

Е. В. Баранов¹, А. В. Буравский¹, И. Б. Василевич², С. И. Третьяк¹

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДИНАМИКИ ЗАЖИВЛЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЧИСТЫХ РАН ПРИ ЛОКАЛЬНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СВЕТОДИОДНОГО ФОТОРЕГУЛЯТОРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ И МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ

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

В статье представлены результаты экспериментальных исследований на лабораторных животных ($n = 85$) с моделированной чистой раной диаметром 2,5 см, в лечении которых использовались мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК), полученные из жировой ткани (ЖТ), и фоторегуляторное воздействие (ФРВ) с использованием монохроматического поляризованного светодиодного излучения (ПСИ) с длиной волны $\lambda = (0,630 \pm 0,03)$ мкм и плотностью энергии облучения 10 ± 5 Дж/см². Было сформировано 5 групп — по $n = 17$ животных в каждой: 1 — контрольная (спонтанная регенерация раны) и 4 — основных группы. Достоверно определено, что более высокий темп регенерации ран наблюдался в группах с применением клеточного биоматериала и ФРВ. Выявлено, что течение процессов заживления экспериментальных раневых дефектов зависело от условий (схемы) проведения трансплантации — как от количества применяемых ММСК, так и от кратности их локального введения. В условиях эксперимента установлено, что локальное применение ФРВ и ММСК приводит к ускорению смены фаз раневого процесса и к достоверному сокращению сроков эпителизации раневых дефектов.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани, фоторегуляторное воздействие, лечение ран.

E. V. Baranov, A. V. Buravsky, I. B. Vasilevich, S. I. Tretyak

COMPARATIVE EVALUATION OF THE CLEAN WOUND HEALING AFTER LOCAL USE OF THE LIGHT-EMITTING DIODE STIMULATING ACTION AND MULTIPOTENT MESENCHYMAL STEM CELLS FROM ADIPOSE TISSUE IN THE EXPERIMENT

The article presents the results of experimental studies conducted in laboratory rats ($n = 85$) with models of clean wounds 2.5 cm in diameter. We used multipotent mesenchymal stem cells (MMSC) derived from adipose tissue (AT), and photoregulatory exposure (PRE) using monochromatic polarized light-emitting diode radiation (PLEDR) with wavelength $\lambda = (0,630 \pm 0,03)$ μm and density of the irradiation energy 10 ± 5 J/cm² for their treatment. Five groups (according to $n = 17$ animals in each) were formed: 1 — control

(spontaneous regeneration of the wound) and 4 — major groups. It was reliably determined that a higher rate of wound regeneration was observed in groups with the use of cellular biomaterial and PRE. It was revealed that the course of the healing processes of the experimental wound defects depended on the conditions (scheme) of the transplantation — both the number of MMSCs used and the multiplicity of their local administration. It was found that the local application of PRE and MMSC led to an acceleration of phase change in the wound process and to a significant reduction in the duration of epithelialization of wound defects.

Keywords: mesenchymal stem cells from adipose tissue, photoregulatory exposure, wound treatment.

Раневой процесс является сложным комплексом биологических реакций организма, — как местных, так и общих, — развивающихся в ответ на повреждение тканей и направленных на их восстановление. Динамика регенерации любой раны представляет собой последовательный каскад сменяемых стадий развития патофизиологических изменений, которые регулируются целым комплексом разнообразных клеточных процессов (включая фагоцитоз, хемотаксис, митогенез, синтез коллагена и ряда других компонентов внеклеточного матрикса), а также взаимодействием структурных элементов раны с пулом недифференцированных стволовых/прогенераторных клеток тканевых ниш различных органов и систем [2, 3, 7, 9, 10].

В настоящее время разработано большое количество методов лечения, направленных на ускорение репаративно-регенераторных процессов при локальном лечении ран, ожогов и трофических язв различной этиологии. При широкой апробации большинство из применяемых методов лечения оказались недостаточно эффективными — особенно в отношении трофических язв и длительно незаживающих ран [1, 6, 8]. Поэтому проблема лечения этой категории пациентов в целом остаётся ещё далёкой от эффективного решения, а разработка и совершенствование методов локального лечения хронических ран остаётся актуальной задачей. Научно-технический прогресс способствует реализации и внедрению в клиническую практику новых перспективных методов лечения раневых дефектов, основанных на комбинированном действии физических и биологических факторов [4, 5, 6, 8]. К числу таких методов относятся светодиодная фототерапия — в частности, фоторегуляторное воздействие (ФРВ) — и клеточные технологии, в том числе и с применением мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) из жировой ткани (ЖТ) [2, 3, 7].

Цель исследования. Провести сравнительную оценку показателей динамики заживления раневых дефектов при локальном использовании светодиодного фоторегуляторного воздействия и мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани для лечения повреждённых кожного покрова в эксперименте.

Материалы и методы

Экспериментальная часть работы выполнялась на базе вивария ЦНИЛ УО БГМУ. Исследования были проведены на 85 крысах-самцах (8-10 недельных) линии Wistar массой тела 180—200 г. Животные содержались в отдельных клетках в стандартных условиях со свободным доступом к пище и воде. До начала эксперимента крысы взвешивались, осматривались на наличие видимой патологии и признаков болезней, выдерживались в боксе в течение одной недели для адаптации к новым условиям. Операции выполнялись с соблюдением правил асептики и антисептики с использованием щадящей методики обезболивания. Все исследования проводились в строгом соблюдении принципов биоэтики согласно с рекомендациями «Всемирного общества защиты животных» (WSPA) и требованиями «Европейской конвенции по защите позвоночных животных» (Страсбург, 18.03.1986 г.), а также в соответствии

с «Положением о порядке использования экспериментальных животных в научно-исследовательских работах и учебном процессе в Белорусском государственном медицинском университете и мерах по реализации требований биомедицинской этики» (протокол № 7 от 31.08.2006 г.).

Методика моделирования раны

В условиях операционной после внутрибрюшинного введения 0,5—0,7 мл 1% раствора тиопентала натрия (из расчета 40—60 мг/кг), экспозиции 15—20 минут фиксировали лабораторное животное за лапки с помощью четырёх держалок в положении лёжа на животе. Затем на спине животного выривали участок кожи размерами 3×3 см. На депилированной коже крысы раствором бриллиантового зеленого намечали контур будущей раны. Кожу обрабатывали дважды антисептиком «Йодонат». Наносили рану округлой формы диаметром 2,5 см, иссекая кожно-фасциальный лоскут. Раневой дефект укрывали стерильным прозрачным перевязочным покрытием, которое снижало вероятность контаминации раны извне, обеспечивало адекватный влаго- и газообмен, а также позволяло визуально контролировать течение раневого процесса. С учётом невозможности содержания животных и проведения экспериментов в гнотобиологических условиях всем крысам в наблюдаемых группах с целью профилактики инфицирования ран проводили антибиотикотерапию. В течение первых 7 суток эксперимента ежедневно вводили внутримышечно по 5 мг препарата Цефтриаксон (из расчета 25 мг/кг).

Структура эксперимента

Всего было сформировано 5 экспериментальных групп. В каждой группе 11 крыс были предназначены для макроскопической оценки динамики заживления раневых дефектов с применением планиметрического метода исследования, еще 6 животных выводились поэтапно в контрольных точках эксперимента для выполнения гистоморфологического исследования раны и околораневых тканей.

В первой группе (контроль, $n = 17$) заживление кожного дефекта проходило посредством самостоятельной, спонтанной, не стимулированной регенерации (ФРВ и клеточные биопрепараты не применялись).

Во второй группе ($n = 17$) проводили локальное ФРВ на область раневого дефекта с 3 по 7 сутки эксперимента (по одному сеансу в день каждой крысе на протяжении 5 суток).

В третьей группе ($n = 17$) выполняли локальную трансплантацию ММСК путём инъекции суспензии клеток по краю раневого дефекта и в центральную часть раны в количестве 250×10^3 клеток каждой крысе (на 3 сутки эксперимента, однократно);

В четвёртой группе ($n = 17$) осуществляли локальную пересадку ММСК путём инъекции суспензии клеток по краю раневого дефекта и в центральную часть раны в количестве 500×10^3 клеток каждой крысе (на 3 сутки эксперимента, однократно);

В пятой группе ($n = 17$) каждой крысе выполняли локальную трансплантацию ММСК путём инъекции суспензии клеток по краю раневого дефекта и в центральную

часть раны по 250×10^3 клеток два раза с интервалом 7 суток (на 3 и 10 сутки).

В течение первых 7 суток эксперимента всем крысам в наблюдаемых группах ежедневно вводили внутримышечно по 5 мг препарата Цефтриаксон (из расчета 25 мг/кг).

Методика проведения локального фоторегуляторного воздействия

Для проведения локальной фототерапии раневых дефектов был использован лабораторный макет Комплекса фототерапевтического «Календула». С поверхности экспериментальной раны предварительно фиксированной крысы удаляли раневое покрытие и проводили локальное фоторегуляторное воздействие с применением поляризованного светодиодного излучения (ПСИ) с длиной волны $\lambda = (0,630 \pm 0,03)$ мкм. Плотность энергии облучения при этом составляла 10 ± 5 Дж/см². Затем раневой дефект снова укрывался прозрачным раневым покрытием, и лабораторное животное помещалось в индивидуальную клетку.

Выделение и культивирование ММСК

Для получения ММСК у лабораторных животных-доноров под внутривенным тиопенталовым наркозом (40 мг/кг массы животного) проводили эксплантацию жировой ткани. Затем получали гомогенат ткани, который в дальнейшем подвергали ферментативной обработке в растворах коллагеназы и/или диспазы при постоянном перемешивании в течение 30–60 мин при 37 °С. Полученную клеточную суспензию фильтровали через капроновый фильтр (70 мкм), центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин, удаляли супернатант, осадок заливали полной питательной средой (α -MEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамина, 0,01 мл базового раствора комплексного антибиотика-антимикотика). Клетки высевали в количестве 8×10^4 кл/мл на адгезионные пластиковые чашки Петри (Sarstedt, Германия). Культивирование клеток проводили в CO₂-инкубаторе при 37 °С во влажной атмосфере при постоянном давлении 5% CO₂. Полную смену ростовой среды проводили каждые 72 ч. По достижении культурами 75%-ной конfluenceности монослоя клетки снимали с поверхности пластика культурального флакона с помощью 0,25%-ного раствора трипсин/ЭДТА. Для получения 1-го пассажа клетки засеивали в культуральные флаконы в концентрации 1×10^4 клеток на 1 см² поверхности культурального пластика. Аналогично получали 2-й и 3-й пассажи.

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. Для оценки жизнеспособности ММСК использовали 0,2–0,5% раствор трипанового синего, прокрашивающего нежизнеспособные клетки, а также флуоресцентные зонды пропидиумиодид и флуоресцеиндиацетат, флуоресценцию которых в клетках оценивали на проточном цитофлуориметре «FACScanto II» (Becton Dickinson, США). Индекс пролиферации определяли по приросту клеток в 3-х отдельных культуральных флаконах каждого пассажного уровня.

Анализ клеточного фенотипа проводили с использованием CD-маркеров на проточном цитофлуориметре. К каждому образцу, содержащему 1×10^6 клеток, добавляли в 100 мкл фосфотно-солевого буфера (ФСБ) и 5 мкл раствора моноклонального антитела (CD 105, CD90, CD44, CD34, CD45) в количестве 10 мкг в ФСБ. Пробы инкуби-

ровали в темноте при комнатной температуре 30 мин. После завершения инкубации ММСК 2 раза отмывали в ФСБ и регистрировали профиль распределения клеток по интенсивности флуоресценции при $\lambda_{\text{возб.}} = 488$ и 633 нм с дискриминационными фильтрами для регистрации при 685/42 нм и 620/20 нм, определяя процент позитивных по данному антителу клеток.

Методика проведения локальной клеточной трансплантации

В стерильных условиях выполняли локальную пересадку суспензии культуры ММСК методом внутрикожной и подкожной инъекции с применением инсулинового одноразового шприца на расстоянии не более 1 см от раневого дефекта по периметру раны в четырёх точках (3, 6, 9, 12 часов). Затем проводили дополнительное введение клеточного биоматериала в центральную область раневого дефекта на глубину не более 1 мм. Количество трансплантируемого материала равномерно распределяли при введении в места инъекций в зависимости от начального объёма клеточного пула (необходимое количество трансплантируемых клеток).

Гистологическое исследование

Поэтапное выведение лабораторных животных контрольной и основных групп из эксперимента (с последующим гистоморфологическим изучением препаратов) проводили на 4, 7, 10, 14, 21, 28 и 35 сутки. Эвтаназию крыс выполняли путём однократного внутривенного введения летальной дозы 3% раствора тиопентала натрия с последующим иссечением раневого дефекта в пределах здоровых тканей. Полученный биоматериал фиксировали в 10% нейтральном формалине в течение 48 часов. Затем обезжизивали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 4–5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином, а также МСБ. Изучение микропрепаратов (проводилось исследование в 5 полях зрения) и изготовление микрофотографий выполняли с помощью микроскопа Axio Imager (ZEISS).

Планиметрические методы исследования

День моделирования экспериментальной раны считали нулевыми сутками эксперимента, площадь раны считали равной 100%. При проведении экспериментальных исследований каждый осмотр ран в контрольные сроки наблюдения за животными включал их измерение с последующим вычислением площади. Для определения площади раневого дефекта применяли методику компьютерной планиметрии — проводилась фотосъемка 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 ($v_{\text{з.ж.}}$, %/сутки):

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

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

3. Показатель скорости эпителизации раны ($v_{\text{эпит.}}$, см²/сутки):

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

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

Методы статистической обработки

Статистическая обработка результатов исследований проведена с использованием непараметрических методов, данные представлены в виде «медиана и квартили» — Me(Q25;Q75). Для сравнения независимых выборок применяли метод Краскела-Уоллиса (Kruskal–Wallis test) и U-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test), связанных — метод Фридмана (Friedman test) и критерий Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test) с поправкой Бонферрони. Для оценки взаимосвязи количественных признаков применяли метод корреляционного анализа Спирмена (Spearman Rank Order Correlations). Различия считали статистически значимыми при вероятности безошибочного прогноза не менее 95% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждения

Наработка клеточной биомассы ММСК. В ходе отработки метода выделения ММСКЖТ из жировой ткани и накопления клеточной биомассы было установлено, что использование смеси 0,1% коллагеназы и 0,1% диспазы в соотношении 1:1 ускоряло время и увеличивало эффективность прикрепления клеток к культуральному пластику, по сравнению с ферментативным расщеплением жира в присутствии 0,1% коллагеназы или 0,1% трипсина. При этом методом проточной цитофлуориметрии с использованием прибора Becton Dickinson («FACScanto II», США) и флуоресцентных зондов пропидиум иодида и флуоресцеиндиацетата было определено, что после обработки жировой ткани ферментативной смесью (коллагеназа+диспаза) выход жизнеспособных клеток увеличивался и в культуре в процессе последующего ее развития, а доля ММСК с признаками апоптотической гибели уменьшалась.

При культивировании клеток, выделенных из ЖТ, со временем происходила элиминация эндотелиальных клеток, лейкоцитов, гематопозитических клеток и их предшественников. К 5-м суткам роста культуры ММСК полностью формировали монослой. Во всех образцах полученных культур стромальных клеток ЖТ уже ко 2-му пассажу прогениторные МСК составляли 96%.

Определение поверхностных антигенов методом прямого флуоресцентного окрашивания показало, что ММСК ЖТ характеризовались наличием основных маркеров мезенхимальных стволовых клеток — CD90⁺, CD44⁺ и CD105⁺. При фенотипировании клеток установлено, что до 95% из них были положительны по CD90⁺, более 88% по CD44⁺, более 90% по CD105⁺, менее 2% имели фенотип CD45⁺ и только у 2% ММСК определялись антигены к CD34⁺. Микробиологический анализ, проводимый на всех пассажах, не обнаружил какие либо признаки микробной контаминации в культуре ММСК, полученной из жировой ткани крыс-доноров. Для экспериментов отбирали ММСК 2-го и 3-го пассажей.

Сравнительная характеристика течения раневых дефектов в экспериментальных группах. Анализ значений исходных площадей раневых дефектов (S , см²) позволил сделать заключение об отсутствии достоверных различий между группами (Kruskal-Wallis test: $H = 0,18$, $p = 0,99$). 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 была обусловлена достаточно выраженной мобильностью кожи на спине у крысы и развитием гистоморфологических изменений в фазу асептического воспаления, что и приводило к деформации ран и изменению их начального размера. Парное сравнение размеров (площадей) раневых дефектов на 3 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 , $v_{\text{з.ж.}}$, $v_{\text{эпит.}}$) и проведения статистической обработки.

Сравнительный анализ результатов наблюдения за животными контрольной и опытных групп и данных планиметрии на протяжении 28 суток позволил установить существенные межгрупповые различия динамики заживления раневых дефектов по показателю ΔS на контрольных этапах эксперимента (таблица 1).

Таблица 1. Динамика показателей ΔS в экспериментальных группах

Группа	Показатель изменения площади раневой поверхности в динамике ΔS , % — Me(Q25;Q75)				
	Сутки эксперимента				
	7	10	14	21	28
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)	28,2 (26,5;30,8)	45,1 (44,1;48,2) * $p = 0,03$	62,7 (57,4;64,8)	77,5 (74,6;78,1) * $p = 0,00$	87,3 (85,7;88,6) * $p = 0,03$
Третья (n = 11)	36,5 (36,2;39,7) */** $p = 0,00$	53,5 (50,0;56,6) * $p = 0,00$ ** $p = 0,01$	69,6 (68,3;72,5) */** $p = 0,00$	95,4 (91,0;96,7) */** $p = 0,00$	100 % */** $p = 0,00$

Группа	Показатель изменения площади раневой поверхности в динамике ΔS, % – Me(Q25;Q75)				
	Сутки эксперимента				
	7	10	14	21	28
Четвёртая (n = 11)	53,8 (52,8;57,2) */**p = 0,00 ***p = 0,00	69,4 (67,1;71,2) */**p = 0,00 ***p = 0,00	77,5 (76,4;79,9) */**p = 0,00 ***p = 0,00	96,7 (94,3;98,4) */**p = 0,00	100 % */**p = 0,00
Пятая (n = 11)	38,2 (36,9;39,3) */**p = 0,00 ****p = 0,00	53,7 (52,9;56,8) */**p = 0,00 ****p = 0,00	95,7 (93,6;98,6) */**p = 0,00 ****p = 0,00	100 % */**p = 0,00 ***p = 0,00 ****p = 0,01	—
Kruskel–Wallis test	H = 46,39 p = 0,000	H = 46,65 p = 0,000	H = 49,83 p = 0,000	H = 47,76 p = 0,000	H = 51,51 p = 0,000

П р и м е ч а н и е — Mann-Whitney U-test с поправкой Бонферрони: * — значимость различий с группой 1; ** — значимость различий с группой 2; *** — значимость различий с группой 3; **** — значимость различий с группой 4.

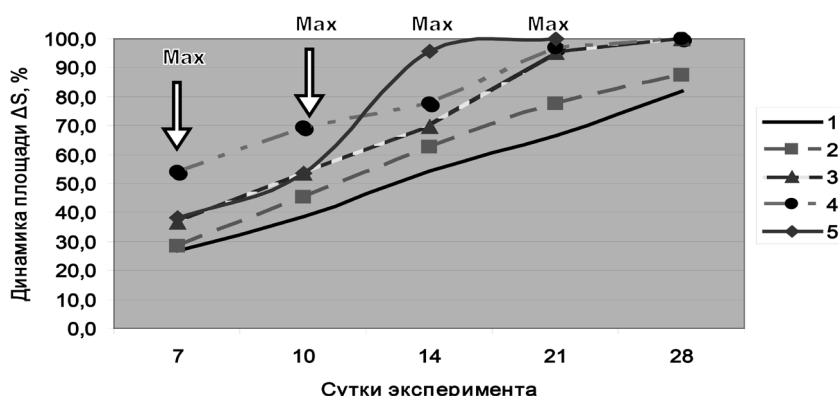


Рис. 1. Межгрупповые различия динамики площади ΔS

Анализ полученных данных показал, что значения ΔS первой группы (контроль) были достоверно меньше ($p < 0,05$) соответствующих показателей любой из опытных групп на всех этапах проведения эксперимента (исключение — отсутствие значимых различий с результатом второй группы на 7 и 14 сутки — $p = 0,21$ и $p = 0,06$ соответственно).

При парном сравнении показателей ΔS не было выявлено значимых различий между третьей и пятой группами (трансплантация ММСК ЖТ на 3 сутки эксперимента в количестве 250 тыс. клеток каждой крысе) на 7 сутки ($U = 52,5$ и $p = 0,6$) и 10 сутки ($U = 47,0$ и $p = 0,4$), а также между третьей (трансплантация ММСК ЖТ на 3 сутки в количестве 250 тыс. клеток каждой крысе) и четвертой

(трансплантация ММСК ЖТ на 3 сутки эксперимента в количестве 500 тыс. клеток каждой крысе) группами на 21 сутки ($U = 37,5$ и $p = 0,1$) и 28 сутки ($U = 60,5$ и $p = 1,0$) эксперимента.

Максимальные показатели ΔS на 7 и 10 сутки были зарегистрированы в четвертой группе, на 14 и 21 сутки — в пятой группе, в которой полная эпителизация ран отмечена к 17–18 суткам. В опытных группах 3 и 4 (после применения клеток) раны зажили в интервале 22–24 сутки эксперимента (рисунок 1).

Сравнительный анализ скоростей заживления раневых дефектов в динамике позволил выявить значимые внутригрупповые различия показателей $v_{зж}$. (таблица 2).

Таблица 2. Динамика показателей $v_{зж}$ в экспериментальных группах

Группа	Относительная скорость заживления раневого дефекта $v_{зж}$, %/сутки – Me(Q25;Q75)					Friedman test
	Сутки эксперимента					
	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 ****p = 0,03	ANOVA Chi Sqr. = 33,8 p = 0,000
Вторая (n = 11)	4,0 (3,7;4,4)	4,5 (4,4;4,9)	4,5 (4,0;4,7)	3,7 (3,5;3,7) **/**p = 0,03	3,1 (3,1;3,2) **/**p = 0,03 ****p = 0,03	ANOVA Chi Sqr. = 34,5 p = 0,000

Группа	Относительная скорость заживления раневого дефекта $v_{\text{зж.}}$, %/сутки – Me(Q25;Q75)					Friedman test
	Сутки эксперимента					
	7	10	14	21	28	
Третья (n = 11)	5,2 (5,2;5,7)	5,3 (5,0;5,7)	5,0 (4,9;5,2)	4,5 (4,3;4,6) */***p = 0,05 **p = 0,03	Рана зажила на 23–24 сутки	ANOVA Chi Sqr. = 20,6 p = 0,000
Четвёртая (n = 11)	7,7 (7,5;8,2)	6,9 (6,7;7,1) *p = 0,03	5,5 (5,5;5,7) */**p = 0,03	4,6 (4,5;4,7) */**p = 0,03 ***p = 0,03	Рана зажила на 22–23 сутки	ANOVA Chi Sqr. = 33,0 p = 0,000
Пятая (n = 11)	5,5 (5,3;5,6)	5,4 (5,3;5,7)	6,8 (6,7;7,0) */**p = 0,03	Рана зажила на 17–18 сутки	—	ANOVA Chi Sqr. = 17,1 p = 0,000

П р и м е ч а н и е — достоверность различий по Wilcoxon matched pairs test с поправкой Бонферрони при сравнении с результатами на: * – 7, ** – 10, *** – 14 и **** – 21 сутки.

В первой, второй и третьей группах на протяжении 14 суток показатели $v_{\text{зж.}}$ находились на стабильном уровне ($p > 0,05$ внутри каждой из групп), на 21 и 28 сутки отмечено достоверное снижение скорости заживления. В четвертой группе максимальные значения $v_{\text{зж.}}$ были зарегистрированы на 7 сутки эксперимента ($p < 0,05$ с остальными контрольными точками). В пятой группе максимум $v_{\text{зж.}}$ выявлялся на 14 сутки эксперимента ($p < 0,05$ в сравнении с 7 и 10 сутками).

В результате статистической обработки данных были также отмечены различия скоростей заживления между группами в контрольные сроки эксперимента (рисунок 2).

Минимальные значения $v_{\text{зж.}}$ на контрольных временных этапах (7, 14, 21, 28 сутки) эксперимента были зарегистрированы в первой контрольной группе (при сравнении с результатами остальных групп $p < 0,05$ во всех случаях, за исключением второй группы на 7 сутки — $U = 41,5$; $p = 0,2$). Результаты третьей и пятой групп на 7 и 10 сутки эксперимента не имели статистических различий ($U = 52,5$; $p = 0,6$ и $U = 47,0$; $p = 0,4$ соответственно). При парном сравнении показателей $v_{\text{зж.}}$ максимумы на 7 и 10 сутки были зарегистрированы в четвертой группе ($p < 0,05$ во

всех случаях), на 14 сутки эксперимента — в пятой группе ($p < 0,05$ во всех случаях), а на 21 сутки — в третьей и четвертой группах, между которыми не было значимых различий ($U = 37,5$; $p = 0,1$) при $p < 0,05$ с остальными группами.

Сравнительный анализ экспериментальных данных, полученных при различных схемах клеточной трансплантации, с использованием метода Спирмена (Spearman Rank Order Correlations) выявил статистически достоверное ($p < 0,05$ во всех случаях) наличие сильной прямой корреляционной связи между количеством трансплантированных клеток и скоростью заживления раневых дефектов (первая, третья и четвертая группы) на 7 ($p = 0,945$), 10 ($p = 0,944$), 14 ($p = 0,926$) и 21 ($p = 0,792$) сутки, а также между кратностью локальной трансплантации и $v_{\text{зж.}}$ (третья, четвертая и пятая группы) сильной прямой корреляции на 14 ($p = 0,820$) и умеренной прямой — на 21 ($p = 0,673$) сутки эксперимента.

В результате проведенного анализа были выявлены существенные изменения, а также меж- и внутригрупповые различия показателей скорости эпителизации раневых дефектов $v_{\text{эпит.}}$ в процессе проведения эксперимента (таблица 3, рисунок 3).

Таблица 3. Динамика показателей $v_{\text{эпит.}}$ в экспериментальных группах

Группа	Скорость эпителизации раны $v_{\text{эпит.}}$, см ² /сутки – Me(Q25;Q75)			
	Временные интервалы эксперимента			
	3–10 сутки	7–14 сутки	14–21 сутки	21–28 сутки
Первая (контроль) (n = 11)	0,37 (0,36;0,44)	0,26 (0,25;0,30) *p = 0,003	0,11 (0,11;0,15) */**p = 0,003	0,16 (0,13;0,17) */**p = 0,003
Вторая (n = 11)	0,46 (0,43;0,48)	0,32 (0,29;0,36) *p = 0,003	0,13 (0,10;0,21) *p = 0,003 **p = 0,004	0,10 (0,07;0,15) */**p = 0,003
Третья (n = 11)	0,53 (0,49;0,57)	0,32 (0,29;0,37) *p = 0,003	0,24 (0,21;0,25) *p = 0,003 **p = 0,008	Рана зажила на 23–24 сутки
Четвёртая (n = 11)	0,69 (0,68;0,71)	0,24 (0,20;0,26) *p = 0,003	0,17 (0,17;0,19) *p = 0,003 **p = 0,005	Рана зажила на 22–23 сутки
Пятая (n = 11)	0,54 (0,51;0,57)	0,57 (0,56;0,58)	Рана зажила на 17–18 сутки	—

П р и м е ч а н и е — достоверность различий по Wilcoxon matched pairs test при сравнении с результатами: * — интервала 3–10 сутки, ** — интервала 7–14 сутки, *** — интервала 14–21 сутки.

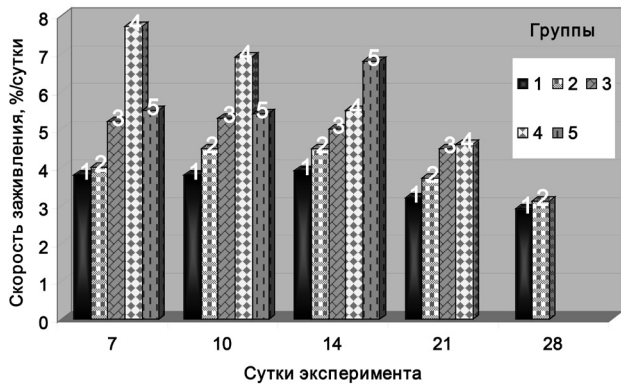
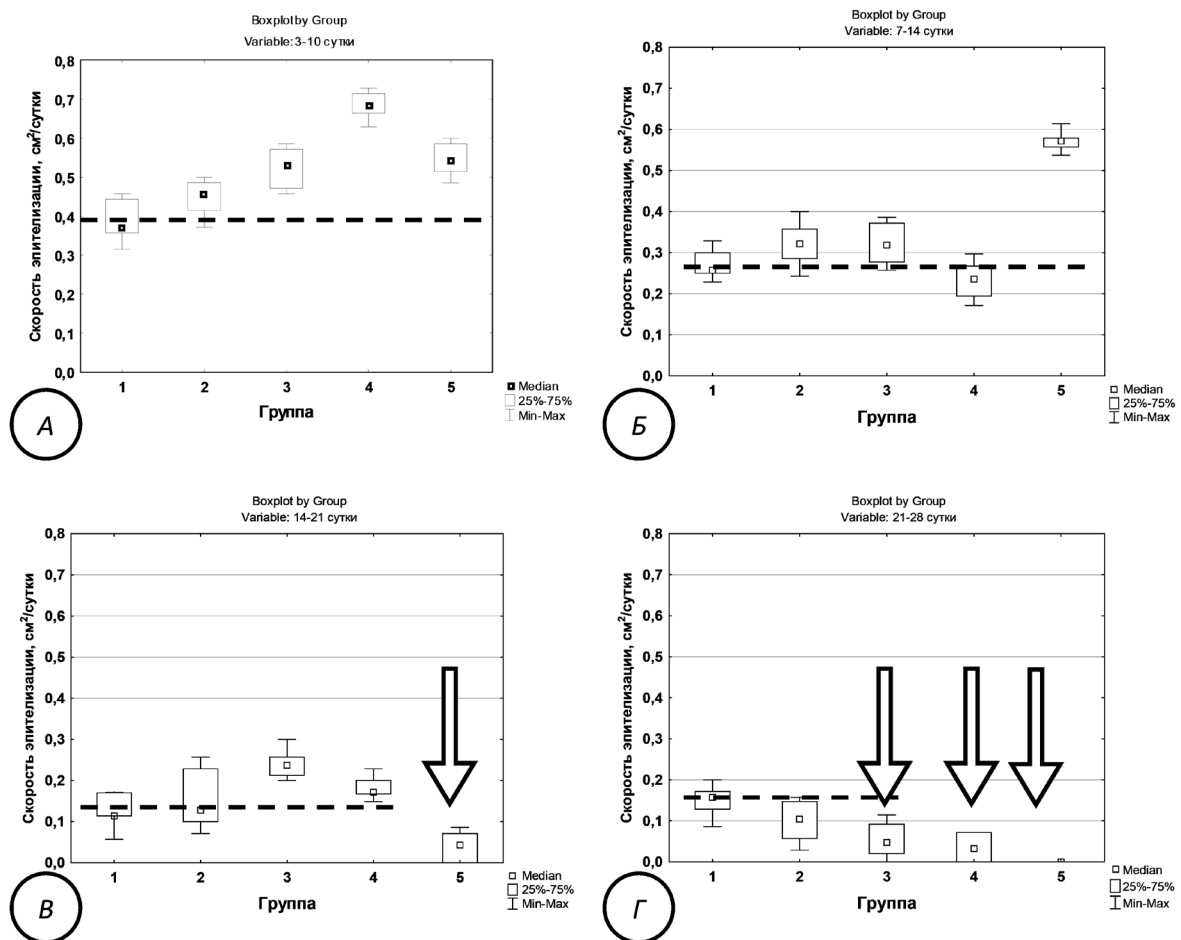


Рис. 2. Скорость заживления $v_{зак.}$ раневых дефектов в группах

Максимальные значения скорости эпителизации $v_{эпит.}$ в интервале «3–10 сутки» были отмечены в четвертой группе ($p < 0,05$ во всех случаях), в интервале «7–14 сутки» – в пятой группе ($p < 0,05$ во всех случаях), а также в третьей группе ($p < 0,05$ во всех случаях) в интервале «14–21 сутки» (рисунок 3).

При сравнительном морфологическом исследовании плоскостных послойных ран контрольной и основных групп на 21-е сутки эксперимента были выявлены существенные отличия в течение раневого процесса. В контрольной группе эпителизация раны отсутствовала. В микропрепаратах определялась патологическая послойность раны с уплотненной плазмой на поверхности, выявлялись остатки некротизированной ткани с кардиорексисом и слоем нейтрофилов. Струп отграничивал созревающую грануляционную ткань, в которой выявлялось большое количество фибробластов, гистиоцитов и коллагеновых волокон с горизонтальной ориентацией (рисунок 4А). Во второй группе (ФРВ с 3 по 7 сутки) при гистологическом исследовании в те же сроки наблюдения раневой дефект был «чистым», отмечалось нарастание многослойного плоского эпителия с краев. Поверхность раны была представлена созревающей соединительной тканью с единичными кровеносными сосудами (рисунок 4Б).

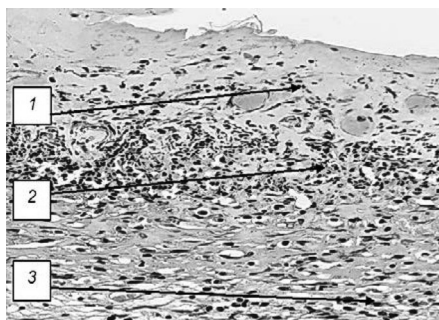
У животных третьей и четвертой групп (ММСК 250×103 и 500×103 соответственно) к 21 суткам эксперимента наблюдалась практически схожая картина морфологического процесса заживления. В отдельных микропрепаратах определялась почти завершенная эпителизация раневого



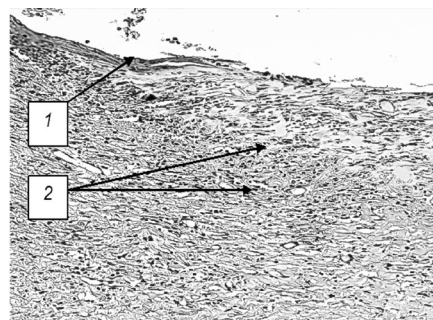
А – интервал 3–10 сутки; Б – интервал 7–14 сутки; В – интервал 14–21 сутки; Г – интервал 21–28 сутки

Рис. 3. Скорость эпителизации $v_{эпит.}$ раневых дефектов в группах

Примечание – пунктиром отмечен уровень $v_{эпит.}$ в контрольной группе, стрелками – время наступления полной эпителизации раневых дефектов в группах.



А



Б

Окраска гематоксилин-эозин, ув. × 200

А: 1 — уплотненная плазма, 2 — остатки некротизированной ткани,
3 — созревающая грануляционная ткань с горизонтальной ориентацией клеток и волокон.
Б: 1 — краевая эпителизация, 2 — созревающая грануляционная ткань.

Рис. 4. Раны животного первой (А) и второй (Б) групп на 21 сутки эксперимента

дефекта. На поверхности местами выявлялись остатки струпа. Под многослойным плоским эпителием отмечалось небольшое количество лимфоцитов, а также наличие зрелой соединительной ткани с горизонтально расположенными фибробластами и фиброцитами (рисунок 5).

У животных пятой группы (ММСК 250×10^3 дважды с интервалом 7 суток) полное заживление раневой поверхности наблюдалось к 17–18 суткам от начала эксперимента.

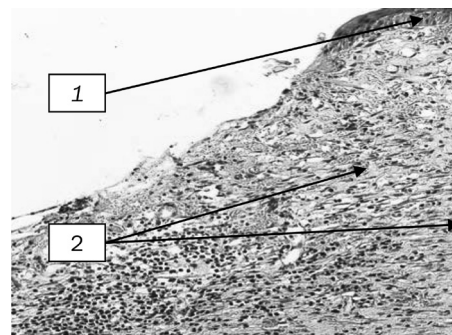
К 28 суткам эксперимента площади раневых дефектов у животных основных групп, где применение клеточных технологий было однократным, полностью зажили. В третьей и четвертой группах наблюдались сопоставимые сроки закрытия ран: 23–24 и 22–23 сутки соответственно. У животных первой (контрольной) и второй групп площади раневых дефектов уменьшились к 28 суткам на 81,7 (80,7;84,0)% и 87,3 (85,7;88,6)% по отношению к исходным данным, а полное заживление ран наступило на 35 сутки и 32 сутки эксперимента соответственно.

Таким образом, проведенные исследования и анализ полученных результатов (ΔS , %; $v_{\text{заж.}}$ %/сутки; $v_{\text{эпит.}}$ см²/сутки; гистологические исследования) позволяют сделать заключение о том, что применение локального фоторегуляторного воздействия и ММСК ЖТ приводит к ускорению смены фаз раневого процесса и способствует сокращению сроков заживления экспериментальных «чистых» ран у лабораторных животных с раневыми дефектами в опытных группах по сравнению с группой контроля.

Выводы

1. Фоторегуляторное воздействие при выбранных параметрах (длина волны $\lambda = (0,630 \pm 0,03)$ мкм, ПЭО 10 ± 5 Дж/см²) оказывает при регулярном (один раз в день) курсовом облучении в течение пяти суток положительное влияние на течение раневого процесса экспериментальных ран, вызывая стимулирующее воздействие как на созревание грануляционной ткани, так и контракцию раны, а также на скорость эпителизации, что способствует улучшению процессов регенерации раневых дефектов кожи.

2. При сопоставлении сроков полного заживления раневых дефектов достоверно более высокая скорость эпителизации на протяжении всего периода течения раневого процесса наблюдалась у экспериментальных животных с применением локальной трансплантации аллогенных



Окраска гематоксилином и эозином, ув. × 200

1 — многослойный плоский эпителий,
2 — зрелая соединительная ткань

Рис. 5. Рана животного четвертой группы на 21 сутки эксперимента

ММСК ЖТ, по сравнению с таковой в контрольной группе (спонтанная регенерация) и при использовании фоторегуляторного воздействия.

3. Анализ результатов экспериментальных исследований *in vivo* при локальном применении ММСК ЖТ продемонстрировал, что течение процессов заживления в экспериментальных раневых дефектах зависело от условий трансплантации — как от количества применяемого клеточного биоматериала, так и от кратности его введения.

4. Использование мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани для восстановления целостности кожных покровов представляют собой многообещающую стратегию в исследованиях по клиническому применению локальной клеточной трансплантации в комплексном лечении пациентов с хроническими ранами различной этиологии, в том числе с трофическими язвами, резистентными к традиционным методам лечения.

Литература

1. Абаев Ю. К. Расстройство заживления ран и методы их коррекции / Ю. К. Абаев // Вестник хирургии. — 2005. — Т. 164, № 1. — С. 111–113.
2. Бабаева А. Г. Регенерация — факты и перспективы / А. Г. Бабаева. — Москва: 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.

★ Оригинальные научные публикации

Лечебно-профилактические вопросы

4. Биологическая активность и терапевтическая эффективность излучения сверхъярких светодиодов / В. А. Мостовников [и др.]. // Лазерно-оптические технологии в биологии и медицине: материалы междунар. конф., Минск, 14-15 октября 2004 г.: в 2 т. / Ин-т физики им. Б. М. Степанова НАН Беларуси; под ред. А. Н.Рубинова [и др.]. — Минск, 2004. — Т. 1. — С. 28—35.

5. Влияние поляризованного светодиодного излучения на митотическую активность культивированных фибробластов кожи крысы / А. В. Буравский, Е. В. Баранов, С. И. Третьяк, З. Б. Квачева, А. М. Владимирская // Медицинская панорама. — 2014. — № 4 (148). — С. 24—28.

6. Длительно незаживающие раны и язвы (патогенез, клиника, лечение): монография / П. И. Толстых [и др.]. — М.: Дипак, 2009. — 168 с.

7. 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.

8. Липницкий Е. М. Лечение трофических язв нижних конечностей / Москва. — 2001. — 664 с.

9. Руководство по частной патологии человека: в двух частях / Под ред. Н. К.Хитрова, Д. С. Саркисова, М. А. Пальцева. — М.: Медицина, 2005. — Ч. 1 — 480 с.

10. Waldman H. Tolerance:an overview and perspectives / Nature reviews, nephrology. — 2010. — № 6. — P. 569—576.

Поступила 15.03.2017 г.