутки» при сравнении с контрольными данными ($p=0,004$). В третьей и четвертой группах на протяжении первых 14-и суток наблюдения регистрировались стабильно высокие показатели скорости эпителизации раны, достоверно большие, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). Однако максимальные расчетные значения скорости эпителизации «3-е–10-е сутки» были отмечены во второй и четвертой группах ($p=1,0$ при сравнении этих двух групп и $p < 0,05$ во всех остальных случаях), а во временном интервале «7-е–14-е сутки» – в четвертой группе ($p=0,0001$ во всех случаях) (рис. 3).

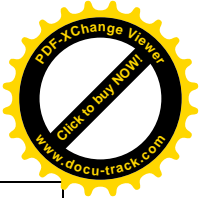
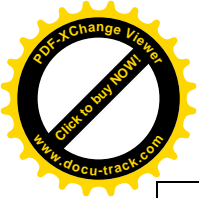


Табл. 3. Динамика показателей скорости эпителизации раны

Группа	Скорость эпителизации раны, см ² /сутки – Ме [Q ₂₅ ;Q ₇₅]			
	3-е–10-е сутки	7-е–14-е сутки	14-е–21-е сутки	21-е–28-е сутки
Первая (контроль) (n=11)	0,37 [0,36; 0,44]	0,26 [0,25; 0,30] * <i>p</i> =0,003	0,11 [0,11; 0,15] */* <i>p</i> =0,003	0,16 [0,13; 0,17] */* <i>p</i> =0,003
Вторая (n=11)	0,53 [0,50; 0,56]	0,30 [0,29; 0,32] * <i>p</i> =0,003	0,11 [0,10; 0,13] */* <i>p</i> =0,003	0,10 [0,07; 0,12] */* <i>p</i> =0,003
Третья (n=11)	0,44 [0,43; 0,48]	0,41 [0,34; 0,42] * <i>p</i> =0,02	0,16 [0,14; 0,19] */* <i>p</i> =0,003	0,11 [0,10; 0,12] */* <i>p</i> =0,003 */* <i>p</i> =0,01
Четвёртая (n=11)	0,54 [0,52; 0,57]	0,50 [0,47; 0,53]	0,09 [0,07; 0,10] */* <i>p</i> =0,003	Рана зажила на 23-24 сутки

Достоверность различий по критерию Вилкоксона с поправкой Бонферрони при сравнении с результатами: *– интервала 3-е–10-е сутки, **– интервала 7-е–14-е сутки, ***– интервала 14-е–21-е сутки

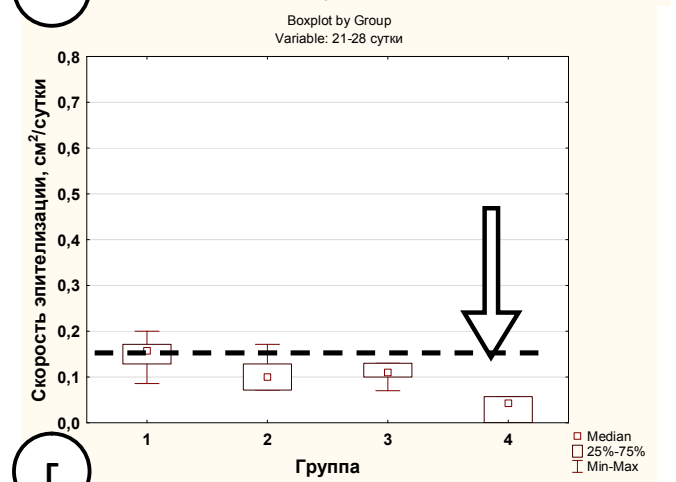
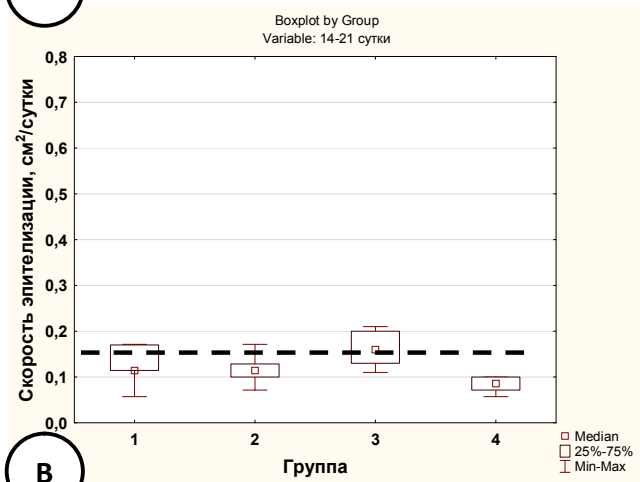
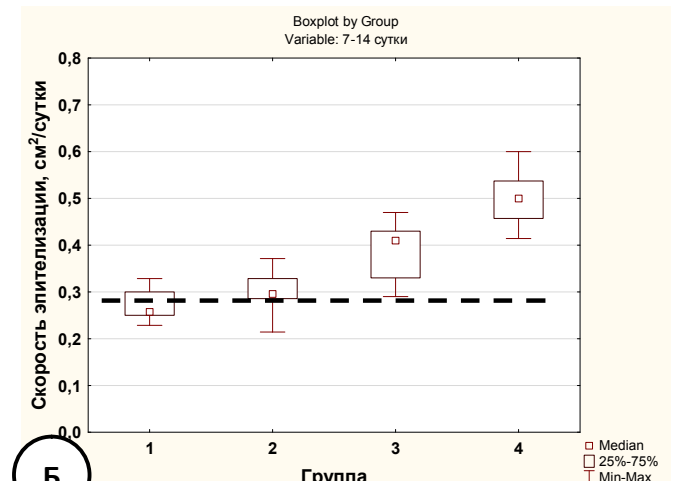
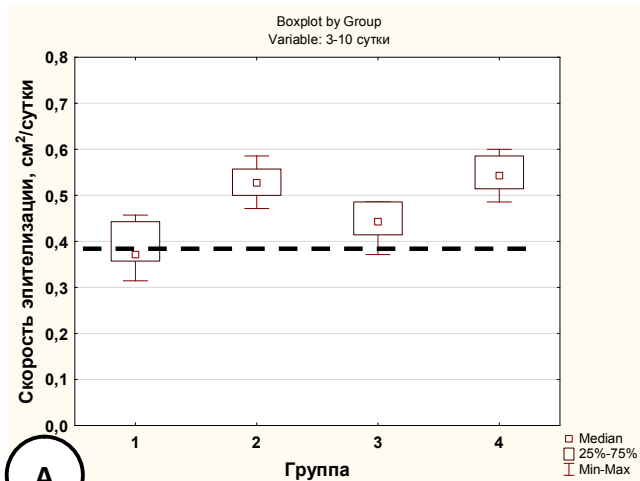
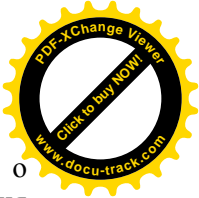
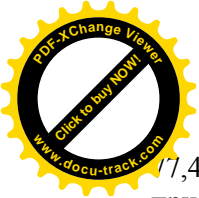


Рис. 3. Скорость эпителизации раневых дефектов в группах А –3-е–10-е сутки; Б –7-е–14-е сутки; В –14-е –21-е сутки; Г –21-е–28-е сутки. Пунктиром отмечен уровень скорости эпителизации в контрольной группе, стрелкой – время наступления полной эпителизации раневых дефектов в четвертой группе

При заданных условиях исследования прогрессивное снижение показателей относительной скорости заживления и особенно скорости эпителизации, после 14 суток эксперимента на фоне значительного уменьшения размеров ран в основных группах к 21-м суткам (вторая – 75,7 [73,8;



77,4] %; третья – 85,1 [82,5; 86,7] %; четвертая – 95,8 [94,4; 98,5] %) свидетельствовало о приближении срока полного заживления раневого дефекта, где ведущим механизмом сокращения раны являлась ее контракция. После проведения локальной клеточной трансплантации полной эпителизации раны предшествовали минимальные значения скорости эпителизации.

Анализ результатов визуальной макроскопической оценки состояния раневых дефектов у лабораторных животных, а также сравнение данных планиметрических исследований в динамике выявили различия между группами в сроках окончательного заживления ран. У животных четвертой группы полное заживление ран наступило к 23–24 суткам наблюдения. К 28-и суткам эксперимента площадь раневых дефектов у животных контрольной группы уменьшились на 81,7 [80,7; 84,0] % по отношению к исходным данным, а полное заживление ран наступило на 35-е–36-е сутки. Во второй и третьей группах площади раневых дефектов уменьшились к 28 суткам на 84,3 [83,5; 86,5] % и 95,7 [94,8; 97,9] %, а раны зажили на 31-е–32-е и 29-е–30-е сутки, соответственно.

Таким образом, проведенные исследования и анализ полученных результатов позволяют сделать заключение о том, что локальная трансплантация ФКК в виде монотерапии и при комбинированном применении с ММСК ЖТ приводят к ускорению смены фаз раневого процесса и способствуют сокращению сроков заживления экспериментальных «чистых» ран у лабораторных животных с раневыми дефектами по сравнению с группой контроля.

Выводы.

1. Повторная локальная клеточная трансплантация (третья и четвертая группы) сопровождалась значимым уменьшением размеров раневых дефектов (на 14-е, 21-е и 28-е сутки наблюдения) по сравнению с результатами после однократной трансплантации ФКК (вторая группа).

2. При использовании различных способов локальной трансплантации скорость заживления достоверно увеличивалась в основных группах животных к 10-м суткам по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Однако на 14-е сутки в группах, где проводили монотерапию ФКК как однократно, так и этапно (вторая и третья экспериментальные группы) темп репарации достоверно ($p < 0,05$) отставал от скорости заживления ран у животных четвертой группы, в которой применяли комбинированную доставку клеточного биоматериала (сначала ММСК, затем ФКК – с интервалом в семь суток).

3. Анализ результатов экспериментальных исследований *in vivo* продемонстрировал, что течение процессов заживления в экспериментальных ранах при локальном применении клеточных технологий зависит как от условий трансплантации (применяемые клеточные биоматериалы), так и от количества и этапности введения клеточного биоматериала.

4. Локальное применение клеточных технологий для восстановления поврежденных кожных покровов представляется потенциально перспективным вариантом реабилитации этой категории пациентов, – особенно с заболеваниями, резистентными к традиционным методам лечения.

Литература:

- [1]. Абаев Ю.К. // Медицинские новости. 2003. №6. С. 3–10.
- [2]. Бабаева А. Г. Регенерация – факты и перспективы М.: РАМН, 2009. 334 с.
- [3]. Биология стволовых клеток и клеточные технологии в двух томах / Под ред. М.А. Пальцева. М.: Изд-во Медицина, Изд-во «Шико», 2009. Т. 1. 272 с.
- [4]. Блинова М.И. и др. // Информационный бюллетень Клеточные культуры. 2006. Вып. 21. С. 33–44.
- [5]. Толстых П.И. и др. Длительно незаживающие раны и язвы (патогенез, клиника, лечение): М.: Дипак, 2009. 168 с.
- [6]. Клеточные технологии для регенеративной медицины: сб. под ред. Г. П. Пинаева, М.С. Богдановой, А.М. Кольцовой. СПб.: Изд-во Политехн. Ун-та, 2011. 332 с.
- [7]. Котенко К.В. и др. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2012. Т. VII, № 2. С. 97–102.
- [8]. Зорина А.И. и др. // Косметика и медицина. 2011. № 2. С. 12–26.
- [9]. Учкин И. Г., Багдасарян А. Г. // Русский медицинский журнал. 2013. Т. 21, № 15. С. 810–814.
- [10]. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. // Tissue Eng. 2001. Vol. 7. P. 211–228.

Поступила в редакцию: 28.03.2017 г.