

Е.В. Зиновьев¹, В.Н. Цыган¹, М.С. Асадулаев²,
В.Е. Юдин³, Р.Г. Стояновский², Н.В. Смирнова³,
А.С. Шабунин³, С.А. Лукьянов²,
Т.А. Шалоня², Д.В. Костяков¹

Экспериментальная оценка эффективности применения адипогенных мезенхимальных стволовых клеток для лечения ожогов кожи III степени

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург

³Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург

Резюме. Приведены результаты применения мезенхимных адипогенных стволовых клеток, а также разрабатываемых перспективных раневых покрытий на основе нановолокон хитозана и сополиамида, коммерческого гистеобиопластического материала на основе гидрогеля гиалуроновой кислоты при лечении ожогов кожи III степени в эксперименте. Исследование проведено на 32 самцах крыс линии Wistar-Kyoto массой 230–250 г. Для выполнения работы в ходе первого этапа исследования была разработана оригинальная методика для воспроизведения термического ожога кожи у мелких лабораторных животных (грызунов). Приведены подробные схемы приборов, используемых в эксперименте. Консервативное лечение ран животных дополняли хирургическим компонентом в виде ранних некрэктомий. Установлено, что применение адипогенных мезенхимных стволовых клеток позволяет снизить частоту развития гнойных осложнений, а также способствует сокращению сроков восстановления кожного покрова на 24,5%, но не позволяет достичь результата, констатируемого после выполнения ранних некрэктомий и замещения дефектов гистеопластическими материалами на основе природных полимеров. Доказано, что использование покрытий на основе гидрогеля гиалуроновой кислоты улучшает кровоснабжение новообразованной грануляционной ткани в области дефекта за счет увеличения числа сосудов микроциркуляторного русла на 46,2%. Установлено, что инъекционное и инфльтрационное введение адипогенных мезенхимальных стволовых клеток уже к 21 суткам эксперимента позволяет добиться увеличения толщины грануляций на 66%. Показано, что анализируемые раневые покрытия позволяют достоверно ускорить процессы репаративной регенерации и гистеогенеза в зоне термического ожога кожи после некрэктомии на 14,6–46%.

Ключевые слова: глубокие термические ожоги кожи, раневые покрытия, восстановление кожного покрова, мезенхимальные стволовые клетки, алифатический сополиамид, хитозан, нанофибриллы хитина, гидрогель гиалуроновой кислоты.

Введение. Современные способы лечения глубоких термических ожогов кожи не позволяют добиваться излечения пострадавших с критическими поражениями, оставляя ряд нерешенных вопросов, прежде всего в плане выбора быстрой и эффективной методики восстановления кожного покрова при таких поражениях [1–4]. Одним из возможных путей улучшения результатов лечения, повышения эффективности способов восстановления кожного покрова пациентов с обширными глубокими ожогами является использование методов биотехнологии, в частности применение с этой целью адипогенных мезенхимальных стволовых клеток [5–7, 9–12].

Цель исследования. Изучить влияние мезенхимальных стволовых клеток и экспериментальных раневых покрытий на репаративный гистогенез при глубоких ожогах кожи.

Материалы и методы. Экспериментальная работа выполнена на 32 самцах крыс линии Wistar-Kyoto

массой 230–250 г. Животные были разделены на 4 равные группы с учетом способа лечения. В 1-й группе лечение экспериментальных ран проводили с использованием адипогенных мезенхимальных стволовых клеток. Во 2-й и 3-й группах на дефекты укладывали раневые покрытия на основе алифатического сополиамида и хитозана и гидрогеля гиалуроновой кислоты. Лечение ожоговых ран в 4-й группе животных не проводилось. Воспроизведение ожога кожи III степени (МКБ-10) осуществляли по собственной оригинальной разработанной методике (рационализаторское предложение Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова № 14287/1 от 19.01.2016 г.). После подготовки операционного поля животное фиксировали к лабораторному столу. Разметку площади ожога осуществляли трафаретом площадью 32 см² (20% площади тела крысы). На депилированной коже спины животного датчиком электротермопары мультиметра «Electroline» (Китай) определяли температуру кожи и металлической пластины, нагреваемой через рези-

стивный нагревательный элемент (рис. 1–2). Время экспозиции – 10 с при температуре на поверхности кожи 95–97 С° (рис. 3).

В 1-й группе животных спустя 60 мин после ожога III степени проводили местное инъекционное и инфльтрационное (5 мл клеточной суспензии, содержание клеток 1 миллион в 1 мл) введение стволовых клеток в подлежащую под струпом жизнеспособную ткань без предшествующей некрэктомии (рис. 4).

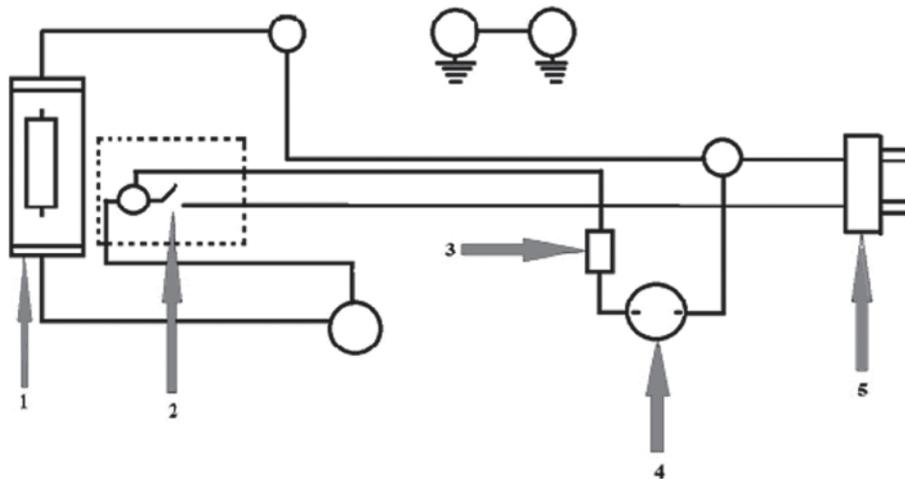


Рис. 1. Схема нагревательного элемента для воспроизведения термического ожога: 1 – нагревательный элемент, 2 – терморегулятор, 3 – резистор, 4 – лампа индикатора, 5 – сетевая вилка

для трансплантологии и тканевой инженерии Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого (СПб ПУ).

Во 2-й и 3-й группах животных спустя 60 мин после травмы под общим ингаляционным (эфирным) наркозом в асептических условиях выполняли радикальную некрэктомию до фасции и аппликацию раневых покрытий на основе природных полимеров (рис. 6).

Во 2-й группе лечение ран осуществлялось с использованием экспериментальных раневых покрытий на основе алифатического сополиамида и хитозана производства СПб ПУ (рис. 7).

В 3-й группе раневую поверхность замещали раневыми покрытиями на основе гидрогеля гиалуроновой кислоты производства Общества с ограниченной ответственностью ДЖИ-групп (рис. 8). Их дополнительную фиксацию осуществляли кожным клеем «Dermabond» (Германия).

В 4-й группе (контроля) лечение ран животных не осуществляли.

Оценку эффективности избранных методик лечения и фотографирование ран проводили через каждые трое суток. Выполняли осмотр ран, отмечали характер отделяемого, наличие и вид грануляций, фиксировали сроки отторжения струпа и заживления раневых поверхностей. Площадь раны и индекс заживления вычисляли по формуле:

$$\frac{S - S_n}{S \times T} \times 100$$

Аллогенные стволовые клетки получали из подкожно-жировой клетчатки крыс. Отбор осуществлялся под наркозом с соблюдением правил асептики. Для этого в области передней брюшной стенки выполняли 2–3 вертикальных разреза, из которых инструментально извлекали 1–2 г подкожно-жировой клетчатки (рис. 5). Рану зашивали узловыми швами.

Выделение и культивирование стволовых клеток проводили в лаборатории полимерных материалов

где S – площадь раны при предыдущем измерении, мм²; S_n – площадь раны при данном измерении, мм²; T – интервал между измерениями, сут.

Отбор биоптатов для гистологического исследования осуществляли на 3-и, 7-е, 12-е, 15-е, 21-е, 28-е сутки лечения. Биоптаты фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина с последующей проводкой через спирты восходящей концентрации (30–100%) и заливкой в парафин. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином с дальнейшим их исследованием, используя светооптическую микроскопию.

Обработка полученных результатов проводилась в соответствии с общепринятыми методами вариационной статистики. Критерием достоверности считали величину p<0,05.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что у животных 1-й группы в процессе регенерации зоны глубокого ожога III степени при использовании адипогенных мезенхимальных стволовых клеток на 21 сутки площадь раны уменьшилась до 5,7 см² (p<0,05). Применение адипогенных мезенхимальных стволовых клеток на 28-е сутки наблюдения позволило ускорить процессы регенерации на 24,5% и уменьшить площадь рубца на 68,7% по сравнению с 4-й группой (рис. 9, табл. 1).

Выполнение радикальной хирургической некрэктомии в зоне глубокого ожога кожи и последующее использование раневых покрытий на основе алифатического сополиамида и гиалуроновой кислоты

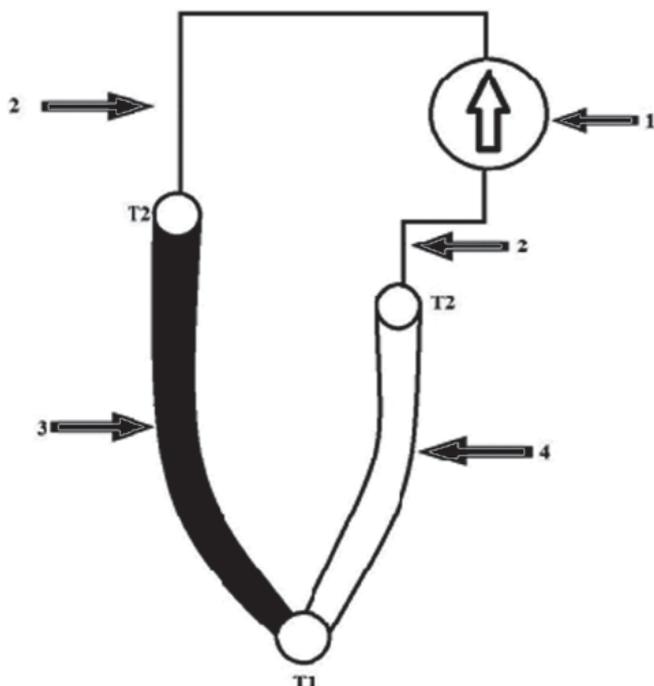


Рис. 2. Схема термопары для дозировки высокотемпературного воздействия: 1 – измерительный прибор, 2 – соединительные провода, 3,4 – термоэлектроды



Рис. 3. Кожа крысы после воспроизведения ожога III степени



Рис. 4. Этап введения суспензии стволовых клеток в область ожога кожи III степени

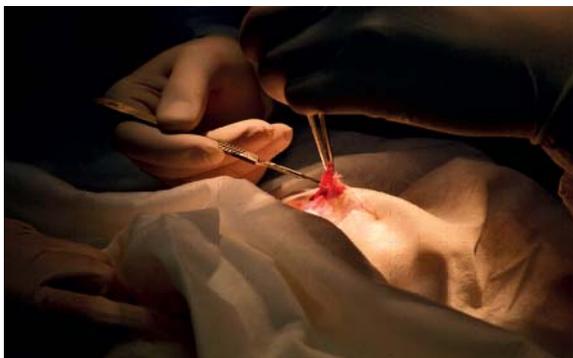


Рис. 5. Этапы отбора подкожно-жировой клетчатки для выделения мезенхимальных стволовых клеток



Рис. 7. Апликация раневого покрытия на основе алифатического сополиамида и хитозана



Рис. 6. Раневая поверхность после выполнения некрэктомии



Рис. 8. Фиксация раневого покрытия на основе гидрогеля гиалуроновой кислоты

Таблица 1

Планиметрическая оценка ран с учетом методик лечения

| Группа | Срок заживления, сутки | Площадь рубца, см ² |
|--------|------------------------|--------------------------------|
| 1-я | 34±2,1** | 2,5±1,2 |
| 2-я | 24±1,1* | 5±2,3 |
| 3-я | 38±1,6** | 3,8±1,7 |
| 4-я | 45±1,8** | 8±1,9 |

Примечание: * – различия по сравнению с животными 4-ой группы; ** – различия по сравнению со 2-й группой, p<0,05.

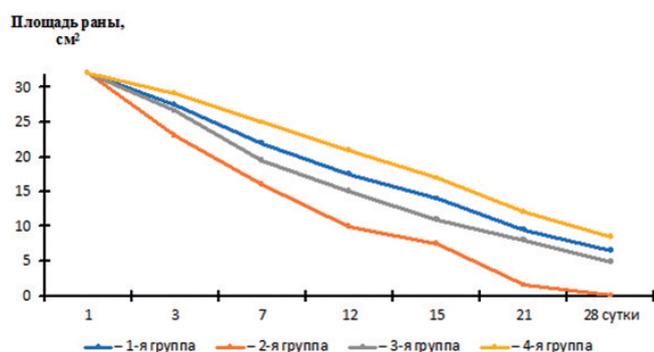


Рис. 9. Динамика площади ожоговой раны с учетом способа лечения

оказалось более эффективным. При замещении дефекта покрытием из хитозана и сополиамида к исходу третьей недели исследования у животных 2-й группы отмечено сокращение площади раны до 1,5 см². На 28 сутки наблюдения по сравнению с группой контроля констатируется ускорение процессов регенерации на 46,7%, а также сокращение площади рубца на 37,5%. Наилучшие результаты для закрытия ран после некрэктомии получены при использовании покрытия на основе гиалуроновой кислоты. К исходу третьей недели исследования в 3-й группе животных отмечено сокращение площади раны до 8 см², на 28 сутки наблюдения по сравнению с группой контроля констатируется ускорение процессов регенерации на 15,6%, а сокращение площади рубца на 52,5%. К этому сроку наибольшая площадь дефекта (7,8 см²) отмечалась в контрольной группе животных, лечение которых не проводилось.

Число сосудов микроциркуляторного русла в биоптатах ран к исходу 21-х суток наблюдения оказалось на 46,2% больше в 3-й группе животных, раны которых после предварительной хирургической некрэктомии покрывали биоптатом на основе гидрогеля гиалуроновой кислоты. Число микрососудов в растущих грануляциях на фоне введения стволовых клеток не имело отличий от контрольной группы (рис. 10).

На 21 сутки наблюдения установлено, что в 1-й группе животных толщина новообразованной грануляционной ткани в области дефекта наибольшая – 2002 мкм (в 1,8 раз больше, чем в 4-й группе (p<0,01)). Это

Таблица 2

Толщина новообразованных грануляций с учетом способа лечения

| Группа | Толщина ткани, мкм |
|--------|-----------------------|
| 1-я | 2002,1±63,5*, **, *** |
| 2-я | 1676,2±67,1* |
| 3-я | 1273,4±54,8* |
| 4-я | 1090,4±25,9**, ** |

Примечание: * – различия по сравнению с 4-й группой; ** – различия по сравнению с 2-й группой; *** – различия по сравнению с 3-й группой, p<0,05.

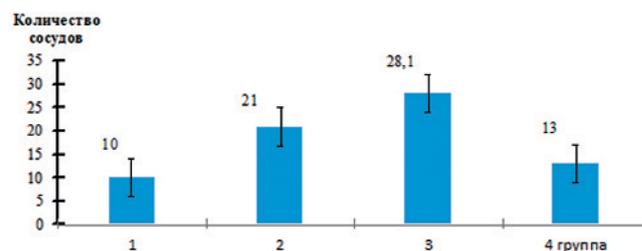


Рис. 10. Число микрососудов в поле зрения с учетом способа лечения

превышает на 17 и 37% толщину новообразованных грануляций во 2-й и 3-й группах животных соответственно (табл. 2).

Следовательно, введение мезенхимальных стволовых клеток позволяет обеспечить развитие полноценной соединительной ткани в зоне глубокого термического ожога в более ранние сроки.

Закключение. Использование адипогенных мезенхимальных стволовых клеток без некрэктомии позволяет достичь заживления ран к 34 суткам, то есть ускорить процессы регенерации на 24%, а также сократить площадь рубца на 69% по сравнению с контрольной группой животных. На фоне введения стволовых клеток в биоптатах отмечается более раннее развитие зрелой соединительной ткани, толщина новообразованных грануляций на 47% больше, чем в 4-й группе. Применение раневых покрытий на основе алифатического сополиамида и хитозана в зоне глубоких термических ожогов после их некрэктомии позволяет достичь полного заживления раны к 24 суткам, ускоряя процессы регенерации на 47%, площадь рубца при этом уменьшается на 375%. Использование в этих же условиях раневых покрытий на основе гидрогеля гиалуроновой кислоты позволяет сократить сроки заживления на 16% и сократить площадь рубца на 52%.

В целом использование стволовых клеток в лечении глубоких термических ожогов кожи III степени представляется перспективным способом их лечения. Местное введение адипогенных мезенхимальных стволовых клеток в зону дефекта кожи позволяет реализовать паракринный эффект [7-8], который стиму-

лирует миграцию собственных, в том числе стволовых клеток в область повреждения.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 14-33-00003.

Литература

1. Алексеев, А.А. Современные технологии местного консервативного лечения пострадавших от ожогов / А.А. Алексеев, А.Э. Бобровников // *Анналы хирургии*. – 2012. – № 2. – С. 32–38.
2. Бобровников, А.Э. Технологии местного консервативного лечения обожженных: автореф. дис. ... канд. мед. наук / А.Э. Бобровников. – М., 2012. – 17 с.
3. Будкевич, Л.И. Опыт применения клеточной технологии у детей с глубокими ожогами кожи / Л.И. Будкевич, Т.А. Королёва // *Междуна. научн.-исслед. журн.* – 2013. – № 4–3 (11). – С. 54–59.
4. Гольцев, А.Н. Использование нанокомпозитных покрытий в технологиях культивирования мультипотентных мезенхимных стромальных клеток / А.Н. Гольцев, И.В. Рассоха, Т.Г. Дубрава // *Гены и клетки*. – 2013. – Т. 8. – № 1. – С. 46–50.
5. Зиновьев, Е.В. Биопластические дерматотерапевтические системы на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты и пептидного комплекса // Е.В. Зиновьев, Р.Р. Рахматуллин, А.В. Апчел // *Вестн. Росс. воен.-мед. акад.* – 2014. – № 1 (45). – С. 147–151.
6. Калмыкова, Н.В. Биопластический материал на основе гиалуроновой кислоты как матрица для создания биомедицинских клеточных экспресс-продуктов для восстановления кожи / Н.В. Калмыкова, О.Г. Спичкина, В.Н. Эллиниди // *Гены и клетки*. – 2014. – Т. 9. – № 2. – С. 68–75.
7. Кругляков, Н.В. Стволовые клетки дифференцированных тканей взрослого организма / Н.В. Кругляков, И.Б. Соколова, Д.Г. Полинцев // *Цитология*. – 2008. – Т. 50, № 7. – С. 557–567.
8. Подойницына, М.Г. Изменение микроциркуляции при дермальных ожогах / М.Г. Подойницына, В.Л. Цепелев, А.В. Степанов // *Фундаментальные исследования*. – 2015. – № 1–9. – С. 1893–1896.
9. Филимонов, К.А. Совершенствование местного лечения ран у больных с локальными ожогами: дис. ... канд. мед. наук / К.А. Филимонов. – Самара, 2013. – 144 с.
10. Цепелев, В.Л. Влияние регуляторных пептидов на продукцию провоспалительных цитокинов / В.Л. Цепелев, А.В. Степанов // *Заб. мед. вестн.* – 2015. – № 2. – С. 147–150.
11. Abdelgawad, A.M. Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems / A.M. Abdelgawad, S.M. Hudson, O.J. Rojas // *Carbohydrate Polymers*. – 2014. – № 100 – P. 166–178.
12. Busilacch, A. Chitosan stabilizes platelet growth factors and modulates stem cell differentiation toward tissue regeneration / A. Busilacch, A. Gigante, M. Mattioli-Belmonte // *Carbohydrate Polymers*. – 2013. – Vol. 98, № 1. – P. 665–676.
13. Gonzalez-Rey, E. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis / E. Gonzalez-Rey, P. Anderson, M.A. Gonzalez // *Gut*. – 2009. – № 58 (7). – P. 929–939.
14. Shukla, S.K. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review / S.K. Shukla, A.K. Mishra, O.A. Arotiba // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2013. – № 59. – P. 46–58.

E.V. Zinovev, V.N. Tsygan, M.S. Asadulaev, V.E. Yudin, R.G. Stoyanovsky, N.V. Smirnova, A.S. Shabunin, S.A. Lukyanov, T.A. Shalonya, D.V. Kostyakov

Experimental evaluation of the effectiveness of adipogenic mesenchymal stem cells for the treatment of skin burns of III degree

Abstract. *The results of the use of mesenchymal stem cell adipogenic and developed advanced wound dressings based on chitosan nanofibres and copolyamide commercial material based hydrogel of hyaluronic acid in the treatment of III degree burns of the skin in the experiment. The study was conducted on 32 male rats Wistar-Kyoto weighing 230-250 g. To perform the work during the first phase of the study an original technique for reproducing thermal skin burn in small laboratory animals has been developed (rodents). Provides detailed diagram of the device used in the experiment. Conservative treatment of animals supplemented with surgical wounds component in the form of early necrectomy. It was found that the use of adipogenic mesenchymal stem cells can reduce the incidence of suppurative complications, and contributes to shorten the recovery of the skin by 24,5%, but does not achieve the result, after the implementation of early necrectomy and replacement of defects materials based on natural polymers. It is proved that the use of coatings on the basis of the hydrogel of hyaluronic acid improves the blood supply of the newly formed granulation tissue in the defect at the expense of increasing the number of microvascular 46,2%. It was found that the injection and the introduction of infiltration adipogenic mesenchymal stem cells as early as 21 days of the experiment allows to achieve increase in granulation tissue thickness by 66%. It was shown that the analyzed wound dressings allow significantly accelerate the processes of reparative regeneration and histogenesis in the area of thermal skin burn after necrectomy at 14,6–46%.*

Key words: *deep thermal burns of skin, wound coverings, restoration of the skin, mesenchymal stem cells aliphatic copolyamide, chitosan, chitin nanofibrils, hydrogel of hyaluronic acid.*

Контактный телефон: 8-964-328-97-52; e-mail: marat.asadulaev@mail.ru