

ЗАЖИВЛЕНИЕ ИНДУЦИРОВАННОГО РАНЕВОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ КОЖИ ПОД ВЛИЯНИЕМ АУТОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОК СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ

Н.А. Слесаренко, Е.Н. Борхунова, доктора биологических наук,
Н.В. Вологжанина, кандидат биологических наук

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина,
109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23
E-mail: borhunova@mail.ru

В условиях эксперимента на морских свинках изучали течение репаративной регенерации кожи после нанесения лоскутной раны под влиянием клеточной суспензии из аутологичной стромально-васкулярной фракции. Использовали методы клинического наблюдения, светооптических исследований биопсийного материала, макро- и микроскопической морфометрии. Клеточный материал получали путем липосакции из области холки животного. Аутологичную жировую ткань использовали для приготовления клеточной суспензии, содержащей совокупность клеток (фибробласты, перicytes, акрофаги, жировые клетки, эндотелиальные клетки), составляющих стромально-васкулярную фракцию. Полученные данные свидетельствуют о том, что применение клеточного продукта приводит к более быстрому (по сравнению с контролем) заживлению дефекта, формированию регенерата, морфологически сходного с окружающей интактной кожей. В структуре регенерата микроскопически обнаруживали восстановление структурных зон кожи: эпидермиса, дермы и подкожной жировой клетчатки. В центральной части регенерата сохранялся небольшой участок рубцовой структуры, площадь которого достоверно меньше, чем у контрольных аналогов. Сделан вывод о том, что применение клеточных продуктов усиливает процессы репаративной регенерации и является эффективным способом воздействия при лечении кожных ран.

HEALING OF INDUCED PREVIOUS DAMAGE TO SKIN UNDER THE INFLUENCE OF AUTOLOGICAL CELLS STROMAL-VASCULAR FRACTION

Slesarenko N.A., Borkhunova E.N., Vologjanina N.V.

Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MBA named after K.I. Skryabin,
109472, Moskva, ul. Akademika Scriabina, 23
E-mail: borhunova@mail.ru

In the experiment on Guinea pigs, the course of reparative skin regeneration after application of a flap wound under the influence of cellular suspensions from autologous stromal vascular fraction was studied. The material was investigated by clinical observation, light - optical studies of biopsy material, macro- and microscopic morphometry. Cell material was obtained by liposuction from the withers of the animal. Autologous adipose tissue was used to prepare a cell suspension containing a set of cells (fibroblasts, pericytes, acrophages, fat cells, endothelial cells) that make up the stromal-vascular fraction. The findings suggest that the use of cellular product leads to faster (compared with the control) healing of the defect, the formation of regenerate, morphologically similar to the surrounding intact skin. In the structure of the regenerate microscopically found restoration of the structural zones of the skin: the epidermis, dermis and subcutaneous fat. In the Central part of the regenerate, a small portion of the scar structure was preserved, the area of which is significantly less than that of the control analogues. Thus, the use of cellular products enhances the processes of reparative regeneration and is an effective way of therapeutic effects in the treatment of skin wounds.

Ключевые слова: рана, кожа, репаративная регенерация, клеточные продукты, стромально-васкулярная фракция

Key words: wound, skin, reparative regeneration, cellular products, stromal vascular fraction

Совершенствование способов оптимизации заживления раневых дефектов кожи остается актуальной проблемой биологии и регенеративной медицины [1-5]. Принципиально важным условием при этом является профилактика образования грубых рубцовых изменений кожи, нарушающих ее гистофизиологию и биомеханические характеристики, что приводит к функциональной неполноценности анатомических областей и формированию эстетических недостатков. Поэтому представляет интерес применение аутогенных клеточных продуктов, трансплантация которых направлена на восстановление поврежденных тканей, стимуляцию собственных прогениторных клеток [6,7] и усиление процесса репаративной регенерации [8-10]. В частности, при заживлении дефектов кожи был получен положительный клинический эффект при введении клеток стромально-васкулярной фракции (СВФ) и мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) [11-15].

В ветеринарной практике применение клеточных продуктов только начинает внедряться. На наш взгляд,

этот метод может оказаться очень эффективным при лечении животных с обширными и длительно незаживающими ранами, а также с ожогами кожи. Однако гистологический и морфометрический контроль процесса регенерации кожи под влиянием аутологичных клеточных продуктов осуществлен в недостаточной мере. В связи с этим целью нашей работы было изучение процесса репаративной регенерации кожи в условиях индуцированной раны под влиянием клеток стромально-васкулярной фракции.

Методика. Исследования выполнены на кафедре анатомии и гистологии им. А.Ф. Климова МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина совместно с ООО «Центр ветеринарной клеточной медицины». Гистопрепараты изготавливали на базе лаборатории патоморфологии ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко.

Объектом исследования были морские свинки, подобранные по принципу аналогов с учетом возраста, породы и пола. Было сформировано две группы животных по 20 особей в каждой. В контрольной группе

раневого дефект кожи заживал естественным путем, в опытной – под влиянием клеток стромально-васкулярной фракции. Для седации и аналгезии использовали медитин 0,1%-ный, а также местно проводили инфильтрационную анестезию (новокаин 1%-ный). На латеральной поверхности бедра с обеих сторон наносили лоскутную рану размером 1,5x1,5 см, которая характеризовалась ровными краями, а ее дном служила двуглавая мышца бедра (рис. 1А). Отмечали незначительное кровотечение, которое останавливалось после тампонирования раны.

На 3-и сутки животным опытной группы вводили аутогенный клеточный продукт СВФ. Для этого выполняли липосакцию в межлопаточной области, фрагмент белой жировой ткани помещали в транспортную среду DMEM, доставляли в лабораторию и готовили суспензию (объем суспензии каждого образца – 1 мл, концентрация ядросодержащих клеток – $3,00 \cdot 10^6$ при общей жизнеспособности клеток 98%). Ее вводили животным подкожно и внутрикочно в зону демаркационного воспаления в объеме 0,5 мл на каждую рану однократно. В дальнейшем животные находились под динамическим наблюдением, а постдеструктивную поверхность оценивали морфометрически по методу Поповой. Биопсийный материал брали у животных под анестезией медитином на 7-е, 14-е и 30-е сутки эксперимента. Материал заливали в парафин по общепринятой методике, готовили срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином по методу Ван-Гизон, и изучали с помощью микроскопа Jenamed 2, совмещенного с программой цифрового анализа микроскопических изображений ImageScore версия 4.0, осуществляя описание, микрофото съемку и микроморфометрическое исследование.

Результаты и обсуждение. В течение первых 3 сут рана подвергалась контракции, что сопровождалось заметным уменьшением ее площади (табл.). На ее дне был сформирован сухой струп, по краям сохранялись умеренный отек и незначительная гиперемия. В контрольной группе через 7 сут уровень поверхности раневого дефекта приближался к таковому окружающей кожи, что свидетельствовало о заполнении его грану-

ляциями. Поверхность была покрыта струпом, более толстым в центре и тонким на периферии. Признаки перифокального воспаления слабо выражены. К 14-м сут наблюдали отторжение струпа. На месте дефекта обнаруживали втянутый рубец багрового цвета в центральной части, что связано с богатой васкуляризацией созревающих грануляций, и бледного на периферии, что указывало на присутствие фиброзной ткани. Волосные фолликулы в области рубца отсутствовали. Через 30 сут площадь рубца уменьшалась, однако, он оставался втянутым («минус-ткань») и плотным. Центральная часть по-прежнему сохраняла темно-красный цвет за счет обилия кровеносных сосудов в рубцовой ткани, что соответствует ее морфологической незрелости (рис. 1 Б). В периферической части отмечали рост волосных фолликулов, что свидетельствует о ремоделировании рубца.

В опытной группе на 7 сут после операции рана, покрытая тонким струпом, имела сухие и неровные края, внешние признаки демаркационного воспаления отсутствовали. Уменьшение размеров раневого дефекта происходило более выражено, что может быть связано с большей активностью процессов ферментативного очищения раны, ростом грануляций и эпителизацией. Через 14 сут отмечали отторжение струпа. Постдеструктивная поверхность была представлена тонким, мягким рубцом нежно-розового цвета с более яркой центральной частью и более бледной периферической. Площадь рубца уступала таковой у животных контрольной группы. Через 30 сут в области бывшего дефекта кожи наблюдали регенерат, меньшая центральная часть которого имела рубцовое строение. Площадь рубца уменьшалась по сравнению с предыдущим сроком исследований. Периферическая часть регенерата по уровню поверхности, цвету, состоянию волосного покрова визуально не отличалась от окружающей (рис. 1 В). Таким образом, структура регенерата кожи у животных опытной группы свидетельствовала о более активном и эффективном его ремоделировании по сравнению с таковым в контрольной группе.

Морфометрические данные, отражающие особенности заживления кожи после нанесения лоскутной раны в динамике репаративного процесса, представлены в табл.

В результате микроскопического исследования установлено, что у животных контрольной группы через 7 сут раневой дефект был покрыт струпом, под которым обнаруживали тонкий слой грануляционной ткани с крупными отростчатыми фибробластами и тонкими, рыхло упакованными пучками коллагеновых волокон (рис.2 А). В нем наблюдали широкие капилляры с умеренно полнокровными просветами, а также умеренную макрофагально-лимфоцитарную инфильтрацию с примесью нейтрофилов, что указывает на воспалительные и регенераторные изменения. Через 14 сут в области бывшей раны определяли рубец. Истонченный эпидермис имел слабо выраженный роговой слой и сложенный сосочковый рисунок, под ним располагались



Рис. 1. Макроскопическая характеристика кожи на разных этапах репарации:
 А – сразу после нанесения, Б – в контрольной группе через 30 сут,
 В – в опытной группе через 30 сут.

Динамика площади (см²) раны и рубца, замещающего раневой дефект кожи

Группа	Срок эксперимента, сут					
	сразу после нанесения раны	1 (рана)	3 (рана)	7 (рана)	14 (рубец)	30 (рубец)
Контрольная	2,25±0,12	1,63±0,09	1,45±0,11	1,12±0,23	0,94±0,23	0,64±0,07
Опытная	2,24±0,11	1,64±0,08	1,13±0,07	0,88±0,11	0,58±0,24	0,08±0,01

зрелые, хорошо васкуляризованные грануляции и фиброзная ткань, которая замещала подкожную жировую клетчатку. Толщина регенерата возрастала по сравнению с предыдущим сроком наблюдений. Через 30 суток выявлено полное замещение раневого дефекта регенератом, центральная часть которого была сформирована рубцом, а периферическая имела выраженное фиброзное изменение дермы и подкожной жировой клетчатки, а также истонченный эпидермис без сосочкового рисунка и со слабо выраженным роговым слоем (рис.2 Б). В рубцовой ткани регистрировали диффузную макрофагально-лимфоцитарную инфильтрацию, указывающую на ремоделирование рубцовой ткани. Все это соответствует типичному течению репаративной регенерации кожи с заживлением рубцом (по типу субституции), сопровождающееся локальным нарушением морфофункциональных свойств кожи.

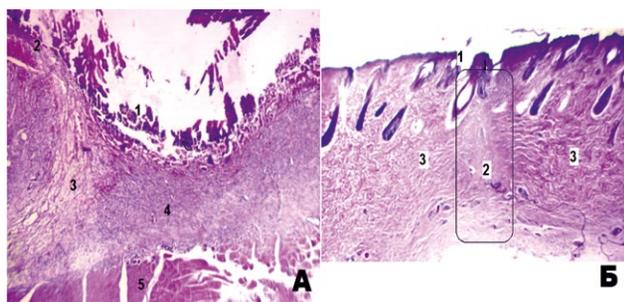


Рис. 2. Микроорганизация регенерата кожи у животных контрольной группы: А – 7 сут: 1 – струп, 2 – эпителий, 3 – грануляционная ткань с широкопетливой сетью капилляров, 4 – грануляции с признаками созревания, 5 – скелетная мышца. Б – 30 сут: 1 – эпителий, 2 – рубцовая ткань в состоянии ремоделирования («стянутая» часть рубца), 3 – периферическая часть рубца.

В опытной группе процесс заживления протекал с иными морфологическими проявлениями. Через 7 сут раневой дефект был покрыт струпом и заполнен не только грануляциями, но и белой жировой тканью (рис.3 А). По краям наблюдали эпителизацию дефекта. В грануляционной ткани выражена умеренная макрофагально-лимфоцитарная инфильтрация с примесью нейтрофилов и участием гигантских многоядерных клеток инородных тел. Через 14 сут в области бывшей раны отмечен регенерат, центральная часть которого имела рубцовое строение, а периферическая была сходна с окружающей кожей. При этом в эпителии регенерата обнаружено восстановление всех слоев кератиноцитов, включая роговой, а также слабо выраженный сосочковый рисунок. В периферической части регенерата видны эпидермальные производные – волосяные фолликулы и сальные железы, что указывает на нормализацию морфофункциональных свойств кожи. Субэпидермально расположена фиброзная ткань, хорошо васкуляризованная и богатая фибробластами и фиброцитами, в которой сохраняется умеренная макрофагально-лимфоцитарная инфильтрация. Важно отметить наличие долек жировой ткани в структуре регенерата, что отличает его от такового в контрольной группе. Через 30 сут отмечали полное замещение раневого дефекта регенератом, узкая центральная часть которого была сформирована рубцом, а периферическая имела морфологическое сходство с окружающей кожей (рис.3 Б). Выявлено восстановление толщины и

морфологической анизотропии эпидермиса, наличие эпидермальных производных (волосяных фолликулов, сальных и потовых желез), а также сходство фиброархитектоники соединительнотканной части регенерата (хорошо васкуляризованной, тонковолокнистой фиброзной ткани) с таковой дермы и восстановление подкожной жировой клетчатки. Присутствие в фиброзной ткани макрофагального инфильтрата с примесью лимфоцитов, на наш взгляд, свидетельствует о продолжающемся ремоделировании рубцовой ткани.

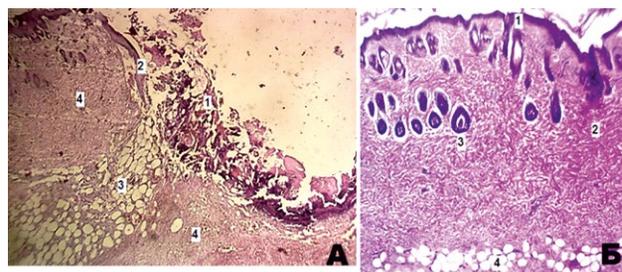


Рис. 3. Микроорганизация регенерата кожи у животных опытной группы: А – 7 сут: 1 – струп, 2 – эпидермальный пласт, 3 – белая жировая ткань, 4 – грануляционная ткань; Б – 30 сут: 1 – эпителий, 2 – рубцовоизмененная кожа, 3 – соединительнотканная часть регенерата, сходная с окружающей кожей, 4 – подкожная жировая клетчатка.

Таким образом, морфологическая оценка полноценности регенерата кожи показала, что под влиянием суспензии клеток стромально-васкулярной фракции заживление лоскутной раны происходит более активно, чем при спонтанном заживлении. Это связано с более ранним формированием и созреванием грануляций, а также более эффективным ремоделированием регенерата кожи, в результате чего к 30-м суткам эксперимента он сохраняет лишь небольшую центральную рубцовую часть, в то время как большая его часть по структурной организации имеет сходство с окружающей интактной кожей. Обращает на себя внимание восстановление структуры эпидермиса и формирование подкожной жировой клетчатки.

Результаты исследований свидетельствуют об эффективности терапевтического использования испытанного клеточного материала, поскольку под его влиянием происходит заживление индуцированного повреждения регенератом, близким по строению к интактной коже.

Литература.

1. Владимирская Е.Б. Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками. – М.: Медпрактика, 2005. – 241 с.
2. Гаряев П.П. Стволовые клетки и их применение // Медицина. – 2009. – №11. – С. 5.
3. Власов В.В., Медведев С.П., Шевченко А.И., Сухих Г.Т., Закиян С.М. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Изд-е 2-е. – Новосибирск: Изд-во РАН, 2014. – 376 с.
4. Калинина Н. И., Сысоева В. Ю., Рубина К. А. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей // J. Acta Naturae. – 2011. – Т.3. – №4. – С. 32.
5. Мезен Н.И., Квачева З.Б., Сычик Л.М. Стволовые клетки: Уч.-метод. пособие. – Минск: БГМУ, 2014. – 62 с.

6. Старцева О.И., Мельников Д.В., Захаренко А.С., Кириллова К.А., Иванов С.И., Пищикова Е.Д., Даптян Г.Э. Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани: современный взгляд, актуальность и перспективы применения в пластической хирургии // *Исследования и практика в медицине*. – 2016. – Т.3. – №3. – С.68-75.
7. Miranville A., Heeschen C., Sengenès C., Curat C.A., Busse R., Bouloumie A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells // *Circulation*. – 2004. – V.110. – №3. – P.349-355.
8. Planat-Benard V., Silvestre J.S., Cousin B., Andre M., Nibelink M., Tamarat R., Clergue M., Manneville C., Saillan-Barreau C., Duriez M., Tedgui A., Levy B., Penicaud L., Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: Physiological and therapeutic perspectives // *Circulation*. – 2004. – V.109. – № 5. – P.656-663.
9. Matsumoto D., Sato K., Gonda K., Takaki Y., Shigeura T., Sato T., Aiba-Kojima E., Iizuka F., Inoue K., Suga H., Yoshimura K. Cell-assisted lipotransfer: Supportive use of human adiposederived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection // *Tissue Engineering*. – 2006. – №.12. – P.3375-3382.
10. Lendeckel S., Jodicke A., Christophis P., Heidinger K., Wolff J., Fraser J.K., Hedrick M.H., Berthold L., Howaldt H.P. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: Case report // *J.Cranio-Maxillofac Surgtry*. – 2004. – V.32. – N. 6. – P.370-373.
11. Yoshimura K., Sato K., Aoi N., Kurita M., Inoue K., Suga H., Eto H., Kato H., Hirohi T., Harii K. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: Efficacy of clinical use of adiposederived stem cells // *Dermatologic Surgery*. – 2008. – V.34. – N5. – P.1178-1185.
12. Kim W.S., Park B.S., Sung J.H. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts// *J. Dermatology Sci.* – 2007. – V.48. – P.15-24.
13. Ebrahimian T., Pouzoulet F., Squiban C. Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing // *J. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2009. – V.29. – P.503-510.
14. Kim W.S., Park B.S., Park S.H., Kim H.K., Sung J.H. Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: activation of dermal fibroblast by secretory factors // *J. Dermatology Sci.* – 2009. – V.53. – N2. – P.96-102.
15. Rigotti G., Marchi A., Galie` M. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adiposederived adult stem cells // *J. Plastic Reconstructive Surgery*. – 2007. – V.119. – P.1409-1422.

Поступила в редакцию 05.02.19
 После доработки 20.03.19
 Принята к публикации 15.04.19