

ВОЕННАЯ МЕДИЦИНА

Научно-практический рецензируемый журнал

Зарегистрирован Министерством информации Республики Беларусь

Свидетельство о государственной регистрации СМИ № 23 от 17.02.2009 г.

Издается с 2006 года

Выходит 4 раза в год

№ 2 (43) 2017

апрель–июнь

Подписные индексы: в каталоге «Белпочты» — 74 827, в каталоге «Роспечати» — 36 472

Адрес для писем:

220006, г. Минск,
ул. Ленинградская, 6, каб. 2
Тел.: 328-58-92
E-mail: Medjournal@bsmu.by

Подписано в печать
с готовых диапозитивов
07.04.2017 г.

Бумага офсетная
Гарнитура
FranklinGothicBookC
Печать офсетная
Формат 60×84 1/8.
Усл. печ. л. 18,6
Тираж 417 экз.
Заказ № 111

Отпечатано
в ОАО «Красная звезда»
220073, г. Минск,
1-й Загородный пер., 3
Лиц. № 02330/99,
выд. 14.04.2014 до 30.04.2019
Министерством информации
Республики Беларусь

© **Белорусский
государственный
медицинский
университет,
2017**

Учредитель

Учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет»
220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83
<http://www.bsmu.by>

Главный редактор

С. Н. Шнитко, д-р мед. наук, проф.

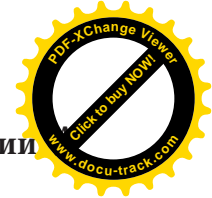
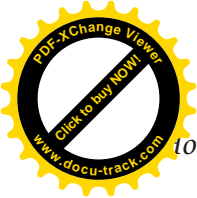
Зам. главного редактора

А. А. Бова, д-р мед. наук, проф.

Редакционная коллегия:

А. С. Еськов (г. Минск), председатель редколлегии,
В. Н. Бордаков (г. Минск), д-р мед. наук, проф., секретарь редколлегии,
С. А. Алексеев (г. Минск), д-р мед. наук, проф.,
В. В. Аничкин (г. Гомель), д-р мед. наук, проф.,
В. Г. Богдан (г. Минск), д-р мед. наук, проф.,
Л. Н. Бисенков (г. Санкт-Петербург), д-р мед. наук, проф.,
П. Г. Брюсов (г. Москва), д-р мед. наук, проф.,
Ю. М. Гаин (г. Минск), д-р мед. наук, проф.,
Ю. И. Галлингер (г. Москва), д-р мед. наук, проф.,
П. В. Гарелик (г. Гродно), д-р мед. наук, проф.,
С. В. Губкин (г. Минск), первый проректор БГМУ, проф.,
И. И. Гунько (г. Минск), д-р мед. наук, проф.,
И. Н. Денисов (г. Москва), д-р мед. наук, проф., академик РАН,
О. К. Доронина (г. Минск), д-р мед. наук, проф.,
С. В. Жаворонок (г. Минск), д-р мед. наук, проф.,
В. В. Жарков (г. Минск), д-р мед. наук, проф.,
К. В. Жданов (г. Санкт-Петербург), д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН,
С. А. Жидков (г. Минск), д-р мед. наук, проф.,
А. Кехаев (г. София), д-р мед. наук,
Б. Н. Котив (г. Санкт-Петербург), д-р мед. наук, проф.,
Х. Х. Лавинский (г. Минск), д-р мед. наук, проф.,
Г. Лобжанидзе (г. Тбилиси), д-р мед. наук, проф.,
Ю. В. Лобзин (г. Санкт-Петербург), д-р мед. наук, проф., академик РАН,
И. Б. Максимов (г. Москва), д-р мед. наук, проф.,
М. И. Михайлов (г. Москва), д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН,
Т. В. Мохорт (г. Минск), д-р мед. наук, проф.,
В. Мутафчийски (г. София), д-р мед. наук, проф.,
Н. Н. Филипцевич (г. Минск), д-р мед. наук, проф.,
А. В. Прохоров (г. Минск), д-р мед. наук, проф.,
М. И. Римжа (г. Минск), д-р мед. наук, проф.,
В. В. Руденок (г. Минск), д-р мед. наук, проф.,
Г. П. Рычагов (г. Минск), д-р мед. наук, проф.,
А. В. Сикорский (г. Минск), ректор БГМУ,
А. Н. Стожаров (г. Минск), д-р биол. наук, проф.,
Е. Л. Трисветова (г. Минск), д-р мед. наук, проф.,
К. Р. Юсиф-заде (г. Баку), д-р мед. наук

Редактор Л. И. Жук



Е. В. Баранов¹, А. В. Буравский¹, З. Б. Квачева², И. Б. Василевич²,
С. И. Третьяк¹, И. Д. Волотовский²

ЛОКАЛЬНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ И ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ: ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖНОГО ПОКРОВА И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЗАЖИВЛЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ РАНЕВЫХ ДЕФЕКТОВ

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

В статье представлены результаты экспериментальных исследований у лабораторных животных ($n = 51$) с моделированной чистой раной диаметром 2,5 см, в лечении которых использовались мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК), полученные из жировой ткани (ЖТ), и культивированные фибробласты кожи крысы (ФКК). Было сформировано 3 группы — по $n = 17$ животных в каждой: 1 контрольная (спонтанная регенерация раны) и 2 основных группы. Достоверно определено, что более высокий темп регенерации раневой поверхности наблюдался в группах с применением клеточного биоматериала по сравнению с контрольной. Выявлено, что течение процессов заживления в экспериментальных раневых дефектах зависело от условий трансплантации (применяемые клеточные биоматериалы) и от этапности применения клеток.

В условиях эксперимента установлено, что локальное применение аллогенных ММСК ЖТ и ФКК приводит к ускорению смены фаз раневого процесса и к достоверному сокращению сроков эпителизации экспериментальных раневых дефектов.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, жировая ткань, фибробласты кожи, экспериментальные раны, лечение ран.

E. V. Baranov, A. V. Buravsky, Z. B. Kvacheva, I. B. Vasilevich, S. I. Tretyak, I. D. Volotovskiy

LOCAL TRANSPLANTATION OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL STEM CELLS FROM ADIPOSE TISSUE AND SKIN FIBROBLASTS: FEATURES OF REGENERATION OF THE SKIN AND COMPARATIVE EVALUATION OF THE EXPERIMENTAL WOUND DEFECTS HEALING

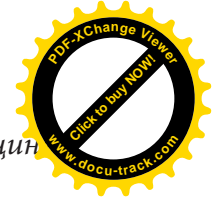
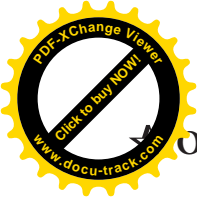
The article presents the results of experimental studies conducted in laboratory rats ($n = 51$) with models of clean wounds 2.5 cm in diameter. We used multipotent mesenchymal stem cells (MMSC) derived from adipose tissue (AT), and cultured rat skin fibroblasts (RSF). Three groups (according to $n = 17$ animals in each) were formed: 1 — control (spontaneous regeneration of the wound) and 2 — major groups. It was reliably determined that a higher rate of wound regeneration was observed in groups with the use of cellular biomaterial. It was revealed that the course of the healing processes of the experimental wound defects depended on the conditions of transplantation (used cellular biomaterials) and on the stage-by-stage application of cells. It was found that the local application of RSF 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, adipose tissue, skin fibroblasts, experimental wounds, wound treatment.

Проблема лечения раневых дефектов кожи и мягких тканей, особенно хронических ран, не теряет своей актуальности. Вектор исследований направлен на изучение особенностей репарации поврежденных тканей и поиск способов активации течения раневого процесса и ускорения смены его фаз. Несостоятельность традиционных методов лечения при длительно незаживающих ранах, по мнению ряда авторов, обусловлена предопределённым локальным «патологическим гомеостазом», при котором собственный регенераторный потенциал макроорганизма, как местный, так и системный оказывается недостаточным для закрытия раневого дефекта [1, 2, 7].

В ходе заживления рана и окружающие ткани претерпевают ряд этапных изменений: имеют место как деструктивные, так и восстановительные изменения эпителиальной, соединительной, мышечной, и в том числе и нервной тканей, образующей кожный дефект. В хирургической практике при развитии раневого процесса кожных ран выделяют три фазы: первая — фаза воспаления, вторая — фаза регенерации (пролиферации, образование грануляций), третья — фаза эпителизации (созревания, ремоделирова-

ния, образование рубца и его реорганизация) [2, 6, 7]. Выделение отдельных фаз раневого процесса носит достаточно условный характер, так как довольно трудно провести чёткую грань между завершением одной и началом другой стадии. Последовательность смены фаз при не осложнённом течении ран является закономерным процессом: каждая фаза характеризуется определёнными функциональными и морфологическими изменениями, протекающими как в ране, так и окружающих тканях. В некоторых случаях временные параметры хронологической последовательности смены этапов раневого процесса могут увеличиваться за счёт возникающих дефектов в цепи одной или нескольких из фаз заживления [1, 6]. Это может приводить к увеличению продолжительности фазы воспаления, девиантному течению раневого процесса и формированию длительно незаживающего раневого дефекта кожи. Хронизации процесса заживления могут способствовать такие факторы как: нарушение баланса взаимодействия главных клеток раневого процесса между собой и клетками микроокружения, снижение митотической и биохимической активности этих клеток, нарушение их ответа на



регуляторные сигналы, дисбаланс продукции факторов роста, клеточных и экстрацеллюлярных компонентов, антиоксидантный стресс (окислительное повреждение свободными радикалами), увеличение количества «стареющих» клеток, а так же специфическое патогенетическое влияние [1, 4, 7]. Немаловажную роль в этом процессе играют локализация и характер повреждения, состояние макроорганизма, а так же методы и способы, применяемые при местном лечении раны. При дополнительной микробной контаминации раны микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности ещё в большей степени способствуют увеличению продолжительности фазы воспаления, вызывая при этом сенсбилизацию макроорганизма и значительно угнетая процессы регенерации, как местного так и системного уровней [8, 9]. В хронической ране (трофической язве) как правило, наблюдаются одновременно явления и признаки, характерные для всех фаз раневого процесса, что ещё больше усложняет выбор тактики при проведении местного лечения. Поэтому поиск новых методов лечения, направленных на коррекцию «патологического гомеостаза» является весьма актуальным.

Одним из перспективных направлений в последнее десятилетие являются клеточные технологии, основанные на использовании мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) из жировой ткани (ЖТ) и фибробластов кожи [2, 3, 4, 5, 10]. Всестороннее изучение биологии клеточных биоматериалов обосновывает актуальность исследования процессов получения, культивирования, дифференцировки этих клеток, что в конечном итоге имеет достаточно позитивные перспективы для их направленного применения при лечении ран. Немаловажным свойством недифференцированных стволовых/прогенераторных клеток и фибробластов кожи является то, что они посредством секреции различных цитокинов и факторов роста, а также ответной реакцией на подобную экспрессию регуляторных белков другими клетками участвуют в поддержании клеточного гомеостаза и регуляции репаративных процессов в поврежденных органах и тканях [4, 7].

Цель исследования. Выявить особенности восстановления целостности кожного покрова и провести сравнительный анализ эффективности лечения экспериментальных раневых дефектов по изменению объективных показателей заживления ран в динамике течения раневого процесса при локальной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток, полученных из жировой ткани, и фибробластов кожи крыс (ФКК).

Материалы и методы

Исследования *in vitro*

Выделение и культивирование ФКК. В эксперименте использовали новорожденных крыс линии Wistar. В стерильных условиях забирали кожу в области спины. Первичную культуру дермальных фибробластов кожи крысы готовили методом эксплантов (Блинова М. И. 2006 г.) [5] 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 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 миллионов). В экспериментах использовались 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% Трипси-на и 0,02% Версена в соотношении 1:2. Для трансплантации использовали суспензию дермальных фибробластов в концентрации 2,5×10⁵ клеток/мл.

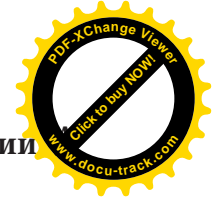
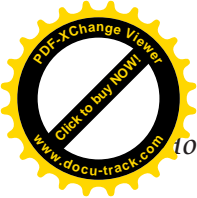
Выделение и культивирование ММСК ЖТ. Аллогенные ММСК получали путём липэктомии жировой ткани хирургическим способом у лабораторных животных-доноров в максимально возможном объёме под внутривенным тиопенталовым наркозом (40 мг/кг массы животного). Все манипуляции по выделению и культивированию ММСК проводили по методике, описанной в работе (Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H. 2001), с небольшими модификациями [10]. Прежде всего, эксплантированную ЖТ измельчали, а гомогенат ткани в дальнейшем подвергали ферментативной обработке в растворах коллагеназы и/или диспазы. Полученную клеточную суспензию фильтровали через капроновый фильтр с диаметром пор 70 мкм, центрифугировали с целью отделения фракции стромальных клеток. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в полной питательной среде и высевали на адгезионные пластиковые чашки Петри (Sarstedt, Германия) и помещали в CO₂-инкубатор. Полную смену ростовой среды проводили каждые 72 ч. При достижении 75%-ной конfluenceности монослоя клеток в первичной культуре ММСК пересеивали. Плотность посадки клеток составляла 1,0×10⁴ клеток на 1 см² поверхности культурального пластика. Для оценки жизнеспособности ММСК использовали 0,2–0,5% раствор красителя трипанового синего. Дальнейшую смену среды проводили каждые 3–4 дня. 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. Анализ клеточного фенотипа проводили с использованием CD-маркеров 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 использовали суспензию ММСК ЖТ (2-го и 3-го пассажей) в концентрации 2,5×10⁵ клеток/мл.

Исследования *in vivo*

При проведении экспериментальных исследований (*in vivo*) были использованы белые крысы линии Wistar (n = 51) возрастом 8–10 недель обоего пола массой тела 180–200 г. Каждое животное размещали в отдельных боксах в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде. Условия кормления и содержания всех лабораторных крыс были одинаковыми. Операции и манипуляции во время проведения экспериментов выполнялись с соблюдением правил асептики и антисептики с использованием щадящей методики обезболивания. Все исследования проводились с соблюдением правил биоэтики и международных принципов и требований «Европейской конвенции по защите позвоночных животных» (Страсбург, март 1986 г.) и Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным.

Структура эксперимента. Всего было сформировано 3 экспериментальных группы по 17 животных в каждой.



Из них 6 лабораторных животных выводились поэтапно в контрольных точках эксперимента для выполнения гистоморфологического исследования раны и окolorаневых тканей. Остальные 11 крыс были предназначены для макроскопической оценки течения раневого процесса и восстановления раневых дефектов с применением планиметрического метода исследования, а также проведения статистического анализа значений динамических показателей заживления.

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

Во второй группе ($n = 17$) каждой крысе выполняли локальную трансплантацию ФКК путём инъекции суспензии клеток по краю раневого дефекта и в центральную часть раны по $2,5 \times 10^5$ клеток два раза с интервалом 7 суток (на 3 и 10 сутки);

В третьей группе ($n = 17$) каждой крысе проводили локальную трансплантацию ММСК ЖТ путём инъекции суспензии клеток по краю раневого дефекта и в центральную часть раны по $2,5 \times 10^5$ клеток два раза с интервалом 7 суток (на 3 и 10 сутки);

Моделирование экспериментальной раны выполняли по разработанной методике. После внутрибрюшинного введения 0,5–0,7 мл 1% раствора тиопентала натрия, экспозиции 15–20 минут, крысу фиксировали на спине, выщипывали 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, отсекая 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 позволяла визуально контролировать течение раневого процесса. Всем животным 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).

Способы проведения трансплантации и оценка эффективности клеточной терапии. Раневую поверхность обрабатывали 3% раствором H₂O₂, промывали стерильным физиологическим раствором, затем животным основных групп в два этапа (3 и 10 сутки) осуществляли трансплантацию ММСК ЖТ или ФКК. Локальную пересадку клеточного биоматериала выполняли инъекционным методом по периметру и в центральную область раневого дефекта. Количество трансплантируемого материала равномерно распределяли при введении в места инъекций. Общий объем введенной суспензии составил $5,0 \times 10^5$ клеток на одну крысу.

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, 7, 14, 10, 21, 28, 35 сутки). Для выявления характера течения репаративных процессов в исследуемых группах животных использовали данные, полученные методом компьютерной планиметрии, из которых по следующим формулам 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 ($v_{\text{з.ж.}}$, %/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.

Выводы о влиянии трансплантации ММСК ЖТ и ФКК на течение раневого процесса делали на основании сравнительной оценки результатов экспериментальных групп.

Животных контрольной и основных групп поэтапно выводили из эксперимента (однократное внутрибрюшное введение летальной дозы 3% раствора тиопентала натрия) на 7, 10, 14, 21, 28 и 35 сутки. В эти же сроки выполняли забор биоптата: иссекали полностью всю рану (дно раны на всю толщину и прилежащие участки кожи). Затем ткани помещали в 10%-ный нейтральный формалин в ёмкость достаточного объёма с целью предотвращения скручивания гистологического материала. После фиксации образцов ткани в течение 2-х суток выполняли выбор участков (центр и края раны) для морфологического исследования. 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).

Статистические методы исследований. Статистическая обработка результатов исследований проведена с использованием непараметрических методов, данные представлены в виде «медиана и квантили» — $Me(Q_{25}; Q_{75})$. Для сравнения независимых выборок применяли U-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test), связанных — метод Фридмана (Friedman test) и критерий Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test) с поправкой Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при вероятности безошибочного прогноза не менее 95% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждения

При сравнении значений площадей раневых дефектов (S , см²) на 3 сутки в экспериментальных группах было выявлено отсутствие статистически значимых различий ($p > 0,05$ во всех случаях). Это было важно для последующей объективной оценки результатов исследования — статистической обработки и межгруппового сравнения полученных данных о динамике площадей экспериментальных ран (ΔS , %), а также скоростей заживления раневых дефектов ($v_{\text{з.ж.}}$, $v_{\text{эпит.}}$).

В результате динамического визуального (рисунок 1), планиметрического и гистологического контролей над состоянием экспериментальных ран было установлено, что уже на 4 сутки после трансплантации клеточных биопрепа-

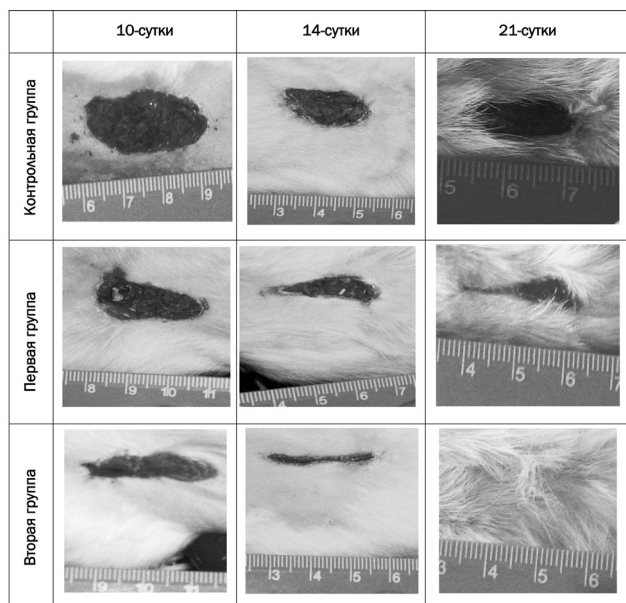
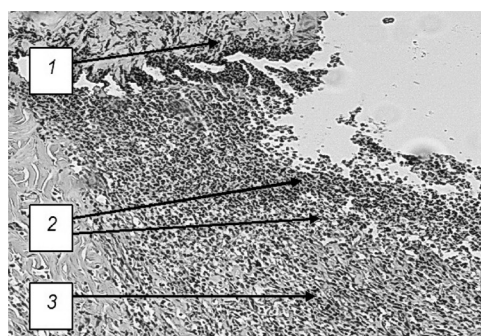


Рис. 1. Динамика изменений раневых дефектов в сравниваемых группах (3-е сутки — начало проведения локальной клеточной терапии)

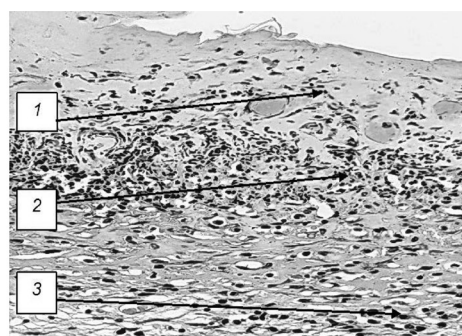
ратов в выделенных для сравнения группах наступала отчетливая разница в течение раневого процесса по сравнению с группой контроля. Особенно отчетливо эти различия выявлялись, начиная с 10-х суток и последующие контрольные сроки наблюдения.

При изучении морфологической картины в контрольной группе (спонтанная регенерация) на 14 сутки было выявлено, что поверхность раны животных была представлена погибающими нейтрофилами и характеризовалась неравномерным заживлением: в одних участках определялась созревающая грануляционная ткань, содержащая беспорядочно расположенные формирующиеся коллагеновые волокна, в других — преобладали фибриноидные изменения, почти без присутствия коллагеновых волокон. В глубоких слоях дермы отмечались в небольшом количестве эозинофилы. На 21 сутки наблюдения 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 2).

Во второй группе животных (ФКК дважды по $2,5 \times 10^5$ клеток) на 14 сутки наблюдения при исследовании гистоло-



А

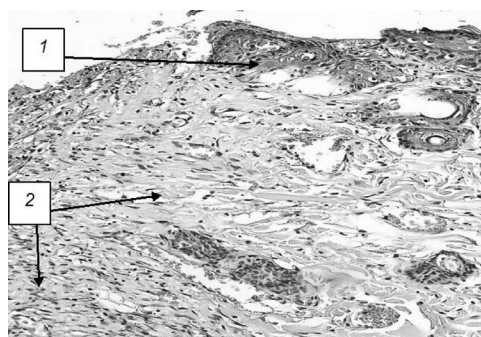


Б

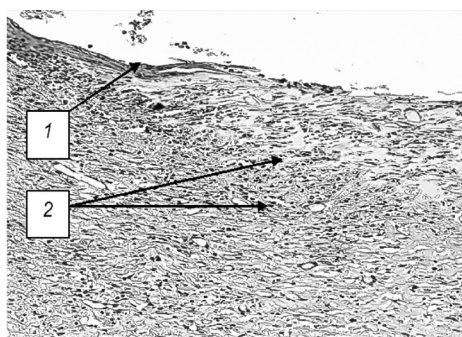
Окраска гематоксилин-эозин, ув. $\times 200$

1 — уплотненная плазма, 2 — погибающие нейтрофилы, 3 — созревающая грануляционная ткань с горизонтальной ориентацией клеток и волокон

Рис. 2. Рана животного контрольной группы на 14 (А) и 21 (Б) сутки эксперимента



А



Б

Окраска гематоксилин-эозин, ув. $\times 200$

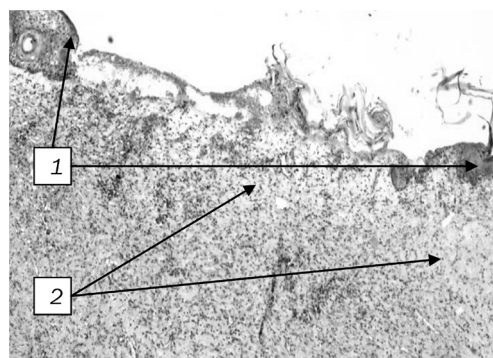
1 — краевая эпителизация, 2 — созревающая грануляционная ткань с горизонтальной ориентацией клеток и волокон

Рис. 3. Рана животного второй группы на 14 (А) и 21 (Б) сутки эксперимента

гических срезов по краям раневого дефекта определялись участки нарастания многослойного плоского эпителия. В созревающей грануляционной ткани отмечалось большое количество фибробластов, гистиоцитов, кровеносных сосудов, а так же коллагеновых волокон, ориентированных горизонтально. На 21 сутки определялась чистая поверхность раны, которая была представлена созревающей грануляционной тканью, где определялись кровеносные сосуды. Отмечалось значительное снижение воспалительных процессов. У краев раны наблюдалось более выраженное нарастание многослойного плоского эпителия (рисунок 3).

При исследовании срезов животных третьей группы (ММСК дважды по $2,5 \times 10^5$ клеток) на 14 сутки эксперимента в микропрепаратах определялся щелевидный раневой дефект. Отмечалась выраженная краевая эпителизация. Поверхность повреждения была представлена зрелой соединительной тканью с небольшими очагами лимфоцитов и участками многослойного плоского эпителия в центральной части раны (рисунок 4).

У животных третьей группы (ММСК $2,5 \times 10^5$ дважды с интервалом 7 суток) полное заживление раневой поверхности наблюдалось к 17–18 суткам от начала эксперимента.



Окраска гематоксилин-эозин, ув. $\times 200$

1 – краевая эпителизация, 2 – зрелая соединительная ткань
Рис. 4. Рана животного третьей группы на 14 сутки эксперимента

К 28 суткам площади раневых дефектов у животных первой (контрольной) и второй групп уменьшились на 81,7(80,7;84,0)% и 95,7(94,8;97,9)% по отношению к исходным данным, а полное заживление ран наступило на 35–36 сутки и 29–30 сутки эксперимента соответственно (таблица 1).

Таблица 1. Динамика показателей ΔS в экспериментальных группах

Группа	Показатель изменения площади раневой поверхности в динамике ΔS , % – Me($Q_{25}; Q_{75}$)				
	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)	29,7 (28,2;31,9) *p = 0,019	45,2 (42,3;46,5) *p = 0,015	70,0 (66,2;71,2) *p = 0,000	85,1 (82,5;86,7) *p = 0,000	95,7 (94,8;97,9) *p = 0,000
Третья (n = 11)	38,2 (36,9;39,3) **/**p = 0,000	53,7 (52,9;56,8) **/**p = 0,000	95,7 (93,6;98,6) **/**p = 0,000	100 **/**p = 0,000	—

Примечание – Mann-Whitney U-test: * – значимость различий с группой 1; ** – значимость различий с группой 2.

Анализ полученных данных показал, что значения ΔS первой группы (контроль) были достоверно меньше ($p < 0,05$ во всех случаях) соответствующих показателей любой из опытных групп на всех этапах проведения эксперимента. При парном сравнении показателей ΔS максимальные значения на 7, 10, 14 и 21 сутки ($p < 0,05$

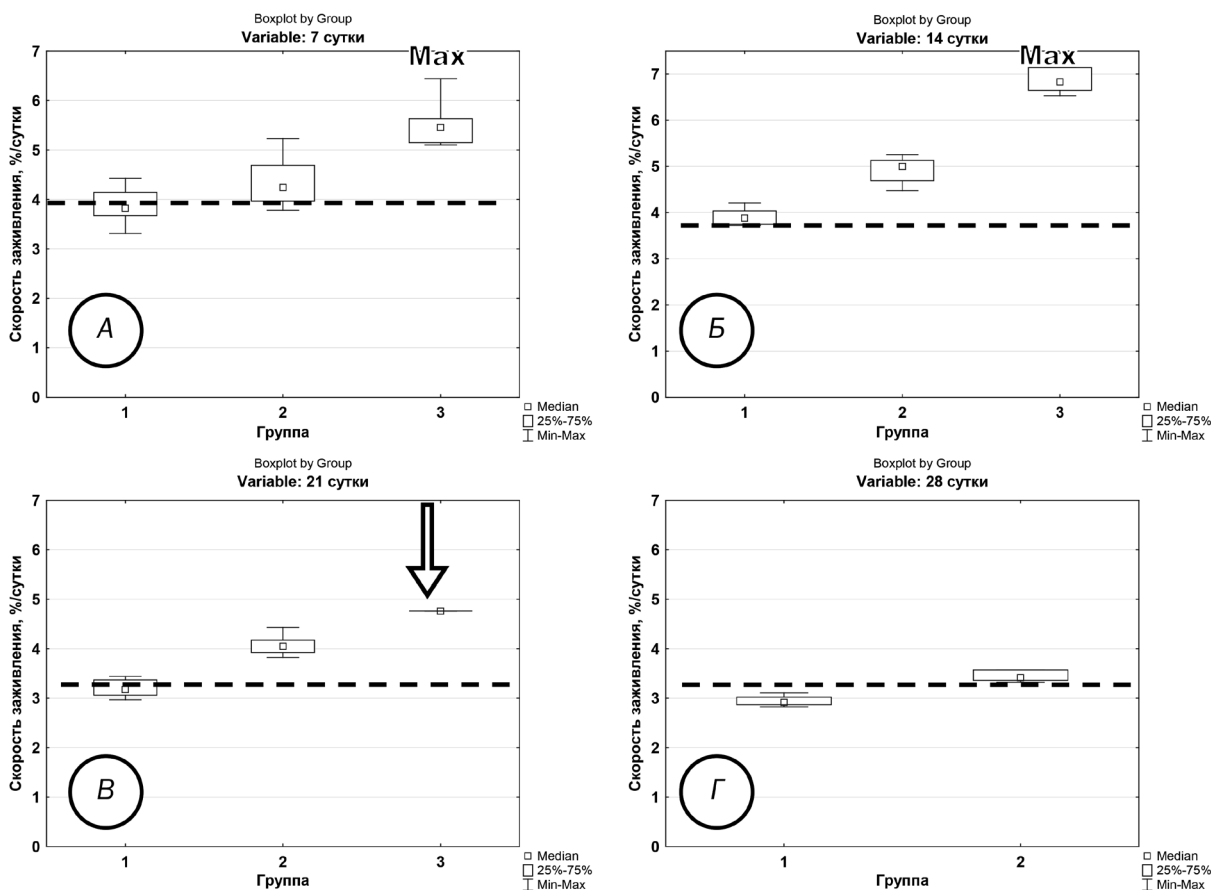
во всех случаях) зарегистрированы в третьей группе (трансплантация ММСК $2,5 \times 10^5$ дважды с интервалом 7 суток).

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

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

Группа	Относительная скорость заживления раневого дефекта $v_{\text{зж}}$, %/сутки – Me($Q_{25}; Q_{75}$)					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)	4,2 (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 = 0,000
Третья (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

Примечание – достоверность различий по Wilcoxon matched pairs test с поправкой Бонферрони при сравнении с результатами на: * – 7, ** – 10, *** – 14 и **** – 21 сутки.



А – 7 сутки; Б – 14 сутки; В – 21 сутки; Г – 28 сутки

Рис. 5. Скорость заживления $v_{\text{зак}}$ раневых дефектов в группах

Пунктиром отмечен уровень $v_{\text{зак}}$ в контрольной группе, стрелкой обозначено полное заживление раневых дефектов в третьей группе.

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

В результате статистической обработки данных были также отмечены различия скоростей заживления между группами в контрольные сроки эксперимента (рисунок 5).

Минимальные значения $v_{\text{зак}}$ на контрольных временных этапах (7, 10, 14 и 21 сутки) эксперимента были

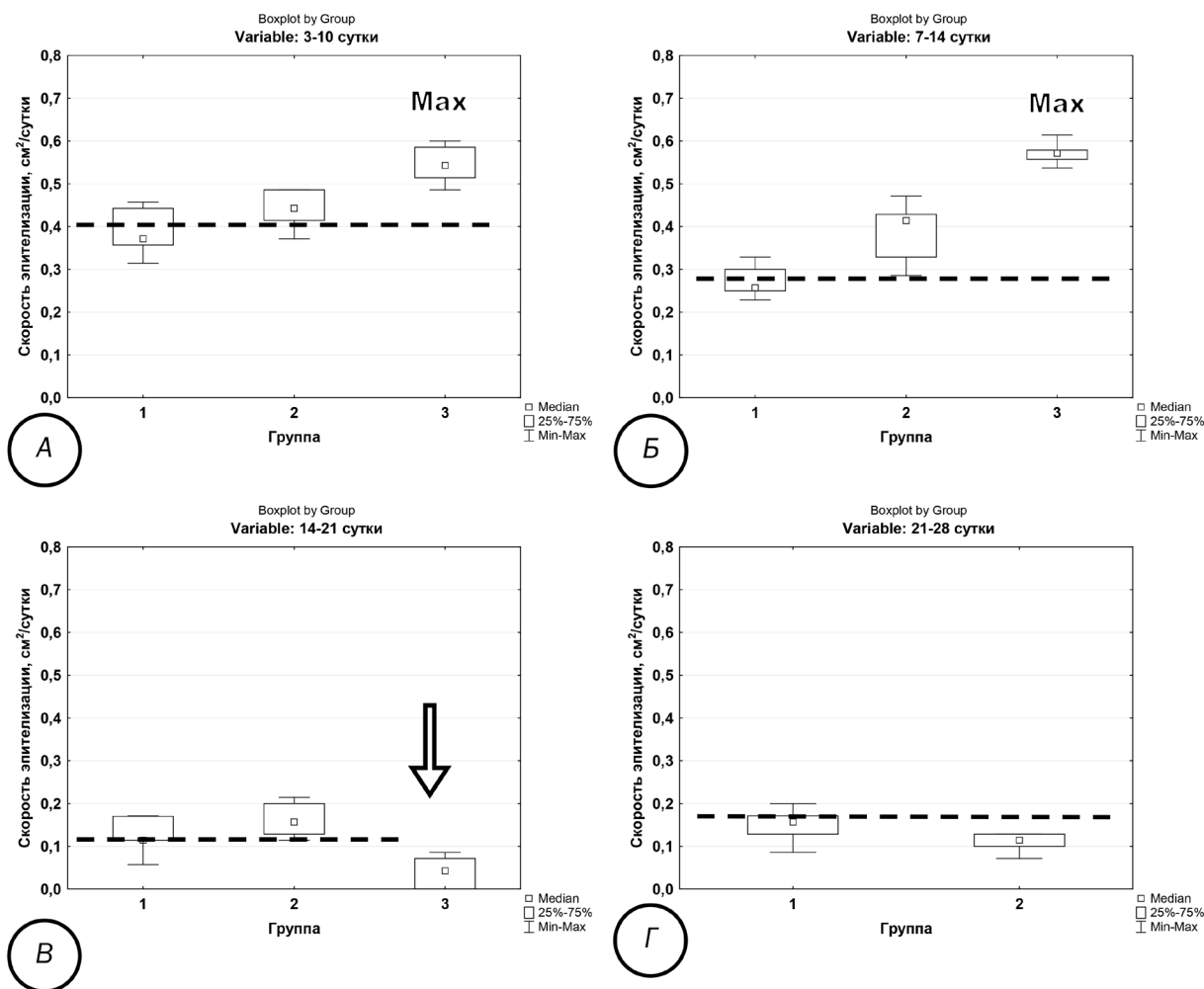
зарегистрированы в первой группе (при сравнении с результатами остальных групп $p < 0,05$ во всех случаях), в которой раневые дефекты зажили на 17–18 сутки. Значения $v_{\text{зак}}$ второй группы (трансплантация ФКК $2,5 \times 10^5$ дважды с интервалом 7 суток) во всех контрольных точках эксперимента были достоверно больше, чем в первой 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 $v_{\text{эпит}}$ в процессе проведения эксперимента (таблица 3, рисунок 6).

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

Группа	Скорость эпителизации раны $v_{\text{эпит}}$, см ² /сутки – Me(Q ₂₅ ; Q ₇₅)			
	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)	0,44 (0,43;0,48)	0,41 (0,34;0,42) *p = 0,016	0,16 (0,14;0,19) **p = 0,003	0,11 (0,10;0,12) ***p = 0,003 ***p = 0,011
Третья (n = 11)	0,54 (0,51;0,57)	0,57 (0,56;0,58)	Рана зажила на 17–18 сутки	–

Примечание – достоверность различий по Wilcoxon matched pairs test при сравнении с результатами: * – интервала 3–10 сутки, ** – интервала 7–14 сутки, *** – интервала 14–21 сутки



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

Рис. 6. Скорость эпителизации $v_{\text{эпит.}}$ раневых дефектов в группах

Пунктиром отмечен уровень $v_{\text{эпит.}}$ в контрольной группе, стрелкой обозначена полная эпителизация раневых дефектов в третьей группе.

Максимальные значения скорости эпителизации $v_{\text{эпит.}}$ в интервалах «3–10 сутки» и «7–14 сутки» были отмечены в третьей группе ($p < 0,05$ во всех случаях). В интервалах эксперимента «14–21 сутки» и «21–28 сутки» показатели $v_{\text{эпит.}}$ второй группы были достоверно больше ($p < 0,05$), чем первой (рисунок 6).

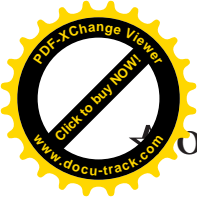
Таким образом, проведенные экспериментальные исследования показали, что при локальном использовании клеточного биоматериала (ММСК и ФКК) отмечается значительное сокращение сроков заживления раневых дефектов у экспериментальных животных по сравнению с контрольной группой, где кожная рана заживала посредством самостоятельной (не стимулированной) регенерации. Ускорение процесса полного закрытия раны в основных группах животных мы связываем как с функциональной активностью фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток, влияющих на скорость образования и созревания грануляционной ткани и эпителия, так и с непосредственным действием культивированных клеточных композиций на течение раневого процесса за счет выделения им ряда цитокинов и факторов роста, которые оказывают аутокринные и паракринные эффекты.

Выводы

1. Результаты гистологических и планиметрических исследований, а также данные визуального наблюдения, полученные при изучении влияния ММСК ЖТ и ФКК на течение раневого процесса экспериментальной раны, свидетельствуют об активации репаративных процессов вследствие как ускорения сроков созревания грануляционной ткани, так и стимуляции контракции раны, что приводит к увеличению скорости эпителизации и сокращению сроков полного заживления раневого дефекта.

2. При сопоставлении сроков заживления раневых дефектов достоверно более высокая скорость эпителизации на протяжении всего периода течения раневого процесса наблюдалась у экспериментальных животных с применением двухэтапной (с интервалом 7 суток) локальной трансплантации ММСК ЖТ по сравнению с таковыми в контрольной группе (спонтанная регенерация) и при использовании фибробластов кожи крысы.

3. Анализ результатов экспериментальных исследований *in vivo* при локальном применении клеточных технологий продемонстрировал, что течение процессов заживления



в экспериментальных ранах зависело от условий трансплантации (применяемые клеточные биоматериалы) и от этапности введения клеток. При кратном введении клеточного трансплантата наблюдались более высокие показатели (по сравнению с контролем) скорости заживления раневых дефектов ($v_{\text{заж.}}$, $v_{\text{эпит.}}$) как на протяжении первых 10 суток, так и на 14 сутки эксперимента с явной тенденцией к увеличению этих значений после проведения повторной трансплантации клеток на 10 сутки эксперимента. При нормальном течении заживления суточное уменьшение площади раны, как правило, не превышает 4%/сутки. Проведенные исследования выявили, что скорость уменьшения площадей раневых дефектов ($v_{\text{заж.}}$) в основных группах с 7 по 14 сутки колебалась от 4,2 до 5,0%/сутки после локальной трансплантации ФКК и от 5,5 до 6,8%/сутки при использовании ММСК ЖТ.

4. Использование мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани и фибробластов кожи является перспективным методом лечения для восстановления целостности кожных покровов и может рассматриваться как новый подход к лечению пациентов с хроническими ранами различной этиологии, в том числе с трофическими язвами и длительно незаживающими ранами, в реконструктивной хирургии.

Литература

1. Абаев, Ю. К. Биология заживления острой и хронической раны / Ю.К. Абаев // Медицинские новости. — 2003. — № 6. — С. 3—10.

2. Бабаева А. Г. Регенерация — факты и перспективы / А. Г. Бабаева. — Москва: РАМН, 2009. — 334 с.

3. Баранов, Е. В. Использование мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при лечении раневых дефектов кожных покровов в эксперименте / Е. В. Баранов [и др.], С. И. Третьяк, М. К. Недзьведь, И. Б. Василевич, Е. С. Лобанок, И. Д. Волотовский // Весті НАН Беларусі. Сер. біал. навук. — 2014. — № 1. — С. 60—67.

4. 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.

5. Блинова М. И. Использование культивируемых клеток кожи человека для лечения трофических язв / М. И. Блинова [и др.]. // Информационный бюллетень Клеточные культуры. — 2006. — Выпуск 21. — С. 33—44.

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. Современные подходы к лечению венозных трофических язв. / И. Г. Учкин, А. Г. Багдасарян // Русский медицинский журнал (РМЖ). — 2013. — Т. 21, N 15(Хирургия). — С. 810—814.

9. Ehrlich, H. P. Understanding experimental biology of skin equivalent: from laboratory to clinical use in patients with burns and chronic wounds / H. P. Ehrlich // Am J Surg. — 2004 May. — Vol. 187. — P. 29—33.

10. Zuk, P. A. Multilineage cell from human adipose tissue: Implications for cttl-basedtheraies / P. A. Zuk, Zhu M., Mizuno H. / Tissue Eng. — 2001. — Vol. 7. — P. 211—228.

Поступила 15.03.2017 г.

