

ISSN 1810-5033

НОВОСТИ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

NEWS OF BIOMEDICAL SCIENCES

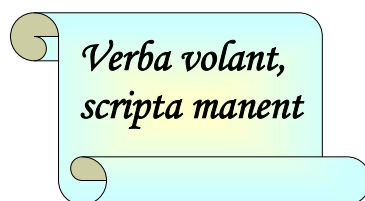
Научно-практический и научно-теоретический журнал

*НБ
МЖ*

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

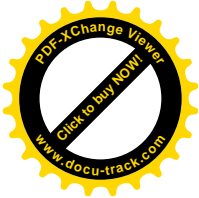
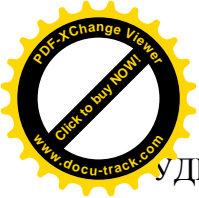
ВНМ

*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:**

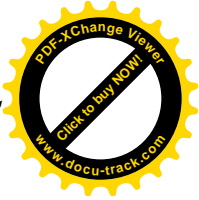
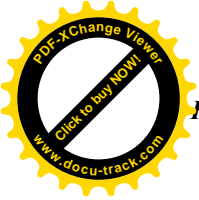
Институт физиологии НАН Беларуси
к. 203, ул. Академическая 28,
220072, Минск, Республика Беларусь
Тел./Факс: +375-17-284-16-30;
Электронная почта: biblio@fizio.bas.-net.by

**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



ПАТОФИЗИОЛОГИЯ

УДК 616-001.4-089.843-092.9

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

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА ПРИ
ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗНЫХ СПОСОБОВ ЛОКАЛЬНОЙ
ТРАНСПЛАНТАЦИИ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ У ЛАБОРАТОРНЫХ
ЖИВОТНЫХ

¹ – Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь;

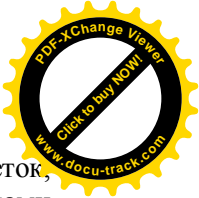
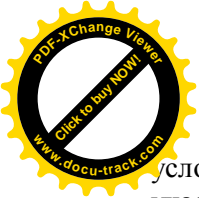
² – Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Исследование выполнено на 68 крысах линии Wistar с массой тела 180–200 г. с чистыми ранами диаметром 2,5 см (4 группы по 17 животных в каждой). Культуру дермальных фибробластов выделяли из кожи новорожденных крыс; для накопления необходимой биомассы фибробластов кожи крысы (ФКК) проводили субпассирование. В первой группе (контроль) клеточные биопрепараты не вводились. Во второй и третьей группах для лечения экспериментальных ран использовали инъекционный метод доставки клеточного материала (ФКК $5,0 \times 10^5$ и $2,5 \times 10^5$ клеток дважды с интервалом семь суток). В четвертой группе применяли аппликационный способ доставки биоматериала на биodeградируемой матрице (гель фосфат декстрана (ФД)) с содержанием культивированных ФКК в количестве $5,0 \times 10^5$ на один раневой дефект. На всех этапах (7-е, 14-е, 21-е, 28-е сутки) эксперимента минимальные значения скорости эпителизации были зарегистрированы в первой группе. Четвёртая группа характеризовалась максимальными показателями заживления ран; на 26-28-е сутки эксперимента определялась полная эпителизация раневого дефекта. В условиях эксперимента установлено, что локальное применение культивированных дермальных фибробластов приводит к достоверному сокращению сроков эпителизации раневых дефектов. Течение процессов заживления экспериментальных ран зависит как от способа доставки ФКК (инъекционно в суспензии или аппликационно в составе биоматрицы), так и от кратности введения клеточного биоматериала (однократно либо дважды с интервалом семь суток).

Ключевые слова: фибробласты кожи крысы, фосфат декстрана, биodeградируемая матрица, локальная трансплантация, лечение ран.

Введение. Регенерация кожи была и остается предметом многих экспериментальных исследований, актуальность которых обусловлена большим числом пациентов с острыми и хроническими механическими, термическими, химическими, лучевыми, аутоиммунными повреждениями кожного покрова [2, 5]. Особую озабоченность вызывает реабилитация пациентов с хроническими длительно незаживающими ранами различной этиологии, резистентными к традиционным способам терапии [4, 6].

В последнее время научно-технический прогресс способствует реализации и внедрению в клиническую практику новых перспективных методов лечения раневых дефектов, основанных на использовании биотехнологий с применением биомедицинских клеточных продуктов [1–3, 5, 6]. Среди множества типов клеток, обладающих большим регенераторным потенциалом, особый интерес вызывают дермальные фибробласты, которые играют важную роль в процессах регуляции клеточных взаимодействий и поддержании гомеостаза кожи. Они являются основными клетками, которые ответственны за структурную целостность кожи, участвуют в создании, организации и обновлении внеклеточного матрикса в процессе его функционирования, а также в восстановлении ткани после повреждения. Дермальные фибробласты продуцируют и выделяют большое число белков внеклеточного матрикса (коллагены I – V типов, фибронектин, гликозаминогликаны, ламинин, проэластин, тенасцин, нидоген, хондроитин-4-сульфат и др.), различные факторы роста (фактор роста фибробластов (FGF), фактор роста соединительной ткани, трансформирующий фактор роста (TGF-бета), эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста кератиноцитов (KGF), факторы роста эндотелия сосудов (VEGF-A, B, C, D) и др.), ферменты (матриксные металлопротеиназы (ММП-1, 2, 3, 9) и др.), а также ряд цитокинов [5, 6, 9, 10]. Способность фибробластов формировать выгодные



условия для миграции, функционирования, пролиферации и взаимодействия разных типов клеток, участвующих в процессе восстановления повреждений кожи, между собой и клетками микроокружения позволяет считать их перспективными для широкого применения в регенеративной медицине [1, 6, 7, 8].

Целью исследования является выявление особенностей течения репаративных процессов в экспериментальных раневых дефектах при локальной трансплантации культивируемых фибробластов кожи крыс (ФКК) и проведение сравнительного анализа динамики объективных показателей заживления ран в сравниваемых группах лабораторных животных при разных способах трансплантации клеточного биоматериала.

Материалы и методы. Моделирование экспериментальной раны выполняли по разработанной методике. После внутривентриального введения 0,5–0,7 мл 1%-ного раствора тиопентала натрия, экспозиции 15–20 мин, крысу фиксировали на спине, выбривали участок кожи размерами 10–15 см² и затем перманентным маркером намечали контур будущей раны. Поверхность кожи дважды обрабатывали антисептиком, наносили рану округлой формы 2,5 см в диаметре, иссекая кожу, подкожную клетчатку и фасцию до мышц. 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.

Всего было сформировано 4 экспериментальные группы (по 17 животных в группе). В каждой группе 11 крыс были предназначены для макроскопической оценки динамики заживления раневых дефектов с применением планиметрического метода исследования, остальных животных выводили из эксперимента поэтапно в контрольных точках исследования для выполнения гистоморфологического изучения биоптатов раны и околораневых тканей.

В первой группе (контроль, n=17) заживление кожного дефекта проходило посредством самостоятельной, спонтанной, не стимулированной регенерации (клеточные биопрепараты не применялись). Во второй группе (n=17) выполняли локальную трансплантацию ФКК путём инъекции суспензии клеток по краю раневого дефекта и в центральную часть раны в количестве 500×10³ клеток каждой крысе (на третьи сутки эксперимента, однократно). В третьей группе (n=17) каждой крысе выполняли локальную трансплантацию ФКК путём инъекции суспензии клеток по краю раневого дефекта и в центральную часть раны по 2,5×10⁵ клеток два раза с интервалом 7 суток (на третьи и десятые сутки). В четвертой группе (n=17) раневой дефект каждого животного заполняли 1 мл геля фосфата декстрана (ФД), содержащего 5,0×10⁵ клеток ФКК (на третьи сутки эксперимента, однократно).

Всем животным в течение первых семи суток эксперимента ежедневно вводили внутримышечно по 5 мг препарата «Цефтриаксон» (из расчета 25 мг/кг).

При наблюдении за состоянием раневых дефектов оценивали наличие признаков воспаления, характер и количество раневого отделяемого и т.д. и проводили фотосъемку ран с линейкой с последующей компьютерной планиметрией с использованием программы Universal Desktop Ruler v3.3.3269 (3-и, 7-е, 14-е, 10-е, 21-е, 28-е, 35-е сутки). Для выявления характера течения репаративных процессов в исследуемых группах животных вычисляли показатели 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 ($v_{\text{зак.}}$, %/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.

Животных контрольной и основных групп поэтапно выводили из эксперимента (однократное внутрибрюшное введение летальной дозы 3% раствора натрия тиопентала) на 7-е, 10-е, 14-е, 21-е, 28-е и 35-е сутки. В эти же сроки выполняли забор биоптата: иссекали полностью всю рану (дно раны на всю толщину и прилежащие участки кожи). После фиксации образцов ткани в 10% растворе нейтрального формалина в течение 48 часов готовили серийные парафиновые срезы толщиной 5-6 мкм с последующим окрашиванием гематоксилином и эозином. Морфологический анализ проводили в 5 полях зрения с помощью светового микроскопа «Axio Imager» (ZEISS, Германия).

Все исследования на лабораторных крысах проводили с соблюдением правил биоэтики и международных принципов и требований «Европейской конвенции по защите позвоночных животных» (Страсбург, 1986г.) и Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным.

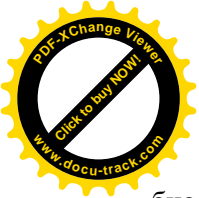
Для получения фрагментов кожи в эксперименте использовали новорожденных крыс без волосяного покрова с массой тела 20 г. В стерильных условиях эксцизионным способом выполняли забор кожи в области спины (виварий НИЧ УО «БГМУ») размером 2,0×1,5 см. Первичную культуру дермальных фибробластов кожи крысы готовили методом эксплантов. Культивирование клеток проводили в питательной среде DMEM (Sigma) с 10% содержанием сыворотки плодов коров (HyClon) в CO₂-инкубаторе при +37°C, 5% CO₂. Смену среды осуществляли каждые 3-4 дня. После миграции клеток из эксплантов и образования первичного монослоя культуры выполняли субпассирование в течение 3-6 пассажей для накопления необходимой биомассы клеток (25-30 млн). В экспериментах использовали культуру 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.

Предварительно приготовленные во флаконах навески геля ФД (по 90 мг) (препарат разработан в НИИ физико-химических проблем БГУ, Минск), стерилизовали гамма-облучением. Перед трансплантацией в каждый флакон с матричным носителем добавляли по 10 мл питательной среды, содержащей взвесь клеток, встряхивали в течение 5 мин, затем оставляли в термостате при 37°C на 30 мин.

Способы локальной трансплантации ФКК. На третьи сутки эксперимента раневую поверхность обрабатывали 3%-ным раствором H₂O₂, промывали стерильным физиологическим раствором, затем основной группе животных осуществляли трансплантацию ФКК. Локальную пересадку клеточного биоматериала во второй и третьей группах выполняли инъекционным методом по периметру и в центральную область раневого дефекта (однократно, на третьи сутки) и двукратно (на третьи и десятые сутки, соответственно). Количество трансплантируемого материала равномерно распределяли при введении в места инъекций. В четвертой группе подготовленные матрицы геля фосфата декстрана с включенным клеточным биоматериалом в составе комплексного трансплантата переносили на дефект кожи. После проведения трансплантации раневые поверхности в основных группах экспериментальных животных укрывали стерильным прозрачным покрытием на основе полиуретана. В четвертой группе общее количество введенных ФКК составило 5,0×10⁵ клеток в 1 мл на одну крысу.

В случае соответствия количественных признаков закону нормального распределения использовали параметрические методы статистики. При распределении признаков, отличном от нормального, данные представлены в виде Me [Q₂₅;Q₇₅], и статистическую обработку результатов выполняли с использованием непараметрических методов. 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 их обсуждение. *Характеристика культур фибробластов кожи новорожденных крыс.* Монослойные культуры были представлены веретеновидными фибробластоподобными клетками. При посевной дозе (1,5-2,0)×10⁵ клеток/см² монослой дермальных фибробластов формировался в течение 5-7 суток. Индекс пролиферации в 1-6 субпассажах был на одном уровне и составлял 3,8-4,0. Митотическая активность клеток в логарифмической фазе роста варьировала в пределах от 30 до 34%. Жизнеспособность клеток, находящихся в суспензии была не менее 98%. Результаты проведенного иммунофенотипирования показали, что культивируемые ФКК характеризовались высоким уровнем экспрессии виментина и молекул адгезии (CD90, CD44, CD73). При этом полученные культуры не экспрессировали маркеры прогениторных, гемопоэтических и эндотелиальных клеток.



Оценка биосовместимости клеток, иммобилизованных в гель фосфата декстрана. Оценку биосовместимости геля ФД с клетками проводили по следующим критериям: способность клеток к адгезии, пролиферации и формированию монослоя в сравнении с теми же параметрами в контрольных культурах клеток, растущих в обычных для них условиях. При внесении геля ФД в питательную среду DMEM (Sigma) с 10% содержанием сыворотки плодов коров (HyClone) значение pH оставалось в пределах допустимых значений для роста клеток в культуре (6,8–7,1) в течение 7 суток наблюдения. При выращивании ФКК с кусочками геля в течение 7 суток их пролиферативная активность, морфология, сроки формирования монослоя и накопление биомассы в процессе культивирования не отличались от контрольных культур, культивируемых без ФД. Прирост количества клеток как в опытных, так и в контрольной группах был одинаков и достоверно не отличался. Индекс пролиферации клеток в культурах составлял $2,8 \pm 0,3$. Этот показатель достоверно не отличался от контрольного уровня: индекс пролиферации клеток на пластике был в пределах $3,1 \pm 0,2$. При этом во всех случаях использовали одну и ту же посевную дозу клеток ($p > 0,05$). При наблюдении за иммобилизованными в гель ФД фибробластами в течение 3–6 дней какого-либо отрицательного действия препарата не было выявлено.

Таким образом, оценка биосовместимости выбранного матричного носителя показала отсутствие цитотоксического влияния на культивируемые фибробласты кожи, что стало основанием для дальнейшего его использования для иммобилизации культур клеток и проведения клеточной трансплантации в лечении экспериментальных ран.

Сравнительная характеристика динамики заживления раневых дефектов в экспериментальных группах. В течение первых 3–4 суток наблюдения во всех группах экспериментальных животных отмечалось увеличение площадей раневых дефектов до 7,0 [6,9; 7,1] см² (диапазон значений – от 6,5 до 7,5 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. Анализ значений исходных площадей раневых дефектов (S, см²) на третьи сутки позволил сделать заключение об отсутствии достоверных различий между группами (тест Краскела–Уоллиса: $N=1,32$, $p=0,72$). 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 оценки полученных данных с помощью планиметрического метода, вычисления основных показателей динамики заживления (ΔS , $v_{\text{зак}}$, $v_{\text{эпит}}$) и проведения статистической обработки.

При сравнительном морфологическом исследовании процесса заживления ран было выявлено, что в первой, второй и третьей группах к 28 суткам эпителизация раны отсутствовала. В микропрепаратах контрольной группы определялся небольшой раневой дефект с участками плоского эпителия. Сама поверхность дефекта была представлена созревающей и зрелой соединительной тканью с небольшими очагами лимфоцитов (рисунок 1А). У животных второй и третьей групп (ФКК $5,0 \times 10^5$ и $2,5 \times 10^5$ дважды с интервалом 7 суток, соответственно) к 28-м суткам эксперимента наблюдалась схожая картина морфологического процесса заживления. В отдельных участках микропрепаратов определялась почти завершенная эпителизация раневого дефекта. В других участках рана была представлена зрелой соединительной тканью с грубыми коллагеновыми волокнами и горизонтально расположенными фибробластами и фиброцитами. Дефект был чистым, отмечалось нарастание многослойного плоского эпителия с краев (рисунок 1Б).

К 28-м суткам эксперимента площадь раневого дефекта у животных контрольной группы уменьшилась на 81,7 [80,7; 84,0] % по отношению к исходным данным, а полное заживление ран наступило на 35–36-е сутки. Во второй и третьей группах площадь раневого дефекта уменьшились к 28-м суткам на 84,3 [83,5; 86,5] % и 95,7 [94,8; 97,9] %, а раны зажили на 31–32-е и 29–30-е сутки, соответственно.

У животных четвертой группы полное заживление раневой поверхности наблюдалось к 26–28-м суткам от начала эксперимента.

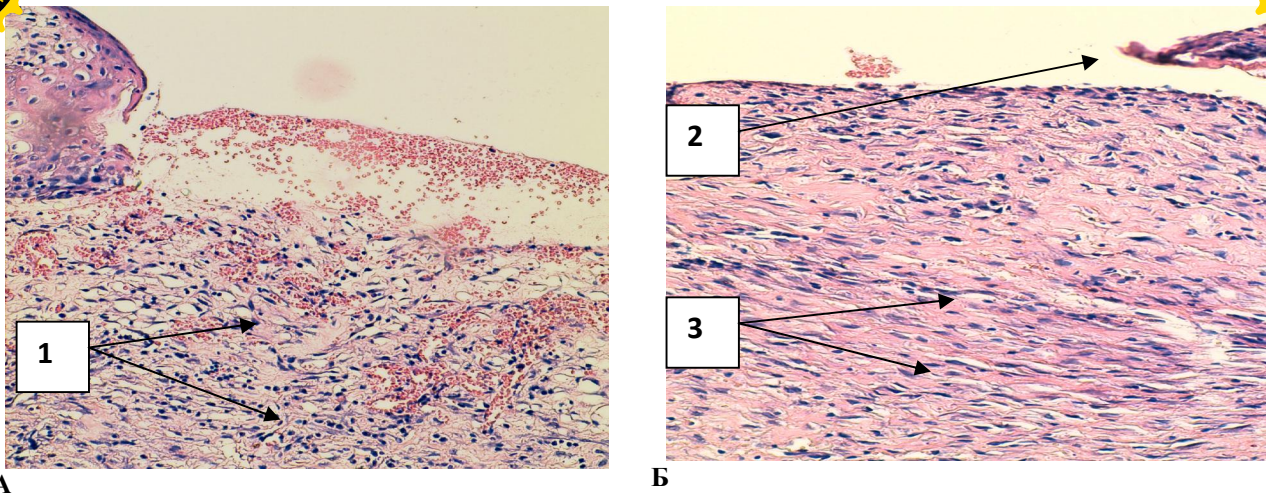
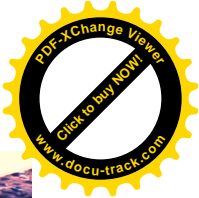
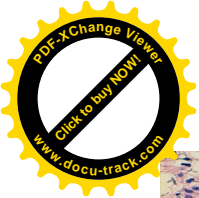


Рис. 1. Рана животного первой (А) и третьей (Б) групп на 28 сутки эксперимента. Окраска гематоксилином-эозином. Ув $\times 100$. 1 – созревающая соединительная ткань, 2 – краевая эпителизация, 3 – зрелая соединительная ткань. Рисунок 1. – Рана животного первой (А) и третьей (Б) групп на 28-е сутки эксперимента

При динамическом морфологическом исследовании процесса заживления раны было выявлено, что к 7-м суткам эксперимента в микропрепаратах она была покрыта слоем гранул полимера (гель ФД), под которым в центре отмечалось скопление серозной жидкости, свежие эритроциты. На остальном протяжении между тонким слоем плазматической жидкости происходило созревание грануляционной ткани, представленной фибробластами, ориентированными горизонтально, с вакуолизацией цитоплазмы. Встречались группы фиброцитов. Кое-где на границе с полимером определялись скопления нейтрофильных лейкоцитов, рассасывающих гранулы. Под слоем созревающей соединительной ткани была отмечена пролиферация мышечных волокон (рис. 2 А).

На 14-е сутки эксперимента в микропрепаратах поверхность раны была представлена белково-геморрагическими массами местами с гранулами, под которыми определялся слой, состоящий из плазмы, крови и нейтрофилов; глубже располагался неравномерно толстый слой грануляционной ткани с инородными телами (гранулами полимера) (рис. 2Б).

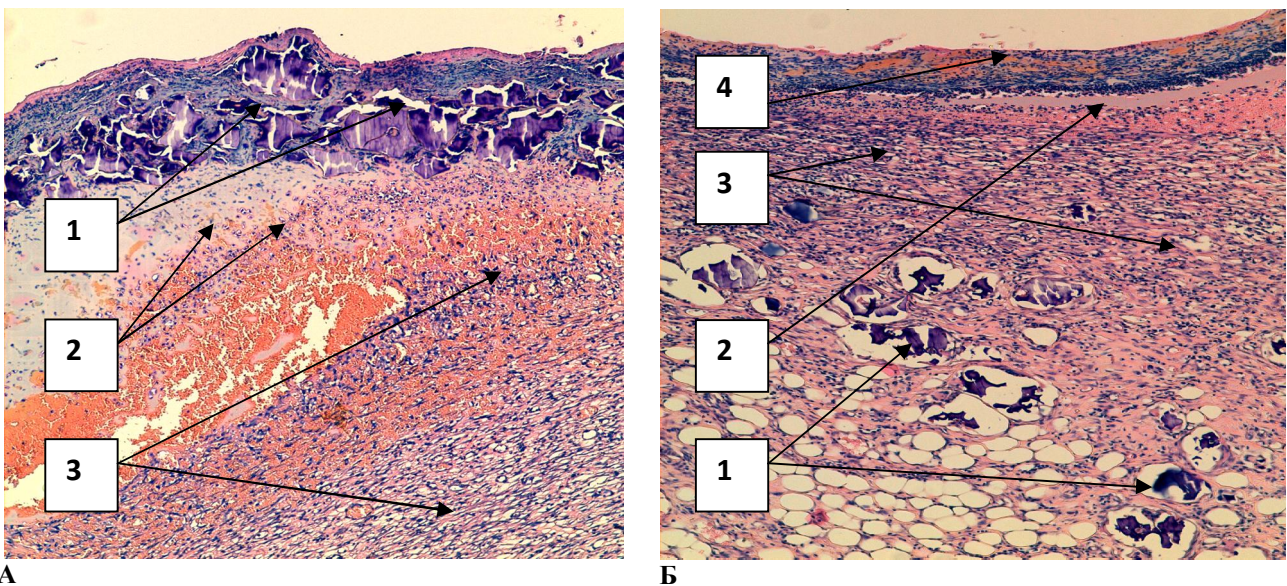
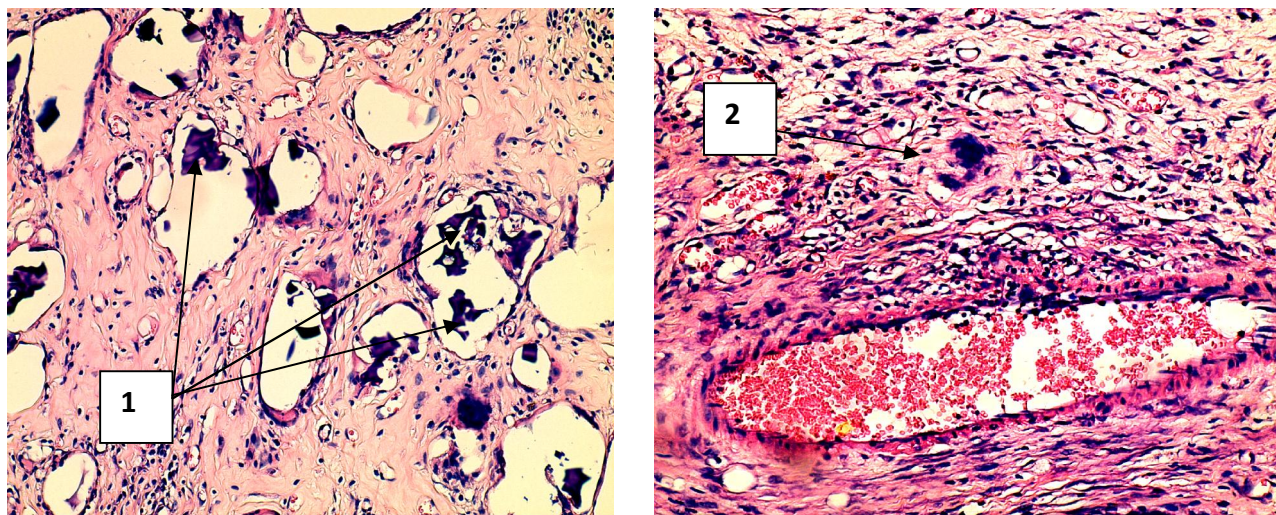


Рис. 2. Рана животного четвертой группы на 7 (А) и 14(Б) сутки эксперимента. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. $\times 100$. 1 – гранулы полимера; 2 – серозная жидкость и эритроциты; 3 – созревающая грануляционная ткань, 4 – плазменные белки

Через две недели эксперимента некоторые гранулы находились глубоко в дерме и жировой клетчатке, вокруг них определялись многоядерные гигантские клетки (рис. 3).



А

Б

Рис. 3. Рана животного четвёртой группы на 14 сутки эксперимента. Окраска гематоксилином-эозином. Ув $\times 200$. 1 – гранулы полимера, 2 – гигантские клетки рассасывания инородных тел

На 21-е сутки эксперимента в отдельных микропрепаратах определялась полная эпителизация раневого дефекта. На поверхности кое-где отмечались остатки струпа. Под многослойным плоским эпителием выявлялись небольшие скопления лимфоцитов и определялась молодая соединительная ткань с горизонтально расположенными созревающими фибробластами и фиброцитами (рис. 4).

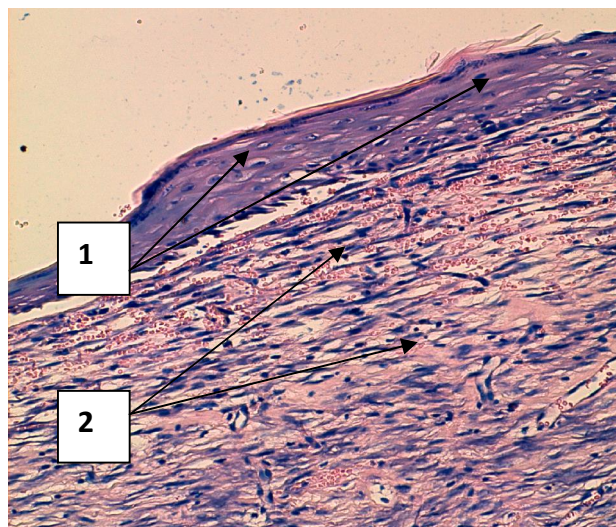


Рис. 4. Рана животного четвёртой группы на 21 сутки эксперимента. Окраска гематоксилином-эозином. Ув $\times 200$. 1 – многослойный плоский эпителий; 2 – созревающая соединительная ткань с горизонтально расположенными клетками

Результаты проведенных гистологических исследований в четвёртой группе животных, в которой использовали комплексный трансплантат на основе геля ФД и ФКК, выявили отсутствие морфологических признаков алергогенности и реактогенности по отношению к окружающим тканям экспериментальной кожной раны: отсутствие фибриноидных некрозов и большого количества многоядерных гигантских клеток рассасывания инородных тел. Гель ФД в организме экспериментальных животных подвергался полной биодegradации в интервале между 14-и и 21-и сутками после имплантации.

При сравнительном анализе результатов наблюдения за животными контрольной и опытных групп и данных планиметрии на протяжении 28 суток установлены межгрупповые различия

динамики заживления раневых дефектов по показателю ΔS на контрольных этапах эксперимента (табл. 1).

Анализ полученных данных показал, что значения ΔS в контрольной группе были достоверно меньше ($p < 0,05$) соответствующих показателей любой из опытных групп на всех этапах проведения эксперимента (исключение – отсутствие значимых различий с результатом третьей группы на седьмые сутки – $p = 0,13$, а также второй группы на 28-е сутки – $p = 0,06$ соответственно). При парном сравнении показателей ΔS не выявлены различия между второй (трансплантация ФКК на третьи сутки эксперимента в количестве $5,0 \times 10^5$ каждой крысе) и третьей (трансплантация ФКК на третьи сутки эксперимента в количестве $2,5 \times 10^5$ каждой крысе) группами на седьмые сутки эксперимента ($U = 24,0$ и $p = 0,13$). Максимальные показатели ΔS на этапах эксперимента ($p < 0,05$ во всех случаях) были зарегистрированы в четвертой группе (рис. 5).

Табл. 1. Динамика показателей ΔS в экспериментальных группах

Группа	Показатель изменения площади раневой поверхности в динамике ΔS , % – Ме [Q ₂₅ ; Q ₇₅]			
	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	28-е сутки
Первая (контроль) (n=11)	26,8 [25,9; 28,8]	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] * $p=0,001$	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]	70,0 [66,2; 71,2] * $p=0,001$ ** $p=0,02$	85,1 [82,5; 86,7] *** $p=0,001$	95,7 [94,8; 97,9] *** $p=0,001$
Четвёртая (n=11)	42,3 [41,1; 42,9] *** $p=0,001$	85,5 [84,3; 86,5] *** $p=0,001$	97,3 [94,5; 100,0] *** $p=0,001$	100 [98,6; 100,0] *** $p=0,001$ *** $p=0,02$
тест Краскела–Уоллиса	H=33,61 $p=0,0001$	H=38,19 $p=0,0001$	H=39,26 $p=0,0001$	H=34,72 $p=0,0001$

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

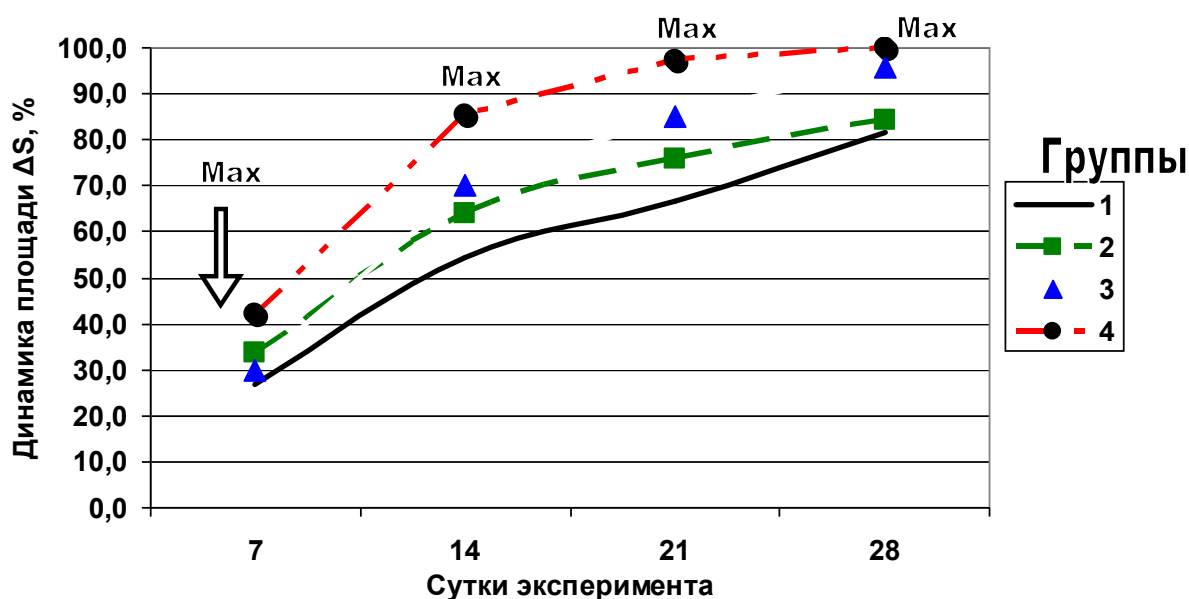
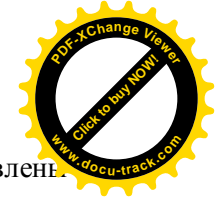
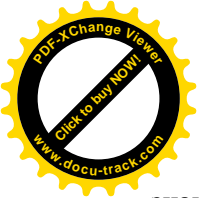


Рис. 5. Межгрупповые различия динамики площади ΔS



При сравнительном анализе скоростей заживления раневых дефектов в динамике выявлены значимые внутригрупповые различия показателей $v_{зак.}$ (табл. 2).

Во всех группах на протяжении 14 сутки показатели скорости заживления находились на стабильном уровне ($p > 0,05$ внутри каждой из групп), на 21-е и 28-е сутки отмечено достоверное ее снижение. В результате статистической обработки данных были зарегистрированы значимые различия скорости заживления между группами в контрольные сроки эксперимента (рис. 6).

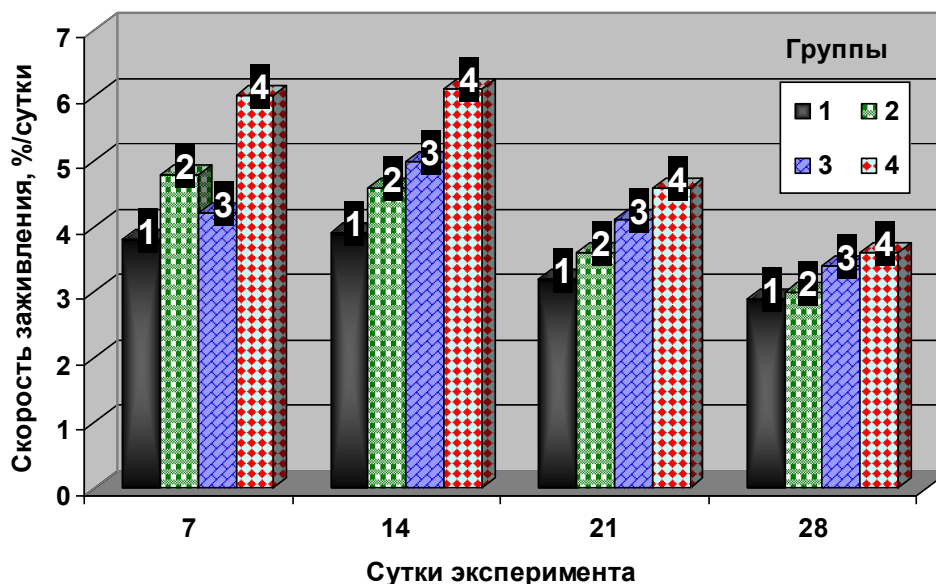


Рис. 6. Скорость заживления $v_{зак.}$ раневых дефектов в исследуемых группах

Таблица 2. Динамика показателей скорости заживления раневого дефекта

Группа	Относительная скорость заживления раневого дефекта (%/сутки) – Me [Q ₂₅ ; Q ₇₅]				метод Фридмана
	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	28-е сутки	
Первая (контроль) (n=11)	3,8 [3,7; 4,1]	3,9 [3,8; 4,0]	3,2 [3,1; 3,4] *** $p=0,03$	2,9 [2,9; 3,0] **** $p=0,03$	ANOVA Chi Sqr.= 29,9 $p=0,0001$
Вторая (n=11)	4,8 [4,6; 5,2]	4,6 [4,4; 4,7]	3,6 [3,5; 3,7] *** $p=0,03$	3,0 [3,0; 3,1] **** $p=0,03$	ANOVA Chi Sqr.=30,9 $p=0,0001$
Третья (n=11)	4,2 [4,0; 4,6]	5,0 [4,7; 5,1]	4,1 [3,9; 4,1] ** $p=0,03$	3,4 [3,4; 3,5] **** $p=0,03$	ANOVA Chi Sqr.=27,4 $p=0,0001$
Четвёртая (n=11)	6,0 [5,9; 6,1]	6,1 [6,0; 6,2]	4,6 [4,5; 4,8] *** $p=0,03$	3,6 [3,5; 3,6] **** $p=0,03$	ANOVA Chi Sqr.=30,5 $p=0,0001$

Достоверность различий по критерию Вилкоксона с поправкой Бонферрони при внутригрупповом сравнении с результатами на: *–7-е, **–14-е, ***–21-е сутки.

При парном сравнении показателей минимальные значения скорости заживления раны на контрольных временных этапах (7-е, 14-е, 21-е, 28-е сутки) эксперимента были зарегистрированы в первой группе (при сравнении с результатами остальных групп $p < 0,05$ во всех случаях, за исключением второй группы на 28 сутки – $U=33,0$; $p=0,08$), а максимумы $v_{зак.}$ на всем протяжении эксперимента наблюдались в четвертой группе ($p < 0,05$ во всех случаях).

В результате проведенного анализа были выявлены существенные изменения, а также меж- и внутригрупповые различия показателей скорости эпителизации раневых дефектов (табл. 3, рис. 7).

Максимальные значения скорости эпителизации в интервале «3-е–7-е сутки» были отмечены в четвертой группе ($p < 0,05$ во всех случаях), в интервале «7-е–14-е сутки» – в третьей и четвертой группах ($p=0,06$ при сравнении этих двух групп и $p < 0,05$ во всех остальных случаях).

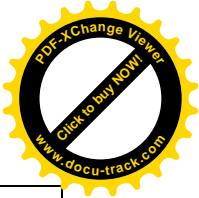
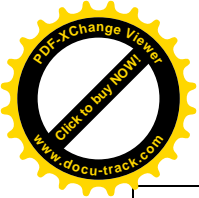


Табл. 3. Динамика показателей $V_{эпит.}$ в экспериментальных группах

Группа	Скорость эпителизации раны, $см^2/сутки$ – Ме [Q ₂₅ ;Q ₇₅]				метод Фридмана
	Временные интервалы эксперимента				
	3-е–7-е сутки	7-е–14-е сутки	14-е–21-е сутки	21-е–28-е сутки	
Первая (контроль) (n=11)	0,48 [0,44; 0,50]	0,26 [0,25; 0,30] * $p=0,03$	0,11 [0,11; 0,15] ** $p=0,03$	0,16 [0,13; 0,17] ** $p=0,03$	ANOVA Chi Sqr.=30,4 $p=0,0001$
Вторая (n=11)	0,60 [0,58; 0,61]	0,30 [0,29; 0,32] * $p=0,03$	0,11 [0,10; 0,13] ** $p=0,03$	0,10 [0,07; 0,12] ** $p=0,03$	ANOVA Chi Sqr.=30,4 $p=0,0001$
Третья (n=11)	0,53 [0,48; 0,60]	0,41 [0,34; 0,42]	0,16 [0,14; 0,19] ** $p=0,03$	0,11 [0,10; 0,12] ** $p=0,03$	ANOVA Chi Sqr.=31,4 $p=0,0001$
Четвёртая (n=11)	0,75 [0,74; 0,76]	0,44 [0,41; 0,45] * $p=0,03$	0,11 [0,11; 0,14] ** $p=0,03$	0,03 [0,01; 0,04] ** $p=0,03$	ANOVA Chi Sqr.=33,0 $p=0,0001$

Достоверность различий по критерию Вилкоксона с поправкой Бонферрони 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

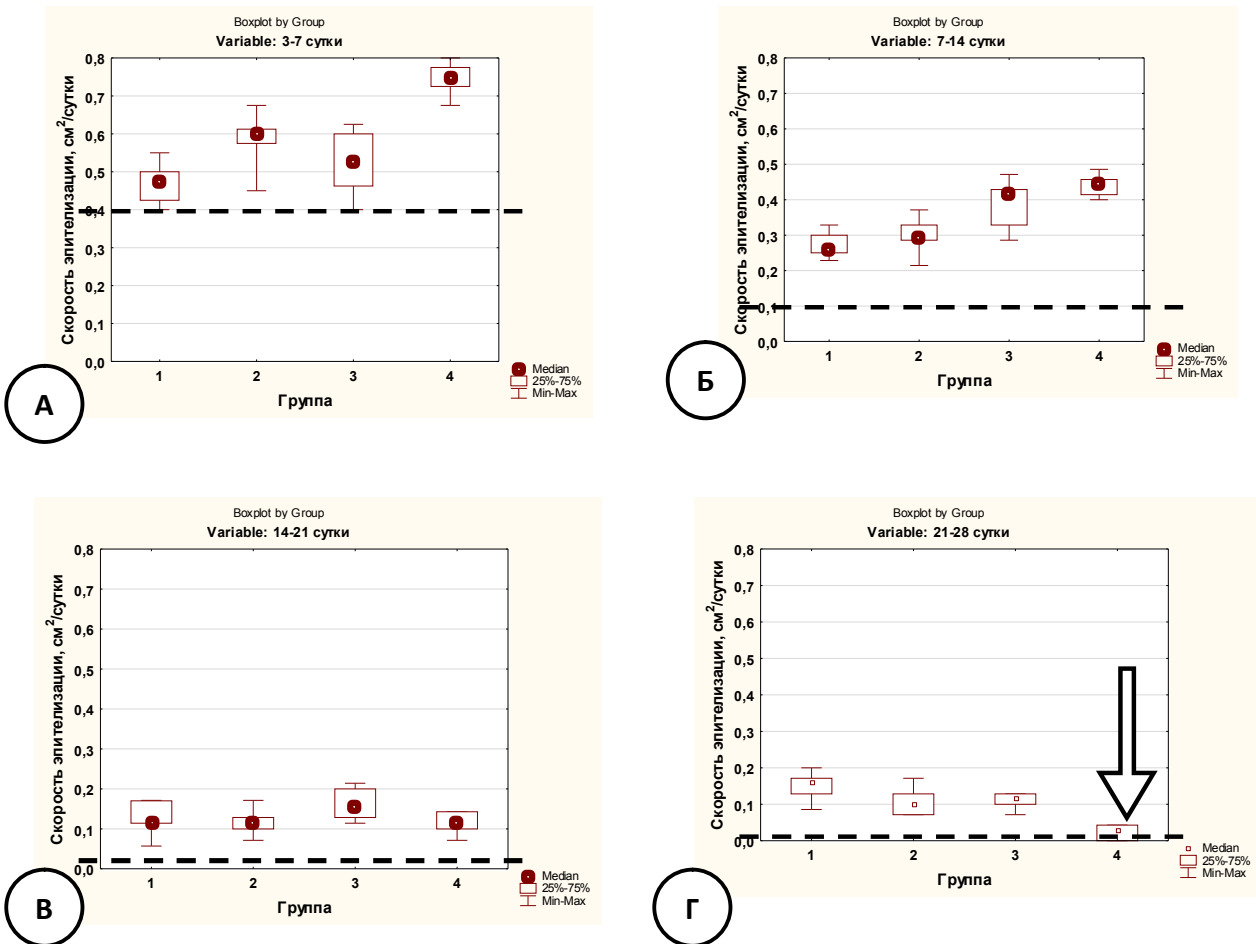
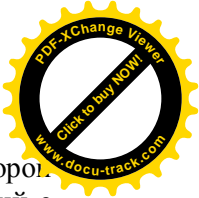
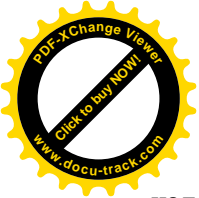


Рис. 7. Скорость эпителизации раневых дефектов в группах. А – интервал 3-е–7-е сутки; Б – интервал 7-е–14-е сутки; В – интервал 14-е–21-е сутки; Г – интервал 21-е–28-е сутки. Пунктиром отмечен уровень эпителизации в контрольной группе, стрелкой – время наступления полной эпителизации раневых дефектов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



При парном межгрупповом сравнении установлено значимое превышение показателей второй над результатами контрольной группы в интервале «3-10 сутки» ($p=0,0001$), отсутствие различий с контролем в периоды «7-14 сутки» и «14-21 сутки» ($U=42,0$; $p=0,243$ и $U=52,5$; $p=0,606$ соответственно), а также значимое снижение скорости эпителизации во второй группе в период «21-28 сутки» при сравнении с контрольными данными ($p=0,002$).

При заданных условиях исследования прогрессивное снижение показателей относительной скорости заживления и особенно скорости эпителизации после 14-и суток эксперимента свидетельствовало о приближении полного заживления раневого дефекта. После проведения локальной клеточной трансплантации полной эпителизации раны предшествовали минимальные ее значения (рис. 7).

Таким образом, на основании анализа полученных результатов при лечении лабораторных животных с моделированными послынными ранами с использованием клеточных трансплантатов выявлено, что локальное введение культивируемых фибробластов кожи (при разных условиях трансплантации) является эффективным лечебным методом и способствует сокращению сроков полного восстановления кожных покровов у животных в опытных группах по сравнению с группой контроля, где заживление раневого дефекта протекало путем спонтанной репаративной регенерации.

Выводы

1. При изучении свойств апробированного синтетического полимера (гель фосфата декстрана) выявлено: отсутствие цитотоксического эффекта и негативного влияния на адгезивные свойства и пролиферативную активность фибробластов кожи, а также сроки формирования монослоя и структурные особенности клеток по сравнению с контрольными культурами.

2. Анализ результатов исследований *in vivo* продемонстрировал, что интенсивность процесса заживления экспериментальных раневых дефектов зависела как от способа доставки культивируемых фибробластов кожи (инъекция клеток в суспензии или аппликация в составе биоматрицы), так и от кратности введения клеточного биоматериала (однократно или двухэтапно с интервалом в семь суток). Несмотря на более высокие показатели скорости уменьшения площадей раневого дефекта, во второй группе (4,8 [4,6; 5,2] %/сутки) при однократном введении ФКК в количестве $5,0 \times 10^5$ клеток на седьмые сутки эксперимента (четвертые сутки от времени проведения трансплантации), в дальнейшем, к 28-и суткам, отмечалась явная тенденция к снижению значений этого показателя (3,0 [3,0; 3,1] %/сутки), который не отличался от результатов в контрольной группе (2,9 [2,9; 3,0] %/сутки) в эти сроки наблюдения. При кратном введении клеточного биоматериала (ФКК вводили по $2,5 \times 10^5$ клеток на третьи и десятые сутки эксперимента) наблюдалась несколько иная картина, которая характеризовалась изначально постепенным увеличением скорости заживления к 14-м суткам (5,0 [4,7; 5,1] %/сутки), а затем более плавным его снижением к 28-м суткам (3,4 [3,4; 3,5] %/сутки), которые были выше сравниваемых показателей контрольной группы в этот период времени.

3. При использовании комплексного трансплантата, состоящего из фибробластов и матрицы на основе геля фосфата декстрана, темп заживления ран был достоверно выше, чем при трансплантации в группах, где применялись инъекционные методы доставки клеточного биоматериала, несмотря на одинаковый количественный пул локально трансплантируемых ФКК ($5,0 \times 10^5$ клеток). Проведенные исследования показали, что скорость эпителизации раневых дефектов в основных группах с 3-и по 14-е сутки колебалась от 0,75 до 0,44 см²/сутки после локального аппликационного применения комплексного трансплантата (ФКК в составе геля ФД) и от 0,60 до 0,30 см²/сутки при использовании инъекционных способов доставки клеточных биопродуктов.

4. Экспериментальная оценка использования матрицы геля ФД показала отсутствие признаков алергогенности и реактогенности (биосовместимость) по отношению к окружающим тканям и раневому дефекту после трансплантации, а также хорошую биodeградируемость в сроки (14-21-е сутки), не превышающие время заживления раневого дефекта (26-28-е сутки).

5. Полученные результаты проведенных экспериментов являются основой для разработки нового подхода к лечению дефектов кожи и мягких тканей различной этиологии, в том числе и длительно существующих, а также для использования в дальнейших исследованиях по клиническому применению в регенеративной медицине.

Литература:

- [1]. Бабаева А. Г. Регенерация – факты и перспективы. М.: РАМН, 2009. 334 с.
- [2]. Баранов Е. В. // Весці НАН Беларусі. Сер. біал. навук. 2014. - № 1. С. 60–67.
- [3]. Ю.А. Швед и др. // Цитология. 2006. 49, № 1. С. 32.

- [4]. Длительно незаживающие раны и язвы (патогенез, клиника, лечение): монография / П.И. Толстых [и др.]. М.: Дипак, 2009. 168 с.
- [5]. Зорина А. И. и др. // Косметика и медицина. 2011. № 2. С. 12–26.
- [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]. Методы культивирования клеток/ под ред. Г.П. Пинаева, М.С. Богдановой. СПб.: Изд-во Политехн. Ун-та, 2008. 278с.
- [8]. И.Я. Бозо и др. // Цитология, 2010, Т. 526 № 2. С. 99–109.
- [9]. S. Chunmeng et. al. // J Surg Res. 2004. Vol. 121, № 1. P. 13–19.
- [10]. F.G. Chen et. al. // J. Cell Science, 2007, Vol. 120. P.2875–2883.

Поступила в редакцию: 28.03.2017 г.

E. V. BARANOV, A. V. BURAVSKY, Z. B. KVACHEVA, I. B. VASILEVICH, S. I. TRETYAK

FEATURES OF WOUND HEALING PROCESS AT USE OF DIFFERENT WAYS OF SKIN FIBROBLASTS LOCAL TRANSPLANTATION IN LABORATORY ANIMALS

¹*Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus;*

²*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

Summary

The study was performed on 68 Wistar rats weighing 180-200 grams with clean wounds of 2,5 cm in diameter (4 groups - according to 17 animals in each). A culture of dermal fibroblasts was isolated from the skin of newborn rats; we performed a step-by-step cell reassembly to accumulate the necessary biomass of rat skin fibroblasts (RSF). In group one (control) cell biological products were not introduced. In groups two and three, an injection method for delivering cellular material was used to treat experimental wounds (RSF $5,0 \times 10^5$ and $2,5 \times 10^5$ cells twice at intervals of seven days). In group four, an application method was used to deliver the biomaterial on a biodegradable matrix (dextran phosphate gel (DP)) with a content of cultured RSF in an amount of 500×10^3 per wound. At all stages (7th, 14th, 21th, 28th days) of the experiment, the minimum values of the epithelialization rate were recorded in the first group. The fourth group was characterized by the maximum parameters of wound healing; complete epithelization of the wound defect was determined on the 26-28th day of the experiment. It was found that the local application of cultured dermal fibroblasts leads to a significant reduction of the timing of wound epithelialization. The course of the healing processes of experimental wounds depends both on the way the RSF is delivered (injection of suspension or application in the composition of the biomatrix) and on the multiplicity of the introduction of the cellular biomaterial (once or twice with an interval of seven days).

Keywords: rat skin fibroblasts, dextran phosphate, biodegradable matrix, local transplantation, wound healing.