

С. И. Третьяк¹, М. К. Недзведь¹, А. Сахаб Хайдар¹, Е. В. Баранов¹,
Е. С. Лобанок², И. Б. Василевич², Л. В. Бутько¹, И. Н. Слабко¹

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ДЛИТЕЛЬНО НЕЗАЖИВАЮЩИХ ИНФИЦИРОВАННЫХ РАН В ЭКСПРЕИМЕНТЕ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»¹,
«Институт биофизики и клеточной инженерии НАН РБ»²

В статье представлены результаты морфологических исследований у лабораторных животных с моделированной инфицированной раной, в комплексном лечении которых применялась трансплантация мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из жировой ткани. Установлено, что МСК стимулируют процессы регенерации и ускоряют заживление ран. Полученные результаты, могут служить основанием о возможности дальнейших разработок по внедрению в клиническую практику клеточной терапии у пациентов с длительно незаживающими инфицированными ранами.

Ключевые слова: длительно незаживающие инфицированные раны, мезенхимальные стволовые клетки, жировая ткань.

**S. I. Tretiak, M. K. Nedzved, A. Sahab Haidar, E. V. Baranov,
E. S. Lobanok, I. B. Vasilevich, L. V. Butko, I. N. Sapko**

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE EFFECTIVENESS MESENCHYMAL STEM CELLS FROM ADIPOSE TISSUE IN THE COMPLEX TREATMENT OF NONHEALING INFECTED WOUNDS IN EKSPREIMENTE

The paper presents the results of morphological studies in laboratory animals with simulated nonhealing wound. After transplantation of mesenchymal stem cells (MSCs) from adipose tissue. It is established that MSCs stimulate regeneration and accelerate wound healing. The results obtained may serve as the basis of the possibility to develop and introduce into clinical practice of cell therapy in patients with nonhealing infected wounds.

Key words: nonhealing infected wounds, mesenchymal stem cells, adipose tissue.

Лечение инфицированных ран является одной из актуальных задач клинической медицины. Проблема восстановления утраченного кожного покрова при заболеваниях и повреждениях различной этиологии остается актуальной во всем мире. На протяжении нескольких последних лет ведущей доктриной лечения являлись местное лечение с использованием различных антисептиков, мазей и применение радикальной хирургической обработки ран, предусматривавшей широкое иссечение краев раны с удалением нежизнеспособных и инфицированных тканей [1]. Длительно незаживающие раны весьма распространенное заболевание, встречающееся у 2-4% взрослого населения индустриально развитых стран. Они характеризуются низкой склонностью к заживлению, сложностью и дороговизной лечения. Сопровождаясь выраженным болевым синдромом, они обрекают пациентов на длительные, часто многолетние страдания [2,3,4,5]. Несмотря на большое количество предложенных в настоящее время методов лечения длительно незаживающих инфицированных ран и язв, разработка и внедрение в клиническую практику более эффективных методик, остаётся актуальным направлением клинической медицины. Клеточная терапия в комплексном лечении инфицированных ран может быть одним из перспективных методов, в ряде случаев превосходящим по эффективности применение современных раневых покрытий и других методов лечения. Это обстоятельство послужило основанием для проведения экспериментальных ис-

следований по изучению влияния мезенхимальных стволовых клеток на течение раневого процесса.

Цель: Изучить морфологические признаки эффективности применения мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани в комплексном лечении длительно незаживающих ран у лабораторных животных.

Материал и методы

Для проведения эксперимента были использованы взрослые белые крысы линии Vistar весом 160-200 гр. Все животные находились на стандартном рационе питания в виварии БГМУ со свободным доступом к пище и воде. У экспериментальных животных выполняли моделирование округлой раны на спине по отработанной методике. Затем дно и края раны инфицировались путем инъекций 24-часовой монокультур эталонных штаммов бактерий (*Staphylococcus aureus*), суспензированной в 0,9% растворе натрия хлорида до 1×10^9 КОЕ/мл (концентрация определялась по стандарту мутности). Объем вводимой взвеси микробов составлял 2 мл. Гнойную рану получали спустя 2 суток от времени начала моделирования. Все животные были разделены на две группы: контрольную (n=6) и основную (n=6). В контрольной группе, начиная со вторых суток от начала эксперимента, ежедневно проводили системную антибактериальную терапию препаратом цефтриаксон, который относится к цефалоспориновым антибиотикам III поколения и обладает широким спектром действия. Этот препарат, вводили ежедневно внутримышечно в дозе 0,5 мг, начиная со 2-х суток от времени моделирования ран на протяжении всего периода наблюдения. В основной группе животных



Рис.1. Основная группа (10 сутки): на поверхности раны небольшой струп, тонкий слой молодой соединительной ткани с большим количеством жировых клеток. Окраска г-э. x 46.

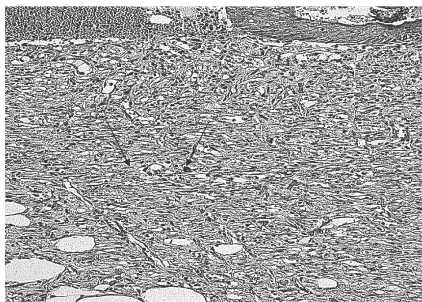


Рис. 2. Та же группа. Большое количество коллагеновых волокон и фибробластов. Окраска МАГ x 400.

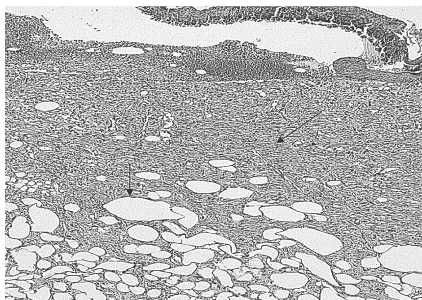


Рис.3. Та же группа, молодая соединительная ткань и большое количество жировых клеток x 200.

рию. В основной и контрольной группах животных вывели из эксперимента на 3,5,7,10,14 сутки. В эти сроки вырезались кусочки по большому диаметру раны с краями и подлежащей подкожно-жировой клетчаткой, а также мышцами (центр и периферия) для гистологического исследования. Парафиновые срезы окрашивались гематоксилином и эозином и на коллагеновые волокна МАГ [марциус-алый-голубой]. В дальнейшем проводили световую микроскопию срезов тканей экспериментальной раны в разных полях зрения.

Результаты и обсуждение

Спустя 2-ое суток с времени инфицирования раны в сравнимых группах характеризовались наличием геморрагического струпа, незначительного запаха, умеренного количества серозно-геморрагического экссудата, а иногда и гнойного характера, вокруг ран отмечался воспалительный инфильтрат, покраснение и отек окружаю-

щих тканей. В основной группе на 3-е сутки после трансплантации МСК ЖТ отмечалось: рана была глубокая, достигающая до жировой клетчатки, и была пропитана свежей кровью. Она была покрыта небольшим струпом, под которым располагался толстый слой грануляционной ткани. Воспалительный процесс распространяется за пределы раны. Окраска г-э. x 46.

лечение включало как выбранную антибактериальную, так и клеточную терапию с применением мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из жировой ткани (ЖТ) крыс. В этой группе после санации инфицированной раны антисептиками, в асептических условиях выполняли трансплантацию МСК ЖТ методом локальной доставки вокруг раны и в области раневого дефекта. МСК ЖТ вводили путём инъекции в количестве 1×10^6 клеток/мл. Ежедневно проводился объективный осмотр раны с динамической фотосъёмкой и наблюдение за состоянием животных. Оценка раневого дефекта проводилась по следующим критериям: наличие запаха, количество экссудата, состояние раны и окружающих тканей. Выполняли динамическую планиметрию.

В основной и контрольной группах животных вывели из эксперимента на 3,5,7,10,14 сутки. В эти сроки вырезались кусочки по большому диаметру раны с краями и подлежащей подкожно-жировой клетчаткой, а также мышцами (центр и периферия) для гистологического исследования. Парафиновые срезы окрашивались гематоксилином и эозином и на коллагеновые волокна МАГ [марциус-алый-голубой]. В дальнейшем проводили световую микроскопию срезов тканей экспериментальной раны в разных полях зрения.

В основной группе на 3-е сутки после трансплантации МСК ЖТ отмечалось: рана была глубокая, достигающая до жировой клетчатки, и была пропитана свежей кровью. Она была покрыта небольшим струпом, под которым располагался толстый слой грануляционной ткани. Воспалительный процесс распространяется за пределы раны. Окраска г-э. x 46.

В области краёв раны отмечался умеренный воспалительный инфильтрат. На 5-е сутки рана была покрыта струпом, состоящим преимущественно из плазменных белков, под которыми находился тонкий слой некротизированной ткани, пропитанной кровью и молодой грануляционной тканью с большим количеством фибробластов. Выявлялись единичные коллагеновые волокна, которые были ориентированы вдоль раны. Среди грануляционной ткани так же определялись жировые клетки. На 7-е сутки рана была покрыта небольшим струпом, под которым отмечалось образование грануляционной ткани, с большим количеством коллагеновых волокон. В поверхностных отделах грануляций располагались фибробласты, а воспалительный процесс был выражен слабо. На 10-е сутки раневая поверхность была представлена молодой соединительной тканью (рис. 1), в которой определялись большое количество горизонтально ориентированных коллагеновых волокон (рис.2). Среди коллагеновых волокон на разных уровнях раны располагались большое количество жировых клеток (рис.3). На 14-е сутки поверхность раны была представлена соединительной тканью, местами эпителизирована. В контрольной группе на 14 сутки в грануляционной ткани сохранялись признаки заметного воспаления раны (рис. 4 и 5), и отставание регенераторных процессов. При визуальном изучении ран в контрольной группе в эти сроки хорошо заметны выявлены изменения (рис. 6). Морфологические изменения коррелировали с результатами общего анализа крови и бактериальных посевов. Скорость снижения уровня лейкоцитов и микробного обсеменения в основной группе превосходила таковые данные в контрольной группе. Скорость эпителизации в основной группе составила ($15,15 \text{ мм}^2/\text{сутки}$) и была выше, чем в контрольной группе, где этот показатель соответствовал $11,22 \text{ мм}^2/\text{сутки}$. (начальная

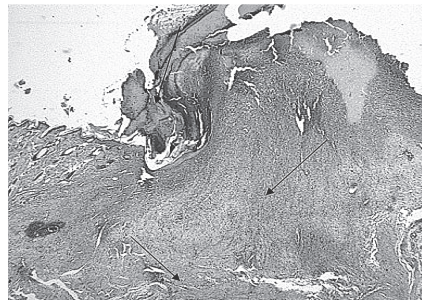


Рис. 4. Контрольная группа (14 сутки). Край и поверхность раны покрыты струпом, под которым располагается толстый слой грануляционной ткани. Воспалительный процесс распространяется за пределы раны. Окраска г-э. x 46

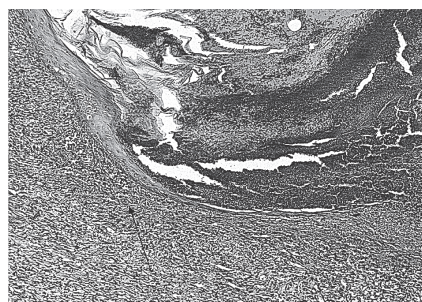


Рис.5. Та же группа, под струпом молодая грануляционная ткань. Окраска г-э. x 100

площадь раневого дефекта была 235,62 мм², однако на 14-е сутки она составила в контрольной группе 78,54 мм², а в основной 23,56 мм²).

Таким образом, под действием МСК смена фаз течения раневого процесса в основной группе происходила раньше, чем контрольной. Ускорение процесса эпителизации раны в основной группе животных мы связываем с функциональной активностью МСК из жировой ткани, влияющих на скорость образования и созревания грануляционной ткани и фибробластов посредством выделения ими ряда факторов. При использовании аллогенных мезенхимальных клеток для лечения гнойных ран отмечалось более раннее купирование воспалительного процесса, ускорение созревания грануляционной ткани, в которой коллагеновые волокна принимают упорядоченное положение и ускоряют эпителизацию поверхности раны на фоне комплексного лечения.

Литература

1. Винник, Ю. С. Особенности патогенеза длительно незаживающих ран //Ю. С.Винник, А. Б. Салмина, А. И. Дробушевская //Новости хирургии 2011.Т.19. №3. С101 – 110.
 2. Блатун, Л. А. Местное медикаментозное лечение ран. Проблемы и новые возможности их решения //Л. А.Блатун // Consilium medicum.Хирургия-2007-№1. – Прил.№1 – С9 – 16.
 3. Гавриленко, А. В. Использование фибробластов и кератиноцитов в комплексном лечении венозных трофических язв А. В. Гавриленко, О. В.Павлова, П. Е.Вахрамьян // Хирургия журн. им. Н.И.Пирогова. – 2008. – №10. – С.25 – 28.
 4. Baker, S. R., Stacey M. C., Jopp-VcRfe A. G. I/Epideviology of chronicvenous ulcers/Br.J.Surg.1991.78.864 – 867.
 5. Nelzen, O., Bergvisi D., Lindhagen A / The prevalence of chronic lower-Limb ulceration has been under estimated results of a validate population questionnaire.Br. J Surg/1996.83.255 – 258.
- Поступила 31.01.2012 г.