

А. Сахаб Хайдар¹, С.И. Третьяк¹, Е.В. Баранов¹, М. К. Недзьведь¹,
Э.А. Надьиров³, Е.С. Лобанок², И.Б. Василевич², В.А. Шпудейко¹

КЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ИНФИЦИРОВАННЫХ РАН У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»¹,
«Институт биофизики и клеточной инженерии НАН РБ»²,
ГУ «РНПЦ радиационной медицины и экологии человека»³

В статье представлены результаты клинико-экспериментальных наблюдений за течением раневого процесса у лабораторных животных с моделированной инфицированной раной, в лечении которых использовались как традиционные методы лечения, так и трансплантация аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК), полученных из жировой ткани (ЖТ). Установлено, что применение МСК приводит к купированию воспалительного процесса в более короткие промежутки времени и ускоряет процесс заживления кожного дефекта с восстановлением кожных покровов со своими дериватами по сравнению с традиционными методами лечения.
Ключевые слова: инфицированные раны, мезенхимальные стволовые клетки, жировая ткань.

A. Sahab Haidar, S.I. Tretiak, E.V. Baranov, E.S. Lobanok, I.B. Vasilevich, V.A. Shpudeiko
**CLINICAL EVALUATION OF AUTOLOGOUS MESENCHYMAL STEM CELLS FROM
ADIPOSE TISSUE IN THE COMPLEX TREATMENT OF INFECTED WOUNDS HAVE
EKSPREIMENTALNYH ANIMALS**

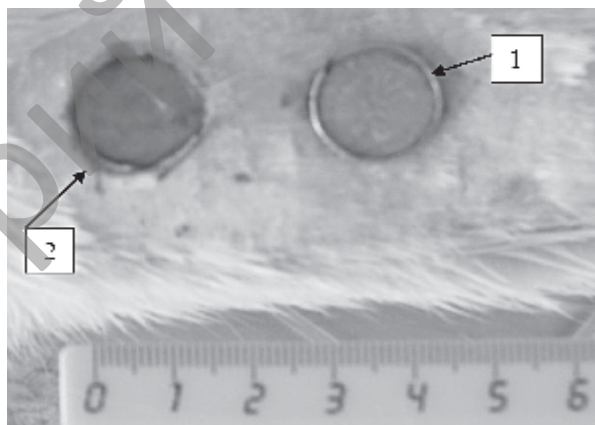
The results of clinical – experimental observations of the wound process in laboratory animals infected with a simulated wound, in which treatment was used as the traditional methods of treatment, and transplantation of autologous mesenchymal stem cells (MSCs) derived from adipose tissue. It is established that the application of MSCs leads to reduction of the inflammatory process in a shorter period of time and greatly speeds up the healing process of the skin defect with a full restoration of the skin compared to conventional treatments.

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

Пациенты с инфицированными ранами и дефектами мягких тканей различной этиологии (как острой, так и хронической), составляют значимую часть контингента отделений гнойной хирургии [1]. Косметические и функциональные последствия этих заболеваний нередко настолько тяжелы и необратимы, что проблема адекватного закрытия раневых дефектов в возможно более ранние сроки постоянно привлекает внимание хирургов [2]. Все это определило достаточно широкое распространение в регенеративной хирургии восстановительных кожно-пластических операций [10]. На сегодняшний день одним из наиболее распространенных способов закрытия кожных дефектов является кожная пластика, в частности аутодермопластика. Выполнение данной операции в условиях инфекции часто приводит к неудовлетворительным результатам. В раннем послеоперационном периоде при этом нередки нагноение и отторжение аутодермотрансплантата [4]. В отдаленные же сроки результаты лечения при таком способе пластики могут быть связаны с косметическими и функциональными дефектами, такими, как выраженные рубцовые изменения трансплантатов, их изъязвление, рубцовые контрактуры в области суставов и т.д. [2]. Для лечения глубоких ожогов, хронических ран и обширных повреждений постоянно разрабатываются новые покрытия, заменяющие кожу либо ускоряющие эпителизацию аутотрансплантированных лоскутов. Во многих случаях хорошие результаты дает применение методов клеточной терапии. Первые сообщения о культивировании клеток кожи появились еще в 40-х годах. В 70-х годах было предложено использовать культивируемые клетки кожи (кератиноциты) при лечении ожогов (Rheinwald, Green 1975). Уже на первых этапах клинического применения трансплантатов из культивированных аутокератиноцитов определился ряд недостатков, препятствующих их широкому клиническому использованию: нет возможности создать банк клеток; сроки, необходимые для изготовления достаточного по площади трансплантата, велики и составляют 3-4 недели (Navsaria et al. 1995); длительные сроки получения трансплантатов увеличивают риск развития инфекционных осложнений хронической раны и удлиняют время пребывания пациентов в стационаре; аутокератиноциты практически не приживаются при трансплантации на гранулирующие ожоговые раны (De Luca et al. 1989; Туманов и др. 1989); высока стоимость специальных ростовых сред и биологически активных стимуляторов роста кератиноцитов. На современном этапе для лечения ран и раневой инфекции предлагается большое количество методов и способов локальной терапии (физические, химические и биологические), в том числе и с применением современных раневых покрытий [5, 6, 7]. В пластической хирургии развивается направление по производству различных «кожных эквивалентов», включающих как культивированные клетки, так и дермальный эквивалент, состоящий из гликозаминогликанов, коллагена и других носителей. Современные «живые эквиваленты кожи» представляют собой тканеинженерные конструкции на основе кератиноцитов, фибробластов и коллагеновой матрицы [8, 9]. Наиболее перспективным направлением в восстановлении дефектов кожных покровов является использование МСК. Однако проблема снижения сроков заживления ран остается до конца нерешенной. Все это послужило основанием для проведения исследования, целью которого явилась разработка эффективной технологии комплексного лечения инфицированных раневых дефектов.

Цель. Оценить эффективность трансплантации аутологических мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани в комплексном лечении экспериментальных инфицированных ран у лабораторных животных.

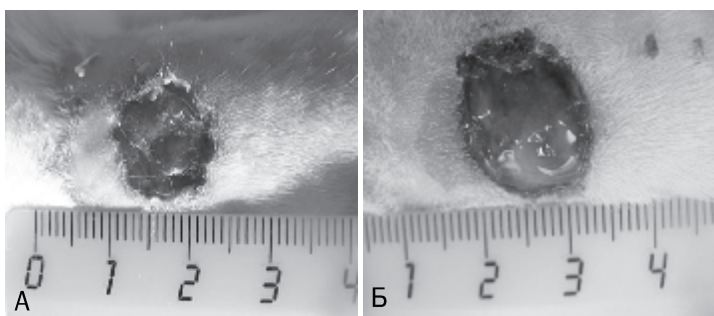
Материалы и методы. Для проведения экспериментальных исследований были использованы взрослые белые крысы линии Vistar весом 160–200 гр. При работе с крысами руководствовались «Положением о порядке использования экспериментальных животных в научно-исследовательских работах и учебном процессе в Белорусском государственном медицинском университете» (утвержденном на заседании учёного совета БГМУ в 2006г.) [3]. У экспериментальных животных выполняли моделирование округлой раны на спине по отработанной методике. С этой целью предварительно сбрасывали шерсть на спине, а затем иссекали кожно-фасциальный лоскут в виде круга диаметром 1,5 см (площадь раны около 1,77 см²). Для получения одинаковых по размеру дефектов использовали эталон, изготовленный из металла. После обработки антисептиками, эталон прикладывали к операционному полю и маркером по краям круга наносили ориентиры, по которым в дальнейшем делали насечки кожи скальпелем. Выкраивали лоскуты указанного размера и формы, состоящие из кожи, подкожной клетчатки и фасции до мышц, с использованием глазных ножниц и пинцета (рисунок 1).



1) Металлический эталон; 2) Вид экспериментальной раны
Рисунок 1 – Методика моделирование экспериментальной раны

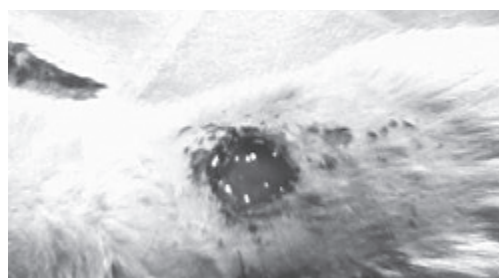
Затем дно и края раны инфицировали путем инъекций 24-часовой монокультуры эталонных штаммов бактерий (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 American Type Culture Collection, USA), суспензированной в 0,9% растворе натрия хлорида до 1×10^9 КОЕ/мл (концентрация определялась по стандарту мутности). Объем вводимой взвеси микробов составлял не более 2,0 мл. Гнойную рану получали спустя 2 суток от начала моделирования. Перед выведением животных из эксперимента струп снимали и осматривали рану.

Все животные были разделены на две группы: контрольную ($n=25$) и основную ($n=25$). В контрольной группе, начиная со вторых суток от начала эксперимента, ежедневно для локальной санации раны применялись стандартные антисептики (перекись водорода 3%, хлоргексидин 0,05%). В основной группе экспериментальных животных лечение дополняли применением клеточной терапии с использованием аутологических МСК из ЖТ крыс на 2 сутки от начала эксперимента. В этой группе после санации инфицированной раны, в асептических условиях выполняли трансплантацию МСК из ЖТ методом локальной трансплантации в околораневую область. Клеточный биоматериал доставляли путём инъекции в коли-



А – вид раны со струпом, Б – вид раны без струпа

Рисунок 2 – Макроскопическая характеристика кожной раны животных на 2-е сутки после инфицирования в контрольной и основной группах



Внешний вид раны: гиперемия и отек вокруг раны, шерсть отсутствует, после снятия струпа – серозно-гнойный экссудат

Рисунок 3 – Кожная рана животных контрольной группы на 3 сутки

честве 2×10^6 клеток/мл. Ежедневно проводили наблюдение за состоянием ран животных с динамической фотосъемкой. Как в основной, так и в контрольной группах, животных выводили из эксперимента на 3, 5, 7, 10, 14 и 30-е сутки. В те же сроки проводили оценку течения раневого процесса по разработанному алгоритму: внешний вид струпа, ткани под струпом (их тип, время появления), характер и количество отделяемого экссудата, состояние краев раны, срок очищения раны от гнойно-некротических масс, размер раны, состояние окружающих тканей и наличие или отсутствие шерсти вокруг раны. Кроме того, оценивали результаты бактериологических посевов и количество лейкоцитов в крови животных. Вместе с этим проводили компьютерную планиметрию, где определяли площадь раневого дефекта, скорость эпителизации и процентное уменьшение размера раны (динамика заживления).

Результаты. На 2-е сутки после инфицирования, раны в сравнимых группах были однотипны и характеризовались наличием геморрагического струпа с умеренным количеством геморрагически-гнойного экссудата. Непосредственно вокруг ран отмечался воспалительный инфильтрат, покраснение, а также отек окружающих тканей, который распространялся до 1,5 – 3 см по периметру (рисунок 2).

На 3-е сутки от начала лечения в контрольной и в основной группе экспериментальных животных сохранялись признаки воспаления как самой раны, так и окружающей ткани. В контрольной группе эти изменения были выражены в большей степени: отмечалось формирование влажного струпа неправильной формы с гладкой поверхностью. Под струпом внешний вид раневого ложа был красным, выявлялась кровоточивость, отмечалась выраженная отечность окружающей тканей, некроз дна и краев раны с обильным наложением фибрина и выделением мутного гнояного экссудата с неприятным запахом (рисунок 3).

В основной группе струп был сухой, бугристый, черный, правильной формы. Дно раны в этой группе было так же

красное, с незначительным наложением фибрина, экссудат носил серозно-геморрагический характер (рисунок 4).

В контрольной группе площадь раны составила $102,1 \pm 11,2$ мм², а в основной группе площадь раневой поверхности была в пределах – $86,4 \pm 8,2$ мм² ($p < 0,05$).

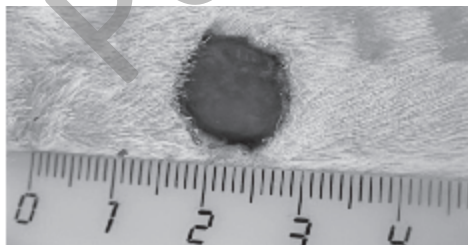
В этом сроке наблюдения в контрольной группе количество микроорганизмов в ране составило $1,1 (0,9 \div 1,3) \times 10^6$ КОЕ/мл, а в основной – $8,5 (6,5 \div 9,5) \times 10^5$ КОЕ/мл.

При наблюдении на 5 сутки от начала лечения в контрольной группе признаки воспаления лишь несколько уменьшились. Струп в данной группе был влажным, толстым слоем лежал на поверхности раны, в дне раны отмечались гнойно-некротические изменения, наложения фибрина и серозно-гнояное отделяемое с неприятным запахом. В то же время, в основной группе признаки воспаления практически не отмечались, струп был тоньше, черного цвета, сухой. В дне раны обнаруживались лишь небольшие островки налета фибрина и скудный серозный экссудат, уже отмечалось разрастание грануляционной ткани розового цвета, а так же выявлялась краевая эпителизация. В эти же сроки наблюдения у животных данной группы начала появляться шерсть, чего не было в контрольной группе.

В контрольной группе площадь раневого дефекта составила – $63,6 \pm 10,1$ мм², а в основной – $23,6 \pm 8,1$ мм² ($p < 0,05$).

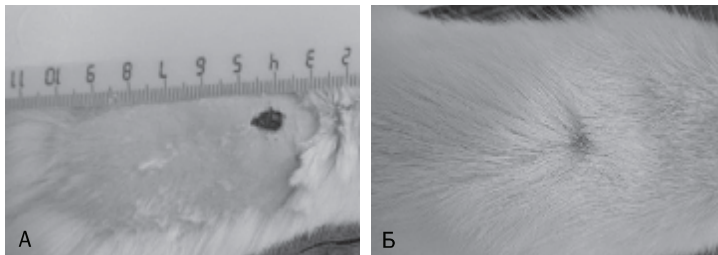
Отмечались также и различия при проведении анализа обсемененности ран. Так, на 5 сутки в контрольной группе этот показатель составил – $4,0 (1,0 \div 5,0) \times 10^2$ КОЕ/мл, в то время как в основной группе микроорганизмы в ране уже не определялись.

На 10 сутки от начала лечения в обеих группах воспаления окружающих тканей не выявлялось. Струп в контрольной группе был толстым, плотно связанным с поверхностью раны и имел неправильную форму. В этой группе рана постепенно очищалась от гнойно-некротических масс, продолжа-



Внешний вид раны: отек вокруг раны, появление шерсти, под струпом незначительное наложение фибрина

Рисунок 4 – Кожная рана животных основной группы на 3-е сутки



А) визуальное наблюдение кожной раны в контрольной группе
Б) визуальное наблюдение кожной раны в основной группе.

Рисунок 5 – Макроскопическая характеристика кожной раны животных контрольной и основной группы на 14-е сутки эксперимента

лось образование грануляционной ткани и краевой эпителизации. В основной группе животных наблюдалась густая щетина вокруг раны, струп был представлен тонкой сухой корочкой, легко отслаивающийся от поверхности раны. Ложе раны при этом имело розовый цвет, наблюдался интенсивный процесс эпителизации. Рост шерсти в контрольной группе по-прежнему был не выражен. На 10 сутки в контрольной группе площадь дефекта раны определялась в пределах $27,5 \pm 5,8$ мм², в то время как в основной группе отмечалось значительное уменьшение площади раневой поверхности до $9,4 \pm 2,9$ мм² ($p < 0,05$). В контрольной группе отсутствие микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*) в ране наблюдалась лишь к 10 суткам. При дальнейшей оценке клинического течения раневого процесса у экспериментальных животных было отмечено, что на 14 сутки в контрольной группе рост шерсти по-прежнему был низким, струп сохранял плотную консистенцию, неправильную форму и гладкую

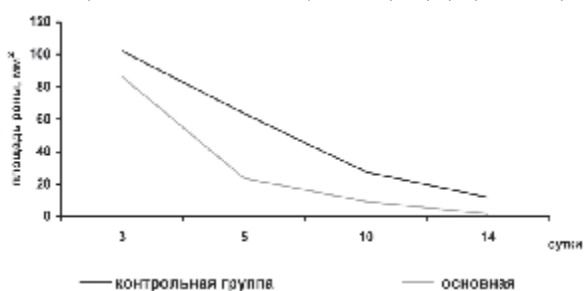


Рисунок 6 – Динамика изменения площади раневой поверхности в контрольной и основной группах у экспериментальных животных в разные сроки наблюдения

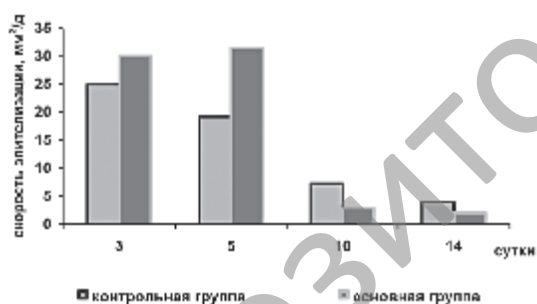


Рисунок 7 – Скорость эпителизации в контрольной и основной группах у экспериментальных животных в разные сроки наблюдения

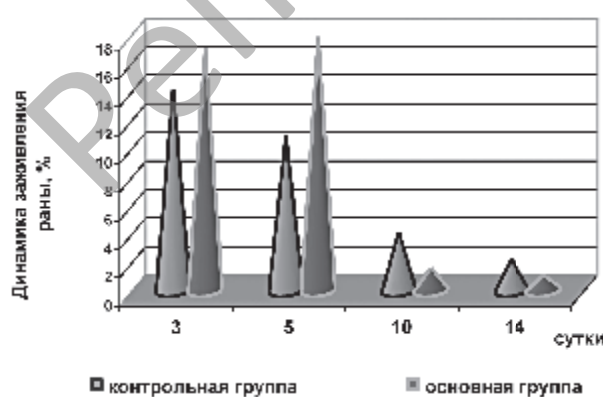


Рисунок 8 – Динамика заживления раны в контрольной и основной группах у экспериментальных животных на разных сроках наблюдения

поверхность, но уже легко отделялся от подлежащих тканей. В основной группе струп в большинстве случаев отсутствовал. Ложе раны в контрольной группе имело белесовато-розовый цвет, было полностью заполнено грануляциями, с нарастанием эпителия с краев раны. Площадь раневого дефекта продолжала уменьшаться (Рис.5а). В основной группе рана была практически полностью эпителизована, площадь раневого дефекта была незначительной. Густая шерсть полностью покрывала окружающие рану ткани, из-за чего сам дефект практически не определялся (Рис.5б).

На 14 сутки в контрольной группе площадь раневого дефекта составила $11,8 \pm 3,1$ мм², а в основной группе рана уже практически отсутствовала и данный показатель составил $1,6 \pm 0,5$ мм² ($p < 0,05$).

Таким образом, при проведении исследовании было выявлено, что в сравнимых группах отмечалось достоверное отличие, как в изменении площади раны, так и в скорости эпителизации и динамике заживления раневого дефекта (рисунок 6, 7, 8) соответственно.

Таким образом, при клиническо-экспериментальной оценке течения раневого процесса в сравниваемых группах животных было определено, что комплексное лечение инфицированных ран с применением локальной трансплантации аутологичных мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани способствует купированию воспалительного процесса в более короткие промежутки времени (на 5-7 сутки), по сравнению с группой, где применялась традиционная терапия (на 10-14 сутки). Локальная трансплантация МСК способствует более быстрому заживлению раны: скорость эпителизации при данном способе лечения на 5 сутки была в 1,6 раз больше, чем при применении традиционных методов лечения. Полученные результаты могут служить основанием к проведению дальнейших исследований и разработок с целью внедрения в клиническую практику клеточных технологий для лечения пациентов с раневыми дефектами различной этиологии.

Литература

1. Гостищев, В.К. Инфекции в хирургии: Руководство для врачей / В.К. Гостищев. – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2007. – 768 с.
2. Ерюхин, И.А. Хирургическая инфекция: новый уровень познания и новые проблемы / И.А. Ерюхин // Инфекции в хирургии. – 2003. – №1. – С. 2-7.
3. Положение о порядке использования экспериментальных животных в научно-исследовательских работах и учебном процессе в Белорусском государственном медицинском университете / Минск: Изд-во БГМУ, 2006. – 6 с.
4. Стручков, В.И. Гнойная рана / В.И. Стручков, А.В. Григорян, В.К. Гостищев. – М.: Медицина, 1975. – 311 с.
5. Armstrong, D. Infectious diseases / D. Armstrong, J. Cohen. – London: Mosby, 1999. – 76 p.
6. A material decoy of biological media based on chitosan physical hydrogels: application to cartilage tissue engineering / Montembault [et al.] // Biochimie. – 2006. – Vol. 88. – P. 55.
7. Howard, R.J. Surgical infection disease / R.J. Howard, R.R. Simms. – Gainesville, Pitburg: Appleton and Lange, 1995. – 277 P.
8. Kremer, M. Plastisch-chirurgische Therapie beckennaher Dekubitalulzera / M. Kremer, A. Berger // Der Chirurg. – №6. – 1999. – s.726-740.
9. Ladet, S. Multi-membrane hydrogels / S. Ladet, L. David, A. Domard // Nature. – 2008. – Vol. 452. – P. 76.
10. Peel, L.A. Transplantation of tissues / L.A. Peel. – Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1995. – 421 p.

Поступила 3.06.2013 г.