

УДК 616-001.17-08:615.46:574.6

Г.С. СТАБАЕВА, В.П. РУСАНОВ, К.С. БИМЕНОВ, А. АЙТЫМБЕТОВА,
А. НУРАЛИЕВА, Н.Ж. ТЕЛЕШЕВА

Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, г. Алматы

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ
ПРИМЕНЕНИЯ РАНЕВЫХ БИОПОКРЫТИЙ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАН**

Стабаева Г.С.

Проблема лечения ожоговых и хирургических ран остается весьма актуальной для современной комбустиологии и хирургии.

Цель исследования. Определение эффективности применения раневых покрытий на основе аллогенных культивируемых фибробластов, кератиноцитов и мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани, иммобилизованных на коллагеновом матриксе для лечения ран.

Материал и методы. Дизайн исследования: рандомизированные контролируемые клинические исследования на животной модели асептической полнослойной раны. В эксперименте использовали кроликов массой 2,5-3 кг, самцы, в количестве 24 голов. Животные в зависимости от метода были разделены на 4 группы: группа 1 – лечение с применением коллагеновых покрытий с культивируемыми фибробластами кролика (n=6); группа 2 – лечение с применением коллагеновых покрытий с культивируемыми клетками кожи кролика (n=6); группа 3 – лечение с применением коллагеновых покрытий с культивируемыми клетками жировой ткани (ММСК ЖТ) кролика (n=6); группа 4 – лечение с применением мази левомиколь (контроль, n=6).

Результаты и обсуждение. Показали, что разработанные раневые биопокрытия с культивируемыми фибробластами и мезенхимальными стромальными клетками жировой ткани обладают наиболее выраженным ранозаживляющим и противовоспалительным действием.

Вывод. Наиболее перспективным являются раневые покрытия с культивируемыми фибробластами и мезенхимальными стромальными клетками жировой ткани.

Ключевые слова: полнослойная рана, раневые покрытия, фибробласты, кератиноциты, мезенхимальные стромальные клетки.

Проблема лечения ожоговых и хирургических ран остается весьма актуальной для современной комбустиологии и хирургии [1, 2].

Разработка технологии тканевого эквивалента кожи на основе культуры клеток аллогенных или аутологичных фибробластов, кератиноцитов или мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани, иммобилизованных на биополимерном матриксе, является наиболее перспективным направлением при лечении ран различного генеза [3, 4]. Бионженерные заменители кожи не только должны обеспечить быстрое и надежное покрытие кожного дефекта, но и быть легко применимы в обычных условиях использования, не вызывая воспаление или отторжение, быть нетоксичными и не иммуногенными [5-8].

Цель данной работы – определение эффективности применения раневых покрытий на основе аллогенных культивируемых фибробластов, кератиноцитов и мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани, иммобилизованных на коллагеновом матриксе для лечения ран.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для приготовления раневых покрытий использовали следующие материалы: культура клеток фибробластов кролика; культура мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани (ММСК ЖТ) кролика; культура клеток кожи кролика; коллагеновый матрикс (коллаген I типа), высушенный

в чашках для культивирования клеток; питательная среда Игла MEM (альфа) (Hyclone); Fetal Bovine Serum (Biowest); питательная среда Mesencult (Stem Cell Technologies Inc); сбалансированный солевой раствор Хенкса.

Дизайн исследования: рандомизированные контролируемые клинические исследования на животной модели асептической полнослойной раны. В эксперименте использовали кроликов массой 2,5-3 кг, самцы, в количестве 24 голов. Животные в зависимости от метода были разделены на 4 группы: группа 1 – лечение с применением коллагеновых покрытий с культивируемыми фибробластами кролика (n=6); группа 2 – лечение с применением коллагеновых покрытий с культивируемыми клетками кожи кролика (n=6); группа 3 – лечение с применением коллагеновых покрытий с культивируемыми клетками жировой ткани (ММСК ЖТ) кролика (n=6); группа 4 – лечение с применением мази левомиколь (контроль, n=6).

Кроликам под обезболиванием на пояснично-крестцовом отделе спины выбривали шерсть диаметром 3 см. После антисептической обработки вырезали кожу диаметром 2 см и однократно накладывали раневые покрытия с клетками (испытываемые группы). В контрольной группе применяли мазь левомиколь 3 раза в день (1 г мази содержит активные вещества хлорамфеникол – 7,5 мг и метилурацил – 40 мг). На 4, 8 и 12 сутки опыта производили замеры диаметра раны в нескольких точках. На 12-е сутки эксперимента животным

Контакты: Стабаева Гульсум Сейдиловна, канд. мед. наук, доцент кафедры хирургической стоматологии КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова, г. Алматы, Казахстан. Тел. + 7 777 232 09 91, e-mail: stabayeva_gulsum@mail.ru

Contacts: Gulsum Seidylovna Stabayeva, MD, Docent of Department of surgical stomatology of KazNMU n.a. S.D. Asfendiyarov, Almaty c. Ph.: + 7 777 232 09 91, e-mail: stabayeva_gulsum@mail.ru

под местным наркозом удаляли участки с эпителизированной раны в виде треугольника от периферии до центра.

Кусочки ткани фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Далее образцы обезжизивали по стандартной методике в автоматическом тканевом процессоре фирмы Leica TP 1020 и заливали парафином. Парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм нарезали на санном микротоме Leica SM 2000R, окрашивали гематоксилином и эозином. Просматривали полученные препараты на световом микроскопе Leica DM 4000B с цифровой камерой Leica DFC 320.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Площадь раны рассчитывали по формуле: $S = 2\pi r^2$, где S – площадь раневой поверхности; π – 3,14; r – радиус круглой раны (табл. 1).

Как видно из таблицы 1, наилучшие результаты лечения были получены в группах с применением раневых покрытий с культивируемыми фибробластами и ММСК ЖТ. Это, видимо, связано с тем, что фибробласты и ММСК синтезируют ростовые факторы, которые способствуют ускоренной регенерации кожи. Худший результат лечения был с применением раневых покрытий с культивируемыми кератиноцитами, что, видимо, объясняется отсутствием в покрытии фибробластов, в связи с этим снижением регенеративного потенциала.

Морфологический анализ

В первой группе животных, где лечение ран проводили с применением коллагеновых покрытий с культивируемыми фибробластами, на гистологических препаратах отмечаются покрытие эпидермиса и частичное сращивание поверхностного рогового слоя. Пролиферация клеток базального эпителия идет с формированием акантотических зон, отмечается сохранение придатков кожи, в толще дермы наблюдается пролиферация миофибробластов (рис. 1).

На протяжении $\frac{3}{4}$ части поверхности раны определяется коллагеновое покрытие с фибробластами человека. Покрытие представлено пленкой розового цвета, микроскопи-

ческий состав определить не представляется возможным. Под пленкой определяется нижняя часть эпидермиса в виде щиповатого и базального слоев эпидермиса. Под базальным слоем на всем протяжении определяется дерма в виде сосочковой и сетчатой зоны с мелкой капиллярной сетью, особенно выраженной в сосочковой зоне, и умеренной воспалительной инфильтрацией. На протяжении $\frac{1}{4}$ поверхности обнаруживается эпидермис с сохраненными слоями: базальным, зернистым и щиповатым. Под эпидермисом в дерме выявляется множество новообразованных сосудов (рис. 2).

Во второй группе экспериментальных животных лечение ран проводили с применением коллагеновых покрытий с культивируемыми клетками кожи человека. На гистологических препаратах в одних участках обнаруживаются атрофированные зоны эпидермиса, чередующиеся с участками пролиферации базального слоя и формированием акантотических выростов вглубь дермы (рис. 3). У других животных с поверхности кожи на протяжении $\frac{1}{4}$ обнаруживается покрытие в виде плотной розовой пленки, под которой определяется собственно кожа в виде дермы. Она представлена мышечными элементами, соединительнотканными волокнами и небольшим количеством мелких сосудов. На протяжении $\frac{3}{4}$ коллагеновое покрытие с культивируемыми клетками кожи человека оторвано от ткани кожи и между кожным покровом и пленкой обнаруживаются поврежденный эпидермис, клетки воспалительного инфильтрата и нити фибрина розового цвета. На поверхности кожи также обнаруживаются поврежденные слои нижней части эпидермиса и «как бы» обнаженная собственно кожа. Кожа представлена собственно кожей (дермой), соединительнотканными волокнами и мелкой сосудистой сетью и фиброзной тканью (рис. 4).

Таблица 1 – Определение площади раневой поверхности в динамике заживления

Группы животных	Продолжительность наблюдения (сутки)			
	0	4	8	12
РП с фибробластами	6,28 см ²	3,23±0,26 см ²	2,12 ±0,33 см ²	0,60±0,12 см ²
РП с кератиноцитами	6,28 см ²	5,30±0,25 см ²	4,15±0,22 см ²	3,20±0,55 см ²
РП с ММСК ЖТ	6,28 см ²	3,45±0,20 см ²	2,04±0,43 см ²	0,65±0,22 см ²
Мазь левомиколь (контроль)	6,28 см ²	5,20±0,20 см ²	4,10±0,25 см ²	2,05±0,23 см ²
РП – раневые покрытия				

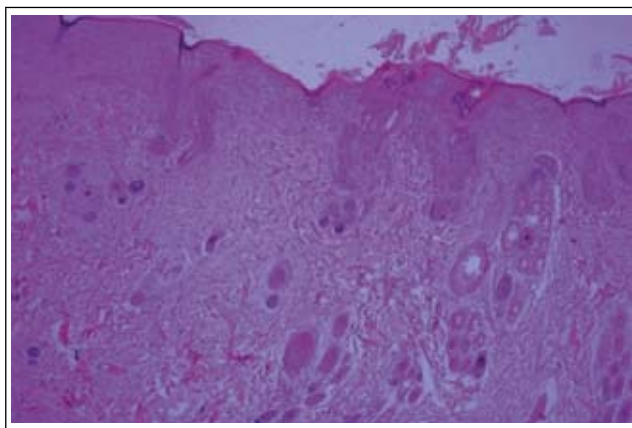


Рисунок 1 – Группа 1. Окраска гематоксилин – эозином, х50

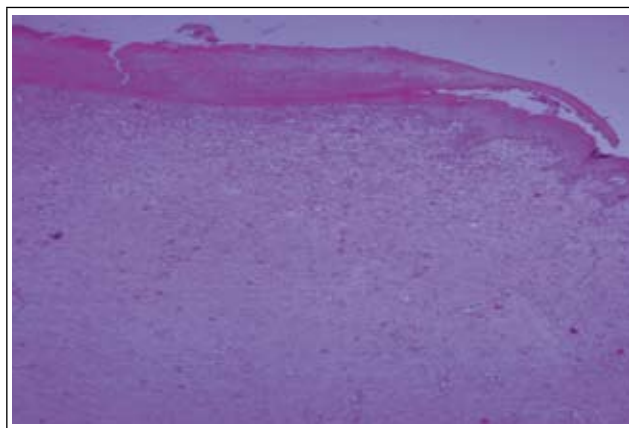


Рисунок 2 – Группа 1. Окраска гематоксилин – эозином, х50

В третьей группе животных, где лечение ран проводили с применением коллагеновых покрытий с ММСК ЖТ, эпидермис представлен в виде рогового, блестящего, зернистого, шиповатого и базального слоев и собственно кожа в виде сосочкового и сетчатого слоев. В ткани кожи отмечается чередование истончения зон эпидермиса с участками выраженной пролиферацией клеток базального слоя с формированием акантотических выростов и внедрением их в ткань дермы. В толще эпидермиса видны единичные новообразованные сосуды и единичные кисты (рис. 5). В дерме множество новообразованных сосудов с молодой соединительной тканью (грануляционная ткань) (рис. 6).

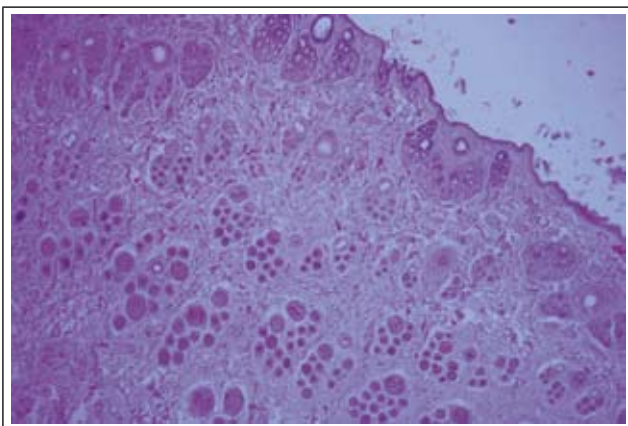


Рисунок 3 – Группа 2. Окраска гематоксилин – эозином, x100

В четвертой контрольной группе животных лечение ран проводили с применением мази левомиколь. На поверхности эпидермиса отмечаются незначительные участки рогового слоя с зонами отторжения. Определяется пролиферация базального слоя, в толще эпидермиса обнаруживаются новообразованные сосуды. В толще дермы определяются придатки кожи и воспалительная инфильтрация вокруг сосудов и по ходу соединительной ткани (рис. 7). Встречаются также в данной группе зоны повреждения эпидермиса в виде бесструктурных масс розового цвета и частичного отслоения эпидермиса, под ним в толще дермы воспалительная инфильтрация (рис. 8).

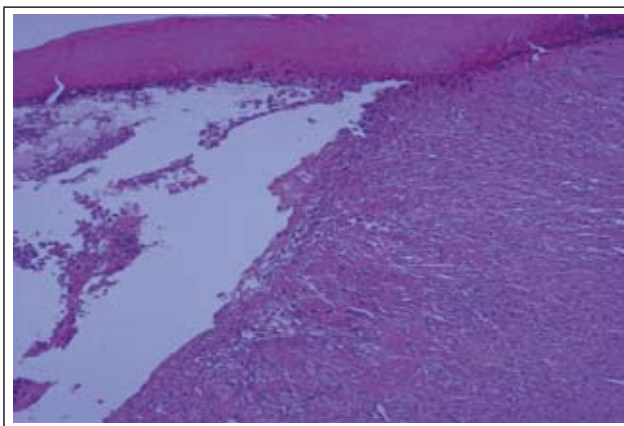


Рисунок 4 – Группа 2. Окраска гематоксилин – эозином, x100

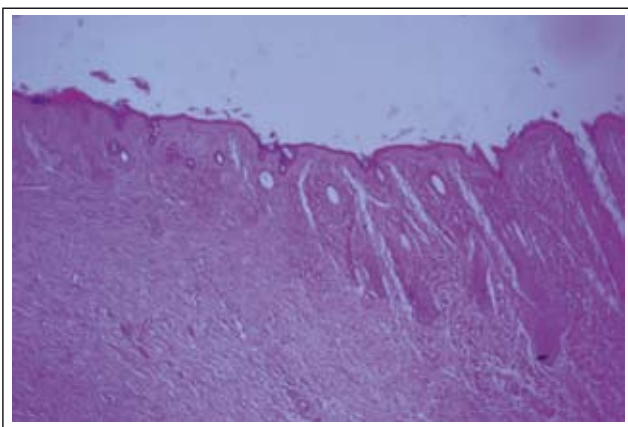


Рисунок 5 – Группа 3. Окраска гематоксилин – эозином, x50

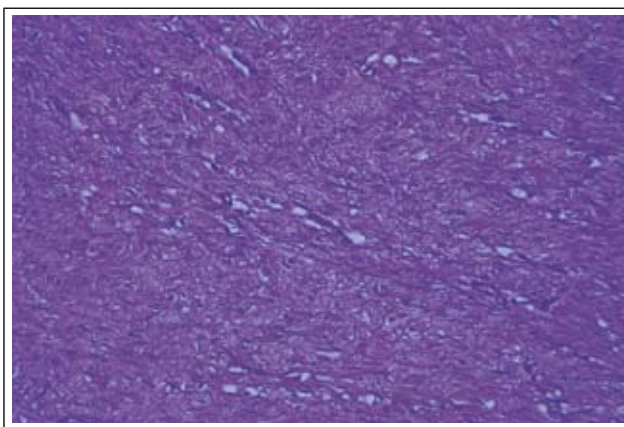


Рисунок 6 – Группа 3. Окраска гематоксилин – эозином, x200

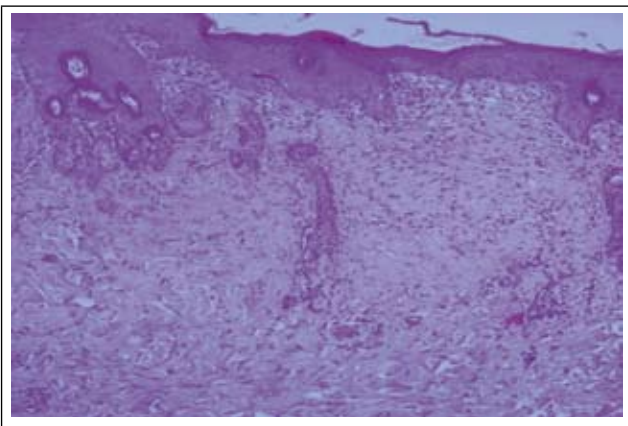


Рисунок 7 – Группа 4. Окраска гематоксилин – эозином, x100

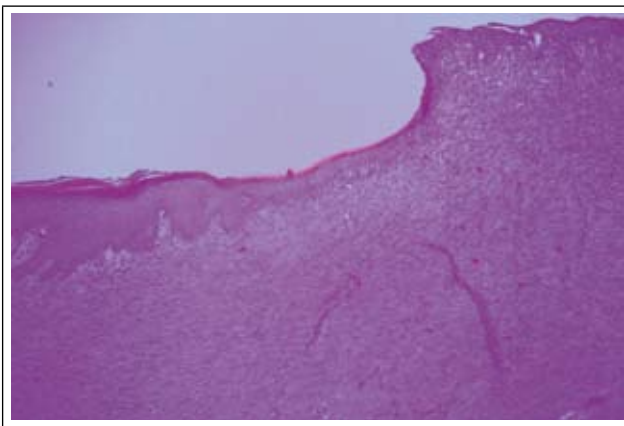


Рисунок 8 – Группа 4. Окраска гематоксилин – эозином, x50

ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из морфологического описания гистологических препаратов, наилучшие результаты лечения были получены во второй и четвертой группах экспериментальных животных с применением раневых покрытий на основе культивируемых фибробластов и ММСК ЖТ кролика. Это объясняется высоким регенеративным потенциалом фибробластов и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Таким образом, наиболее перспективным для лечения ран является применение раневых покрытий с культивируемыми фибробластами. Выделение и культивирование данных клеток технологически несложно и не так дорого, как выделение и культивирование кератиноцитов и ММСК, так как не требуются дорогостоящие питательные среды и саплененты.

ВЫВОДЫ

1. Наилучшие результаты наблюдаются у экспериментальных животных первой и четвертой групп, где проводили лечение с применением коллагеновых покрытий с культивируемыми фибробластами и мезенхимальными стромальными клетками жировой ткани (ММСК ПЖК).

2. Наиболее перспективным для лечения ран является применение раневых покрытий с культивируемыми фибробластами, как наиболее дешевый и технологически выполнимый вариант

3. Таким образом, преимуществами применения разработанного раневого биопокрытия являются: создание надежного контролируемого барьера, препятствующего инфицированию раневой поверхности; создание оптимальной микросреды для регенерации раны; способность рассасываться по мере заживления тканей; отсутствие или короткий болевой период; менее выраженный послеоперационный отек; сокращение сроков заживления ран; предупреждение развития воспалительных осложнений.

Прозрачность исследования

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за статью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ВОЗ. Шестидесят пятая сессия. 26 апреля 2012 г. ВОЗ. Ожоги. Информационный бюллетень №365. Май 2012 г. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/ru/index.html>
- Шаповалов С.Г. Современные раневые покрытия в комбустиологии // ФАРМиндекс-Практик. – 2011. – №8. – С. 38-46
- Dieckmann C., Renner R., Milkova L., Simon J.C. Regenerative medicine in dermatology: biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond // *Experimental Dermatology*. – 2010. – No. 19. – P. 697–706
- Chen F.M., Zhao Y.M., Jin Y., Shi S. Prospects for

translational regenerative medicine // *Biotechnology Advances*. – 2012. – No.30. – P. 658-672

5 Clark R.A., Ghosh K., Tonnesen M.G. Tissue engineering for cutaneous wounds // *J Invest Dermatol*. – 2007. – No. 127. – P. 1018–1029

6 Ikada Y. Challenges in tissue engineering // *J R Soc Interface*. – 2006. – No. 3. – P. 589–601

7 Metcalfe A.D., Ferguson M.W. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration // *J R Soc Interface*. – 2007. – No. 4. – P. 413–437

8 Nolte S.V., Xu W., Rennekampff H.O., Rodemann H.P. Diversity of fibroblasts – a review on implications for skin tissue engineering // *Cells Tissues Organs*. – 2008. – Vol. 187(3). – P. 165-176

REFERENCES

- ВОЗ. Шестидесят пятая сессия. 26 апреля 2012 г. ВОЗ. Ожоги. Информационный бюллетень № 365. Май 2012 г. [WHO. Sixty-fifth session. April 26, 2012 WHO. Burns. Fact sheet No. 365. May 2012]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/ru/index.html>
- Shapovalov S.G. Modern wound dressings in Combustiology. *FARMindeks-Praktik = PAR Mindeks Practitioner*. 2011;8:38-46 (In Russ.)
- Dieckmann C, Renner R, Milkova L, Simon J.C. Regenerative medicine in dermatology: biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond. *Experimental Dermatology*. 2010;19:697–706
- Chen FM, Zhao YM, Jin Y, Shi S. Prospects for translational regenerative medicine. *Biotechnology Advances*. 2012;30:658-72
- Clark RA, Ghosh K, Tonnesen MG. Tissue engineering for cutaneous wounds. *J Invest Dermatol*. 2007;127:1018-29
- Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface*. 2006;3:589–601
- Metcalfe AD, Ferguson MW. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J R Soc Interface*. 2007;4:413-37
- Nolte SV, Xu W, Rennekampff HO, Rodemann HP. Diversity of fibroblasts – a review on implications for skin tissue engineering. *Cells Tissues Organs*. 2008;187(3):165-76

Т Ы Ж Ы Р Ы М

Г.С. СТАБАЕВА, В.П. РУСАНОВ, К.С. БИМЕНОВ,
А. АЙТЫМБЕТОВА, А. НҰРАЛИЕВА, Н.Ж. ТЕЛЕШЕВА
С.Ж. Асфендияров атындағы Қазақ Ұлттық
медицина университеті, Алматы қ.
ЖАРАЛЫҚ БИОЖАБЫНДЫЛАРМЕН ЕМДЕУДІҢ ТӘЖІ-
РИБЕЛІ-МОРФОЛОГИЯЛЫҚ НЕГІЗДЕМЕСІ

Күйікті және хирургиялық жараларды емдеу заманауи комбустиология және хирургия үшін өзекті мәселе болып табылады.

Зерттеудің мақсаты. Жараларды емдеу үшін коллаген матрицасында иммобилизденген май тіндердің аллогенді қопсытылған фибробластарды, кератиноциттерді және мезенхимальді стромалді жасушалар негізіндегі жара жабындардың тиімділігін анықтау.

Материал және әдістері. Зерттеу дизайны: асептикалық жараларды жануарлар моделінде рандомизирленген бақыланатын клиникалық зерттеулер. Экспериментте салмағы 2,5-3 кг ер

қояндар, 24 мөлшерде қолданылды. Жануарлар әдіс түріне қарай төрт топқа бөлінді: 1 топ – қоянның қопсытылған фибробластарынан қоллагенді жабындысымен қолданылатын емдеу (n=6); 2 топ – қоянның қопсатылған тері тіндерінен қоллагенді жабындысымен қолданылатын емдеу (n=6); 3 топ – қоянның майлы тіндерінен қопсатылған қоллагенді жабындысымен қолданылатын емдеу (ММСК ЖТ)(n=6); 4 топ – левомиколь майымен қолданылатын емдеу (бақылау, n=6).

Нәтижелері және талқылауы. Жобаланған майлы тіндердің жаралық биожабындылармен қопсатылған фибробласттар және мезенхимальді стромальді жасушалар жараны жазу және қабынуға қарсы әсерлерге ие.

Қорытынды. Қопсытылған фибробласттар және мезенхимальді стромальді жасушалар негізіндегі жаралық биожабындылар ең перспективті боп дәлелденді.

Негізгі сөздер: *толық қабатты жара, жаралық жабынды, фибробласттар, кератиноциттер, мезенхимальді стромальді жасушалар.*

SUMMARY

G.S. STABAYEVA, V.P. RUSANOV, K.S. BIMENOV,
A. AITYMBETOVA, A. NURALIYEVA, N.G. TELESHEVA
Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Almaty c.

**EXPERIMENTAL-MORPHOLOGICAL FOUNDATION OF
USAGE WOUND BIOSURFACES FOR TREATMENT OF THE
WOUNDS**

The most perspective way in the treatment of wounds of various geneses is the formation of technology of cutaneous tissue equivalent on the base of allogeneic and autologous fibroblast's culture, keratinocytes or mesenchymal stromal cells of adipose tissue, which are immobilized on the biopolymer matrix.

Objective. Defining the effectiveness of wound surface usage on the base of allogeneic and autologous fibroblast's culture, keratinocytes or mesenchymal stromal cells of adipose tissue, which are immobilized on the biopolymer matrix.

Material and methods. Design of the usage: random controlled trials on the aseptic full-thickened layer wound of animal model. 24 rabbits with 2,5-3 kg were used in the experiment. Animals were divided into 4 groups: group 1 – treatment with usage of collagen surface with cultivated fibroblasts of rabbits (n=6); group 2 treatment with usage of collagen surface with cultivated cutaneous cells of rabbits (n=6); group 3 treatment with usage of collagen surface with cultivated adipose cells of rabbits (n=6); group 4 – treatment with usage of Levomekol ointment (control, n=6).

Results and discussion. Established wound biosurfaces with cultivated fibroblasts and mesenchymal stromal cells of adipose tissue have the most expressed wound healing and anti-inflammatory action.

Conclusions. The most promising are wound coverage with cultured fibroblasts and mesenchymal stromal cells of adipose tissue.

Key words: *layer wound, wound dressings, fibroblasts, keratinocytes, mesenchymal stromal cells.*

Для ссылки: Стабаева Г.С., Русанов В.П., Бименов К.С., Айтымбетова А., Нуралиева А., Телешева Н.Ж. Экспериментально-морфологическое обоснование применения раневых биопокрытий для лечения ран // *Medicine (Almaty)*. – 2016. – № 12 (174). – P. 96-100

Статья поступила в редакцию 07.12.2016 г.

Статья принята в печать 19.12.2016 г.