

ХИРУРГИЯ

УДК 616.001

*Н. А. Прохоров¹, Ю. Г. Суховой²***РЕГЕНЕРАЦИЯ ИНФИЦИРОВАННЫХ РАН
В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИЦ**¹ ГЛПУ ТО Областная клиническая больница №2² Институт клинической иммунологии СО РАМН, Тюменский филиал, Тюмень

Введение. Проблема регенерации нормальных и патологически измененных органов нашла широкое отражение в работах ученых XX века. Накоплен огромный фактический материал, касающийся типов, источников, факторов регуляции и способов стимуляции регенерационных процессов в фило- и онтогенезе [1–6]. В большинстве систем регенерации обязательным условием начала регенерации является удаление поврежденных структур. Острая воспалительная реакция подавляет последующую регенерацию и с большой вероятностью приводит к дисрегенерации [7–11].

Внедрение клеточных технологий в практику лечения различных заболеваний в гематологии, кардиологии, гепатологии, офтальмологии, травматологии, хирургии [12–16] показало перспективность этого направления. Клинический эффект применения клеток-предшественниц объясняется их неспецифическим механизмом действия. Введенные клетки, будучи мало дифференцированными, с помощью биологически активных веществ активизируют собственные эндогенные механизмы регуляции восстановительных процессов в «ущербных» органах путём регуляции дифференцировки клеток макрофагально-моноцитарного ряда и выделения ими собственных (эндогенных) регуляторных пептидов [3]. Тем не менее, несмотря на перспективность применения клеток-предшественниц в терапии различных заболеваний, следует констатировать, что теоретические выкладки опережают доказательную базу.

Цель работы: изучить особенности регенерации в условиях применения клеток-предшественниц при лечении инфицированных ран мягких тканей.

Методы. Работа выполнена на 30 пациентах в стандартных условиях, возраст от 20 до 30 лет мужчины. Раны на голени (3–5 суток), диаметр 30 см², раны с повреждением кожи и подкожно-жировой клетчатки до мышцы. Всем пациентам проводился микробиологический контроль отделяемого из раны в первые, пятые, десятые, пятнадцатые сутки. Для улучшения исходов лечения 5 пациентам, вследствие некротического поражения кожи на всю глубину с вовлечением подкожно-жировой клетчатки, проводилось иссечение измененных тканей до появления капиллярного кровотечения. Некрэктомия позволяет быстро очистить рану, уменьшить интоксикацию и ограничить распространение инфекций на соседние ткани. Среди высеваемых из раны микроорганизмов наиболее часто встречались факультативно-анаэробные кокки (61,7%), анаэробные неспо-

рообразующие бактерии (41,1%) и грамм-отрицательная микрофлора (26,4%). Для лечения применялся «Регенерационный гель» (изобретение № 2008105382 от 12.02.2008 г., с разрешения этического комитета ТФ ГУ НИИКИ СО РАМН от 3.03.2008 г.). Пациенты были разделены на 3 группы (по 10 пациентов в каждой), перевязки проводили 1 раз в день:

1. В группе контроля № 1 (контроль основы) на рану наносили только основу геля без клеток-предшественниц.

2. В группе контроля № 2 лечение проводили традиционными методами: после обработки краев раны раствором Люголя, рану промывали 3%-ным раствором перекиси водорода, осушали. В фазу воспаления применяли повязки с водным раствором антисептика, мазями на водной основе, в фазу регенерации и эпителизации — мази на жировой основе.

3. В экспериментальной группе после обработки краев раны раствором Люголя на рану с 1 суток наносили аллогенные клетки-предшественницы в виде геля оригинального состава. После образования пленки из геля на рану накладывали стерильную салфетку.

На 1, 5, 10, 15 сутки оценивали размеры раневого дефекта, наличие отека, гиперемии, отделяемого из раны и его характер. В эти же сроки под местной анестезией выполняли биопсию раны через все слои на глубину до 1,8–2,2 см. Материал фиксировали в 96%-ном этиловом спирте, заливали в парафин и готовили гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилином Майера и эозином с последующим анализом морфологической картины. Парафиновые срезы обрабатывали ферментными иммунными комплексами с проведением внутреннего контроля иммуногистохимических реакций для выявления проапоптотического маркера CD95+ и маркера пролиферации Ki67.

Результаты. До начала лечения раны неправильно округлой формы, размер составляет 4,5–6,4 см в диаметре. Вокруг раны очаг инфильтрации до 3,5 см в диаметре. Стенки раны плотные, спаяны с окружающими тканями, дно покрыто плотным налетом фибрина, выделяется до 2–3 мл гнойного отделяемого белесоватого цвета тестоватой консистенции. Глубина раневого дефекта до 2 см.

При гистологическом исследовании (рис. 1) определяются очаги некроза в соединительной и мышечной ткани, расширение кровеносных сосудов со стазом крови, экскудация лейкоцитов. Сосочковый слой дермы имеет четкое разграничение на слои: с выраженной клеточной инфильтрацией, представленной моноцитами, единичными макрофагами и рыхлой соединительной тканью с большим количеством фиброцитов, единичными фибробластами, единичными моноцитами, плазмócитами (рис. 2).

На 1 сутки эксперимента во всех группах раны сохраняют свои размеры. Уровень бактериальной обсемененности ран во всех группах составлял 10^{6-7} микробных тел на 1 см^2 . В группах контроля стенки раневых дефектов сохраняют свою плотность, спаяны с окружающими тканями, вокруг раны сохраняется плотный инфильтрат, при механическом воздействии из раны выделяется гной. Дно раны покрыто гнойной пленкой.

У пациентов группы контроля № 1 (контроль основы) раны сохраняют свои размеры до 10 суток эксперимента, при гистологическом исследовании определяется отек, лимфогистиоцитарная инфильтрация и дистрофически-дегенеративные изменения подкожной клетчатки, мышечного слоя (рис. 3). Закрытие раневого дефекта с формированием грануляционной ткани и грубого соединительнотканного рубца (рис. 4) наблюдается к 22–25 суткам эксперимента (таблица). Уровень бактериальной обсемененности ран составлял 10^{5-6} микробных тел на 1 см^2 .

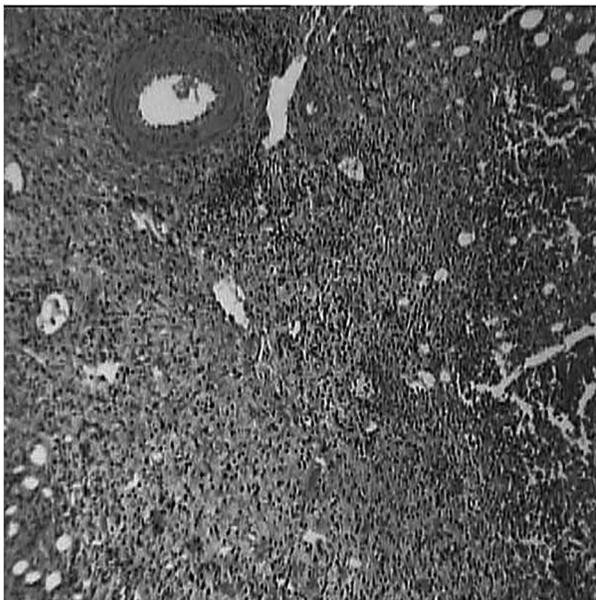


Рис. 1. Очаги некроза в соединительной и мышечной тканях.

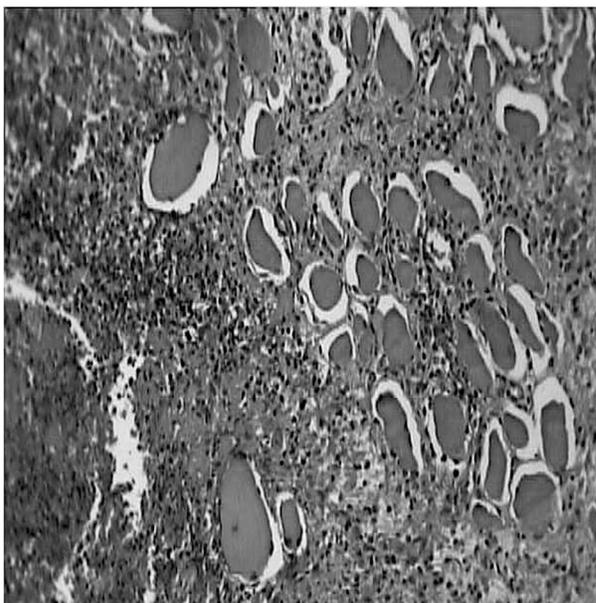


Рис. 2. В воспалительном инфильтрате нейтрофилы, моноциты, макрофаги, плазмциты.

В группе контроля № 2 (традиционное лечение) закрытие раневого дефекта происходит к 20 суткам (таблица), гистологически сохраняются дистрофически-дегенеративные изменения подкожной клетчатки и мышц, дегенеративные изменения нервных стволиков (рис. 3). Уровень бактериальной обсемененности ран составлял 10^{3-4} микробных тел на 1 см^2 .

В экспериментальной группе в 1 сутки после лечения края раневого дефекта мягкие, отека и инфильтрации пальпаторно не определяется, дно раны покрыто налетом

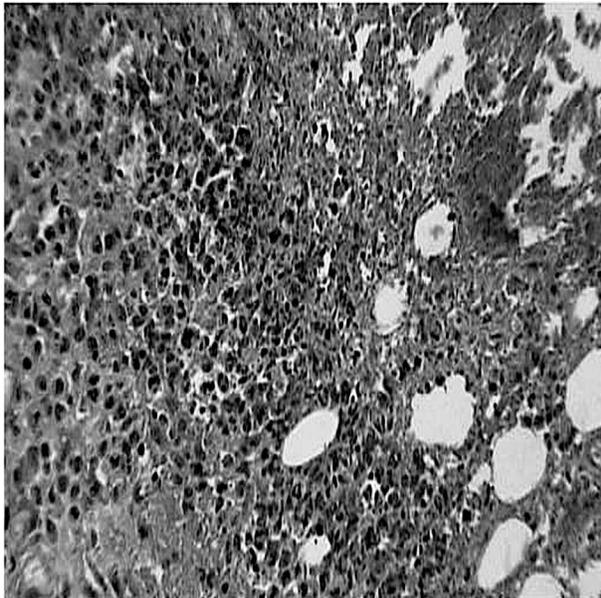


Рис. 3. Лимфогистиоцитарная инфильтрация, дистрофически-дегенеративные изменения, отек.

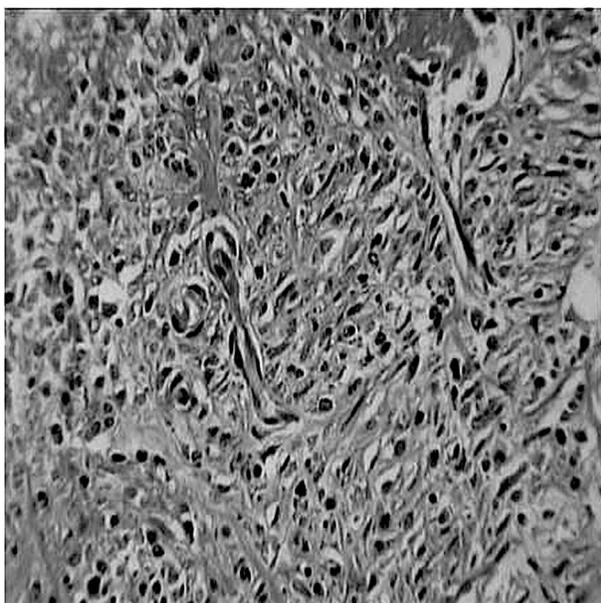


Рис. 4. Формирование грануляционной ткани с 22–25 суток эксперимента, закрытие раневого дефекта с образованием грубого соединительнотканного рубца.

фибрина. Гистологически расширение сосудов синусоидального типа со стазом крови, периваскулярно скопления моноцитов. Уровень бактериальной обсемененности ран составлял 10^{5-6} микробных тел на 1 см^2 .

При иммуногистохимическом исследовании до лечения во всех группах выявляется высокий уровень CD95+. На 1 сутки эксперимента высокий уровень маркера CD95+ 10% остается только в экспериментальной группе.

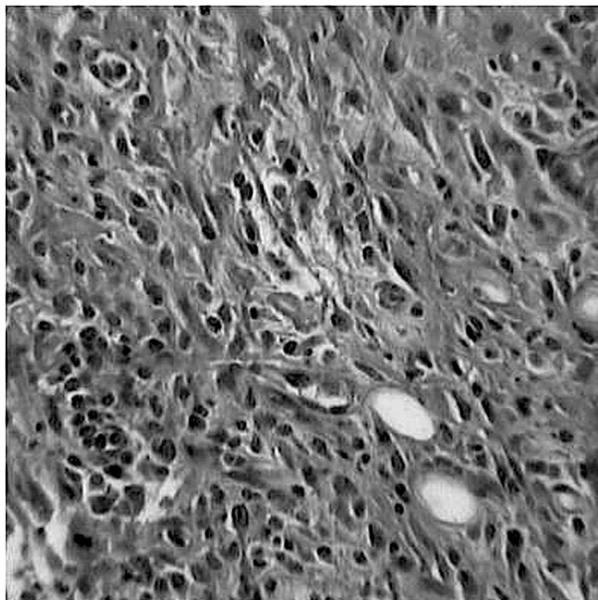


Рис. 5. Трубочатая пролиферация фибробластов и эндотелия сосудов. В подкожной клетчатке определяются неповрежденные нервные стволы.

Результаты исходов лечения

Вид лечения	Срок закрытия раны (сутки)	Исход
Применение основы (группа 1)	20–25	Грубый соединительнотканый рубец
Традиционное (группа 2)	20	Дистрофически измененные кожа и мышцы
Фетальные клетки (экспериментальная группа)	10–15	Сохранение всех слоев кожи

На 5 сутки в экспериментальной группе дефект ткани 0,2–0,3 мм в диаметре покрыт струпом, вокруг дефекта располагается очаг эпителизации до 2,5–3,0 мм в диаметре. Очага инфильтрации вокруг раны нет. Гистологически определяется рыхлая соединительная ткань с небольшой лейкоцитарной инфильтрацией, единичными укрупненными фибробластами, лимфоцитами, плазмócитами, эозинофилами и моноцитами. Очаги пролиферации эндотелия сосудов без просвета, с многорядностью расположения ядер. Уровень бактериальной обсемененности ран составлял 10^{3-4} микробных тел на 1 см^2 .

На 10 сутки в экспериментальной группе дефект кожи отсутствует, определяется очаг эпителизации до 2 см в диаметре. Микроскопически поверхность покрыта многослойным плоским эпителием, подэпителиально определяется лимфоплазмócитарная инфильтрация. Уровень бактериальной обсемененности ран составлял 10^{2-3} микробных тел на 1 см^2 .

На 15 сутки эксперимента в экспериментальной группе полная эпителизация раневого дефекта (таблица). Гистологически отмечается пролиферативная активность клеток фибробластического ряда, трубочатая пролиферация фибробластов и эндоте-

лия сосудов, в подкожной клетчатке определяются неповрежденные нервные стволы (рис. 5). К 7–10 суткам гистологическая картина эпителизации раны с сохранением всех функционирующих структур. У 100% больных посевы бактериальной обсеменности ран были отрицательными.

При иммуногистохимическом исследовании на 5 сутки в экспериментальной группе сохраняется высокий уровень CD95+ (7–8%) и нарастает уровень Ki67 (4–5%). На 10 сутки уровень Ki67 становится 5–10%, а CD95+ 5–8%.

В группе контроля № 1 наблюдается умеренный рост CD95+ и Ki67, в группе контроля № 2 на 5–10 сутки уровень маркеров не отличается от исходного. До 15 суток эксперимента в экспериментальной группе сохраняется высокий уровень Ki67 (8–11%), в группах контроля уровень CD95+ и Ki67 стремится к нулю (0–4%).

Обсуждение. Патогенетически направленное лечение в первую фазу раневого процесса включает купирование воспалительных изменений и ускорение очищения раны (механическая и биологическая некрэктомия, дренирование раны, применение антисептиков). Во вторую и третью фазы течения раневого процесса лечебные мероприятия направлены на стимуляцию процессов репаративной регенерации.

До лечения во всех экспериментальных группах наблюдаются признаки некроза мягких тканей в ответ на прямое воздействие повреждающего агента (травма + инфицирование) с замещением очагов некроза полиморфно-ядерными лейкоцитами, при этом также определяются и мононуклеарные лимфоциты.

В экспериментальной группе после применения клеток-предшественниц очищение раны от гнойно-некротических тканей происходит на 5 сутки лечения, а эпителизация раневого дефекта заканчивается к 27 суткам эксперимента. В группах контроля очищение раны от гнойно-некротических тканей происходит к 20–30 суткам, закрытие раневого дефекта с формированием грубого соединительнотканного рубца — к 35 суткам.

На наш взгляд, значительное (в 5 раз) ускорение фазы очищения в экспериментальной группе по сравнению с группами контроля связано с индуцирующим влиянием клеток-предшественниц на способ гибели клеток в первую фазу раневого процесса.

До начала лечения во всех инфицированных ранах наблюдаются признаки некроза мягких тканей. При этом, исследуя количество лимфоцитов с активированным CD95+ установили одинаковый уровень маркера во всех экспериментальных группах до начала лечения. Также во всех группах наблюдается примерно одинаковый уровень маркера пролиферации — Ki67. В экспериментальной группе при применении клеток-предшественниц на 1–3 сутки эксперимента наблюдается рост носителей CD95+ с последующим его снижением, начиная с 3–5 суток.

Начиная с 1 суток, наблюдается рост носителей маркера Ki67 и продолжается до 15 суток эксперимента. На 3–5 сутки возникает «перекрест маркеров» (диаграмма 1), что, на наш взгляд, характеризует переход первой фазы раневого процесса во вторую: завершение процессов гибели клеток и начало активных пролиферативных процессов. Эпителизация раны без образования соединительнотканного рубца с восстановлением функции поврежденного участка (рост волосяного покрова) характеризуют потенцирование аллогенными клетками-предшественницами механизмов физиологической репаративной регенерации.

В группе контроля № 2 (традиционное лечение) наблюдается снижение уровня маркера готовности клеток к апоптозу на 5 сутки эксперимента наблюдается некоторый всплеск уровня маркера пролиферации с дальнейшим его уменьшением практически до нуля (диаграмма 2).

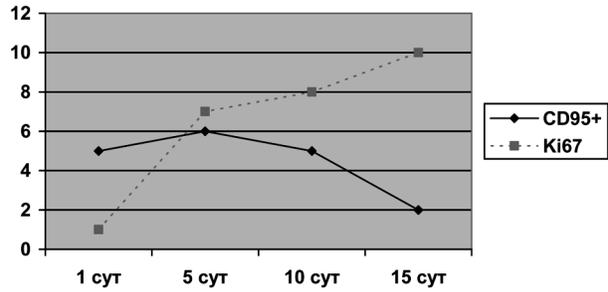


Диаграмма 1. Динамика маркеров апоптоза и пролиферации при применении клеток-предшественниц в лечении инфицированных ран мягких тканей.

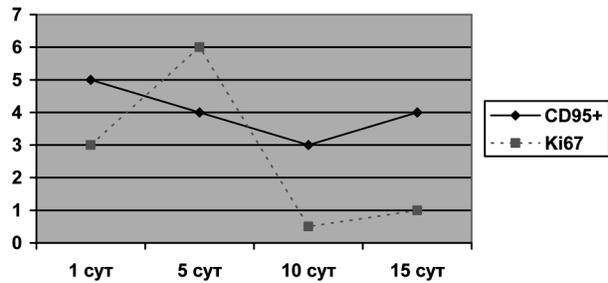


Диаграмма 2. Динамика маркеров апоптоза и пролиферации при традиционном лечении инфицированных ран мягких тканей.

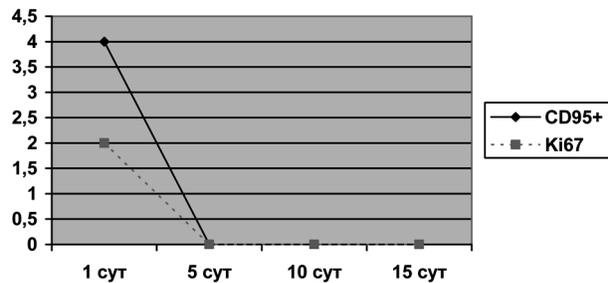


Диаграмма 3. Динамика маркеров апоптоза и пролиферации в течении раневого процесса инфицированной раны мягких тканей при применении основы.

В группе контроля №1 (применение основы) к 3–5 суткам наблюдается резкое падение как маркера готовности клеток к апоптозу, так и маркера пролиферации (диаграмма 3).

Выводы:

1. Применение клеток-предшественниц приводит к ускорению течения всех фаз восстановительного процесса.
2. Регенерация в условиях применения клеток-предшественниц основана на физиологических механизмах апоптоза и пролиферации, что соотносится с разнонаправленной динамикой маркеров Ki 67 и CD95+.

3. Репаративная регенерация в условиях применения клеток-предшественниц позволяет добиться полного восстановления структуры и функции в области раневого дефекта. Таким образом, применение клеток-предшественниц открывает совершенно новые перспективы регуляции раневого процесса.

Литература

1. *Morgan T. H.* Regeneration // N.Y.: MacMillan. 1901. 316 p.
2. *Spremann H.* Embryonic development and induction // New Haven: Yale Univ. press. 1938. 401 p.
3. *Воронцова М. А.* Регенерация органов у животных // М.: Сов. Наука, 1949. 270 с.
4. Воспаление. Руководство для врачей // Под ред. С. В. Серова, В. С. Паукова. М.: Медицина, 1995. 640 с.
5. *Полежаев Л. В.* Регенерация путем индукции // М.: Наука, 1977. 184 с.
6. *Рябинин В. Е.* Использование методов клеточной и эфферентной терапии при лечении печеночной недостаточности // II Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2002. № 1. С. 42–49.
7. *Bainton D. F.* The cell of inflammation: A general review // In: The cell biology of inflammation. Amsterdam: Elsevier: North-Holland, 1980. P. 1–15.
8. *Max S. R., Wagner K. R.* Induction of pentose phosphate pathway enzymes in regenerating skeletal muscle // In: Muscle regeneration. N. Y.: Raven. 1979. P. 475–483.
9. *Robbins S. L.* Pathologic basis of disease // Philadelphia, Saunders. 1974. 1595 p.
10. *Карлсон Б. М.* Регенерация. // М.: Наука, 1986. 296 с.
11. *Курильская Т. Е.* Патогенетическое обоснование фетальной терапии в профилактике и комплексном лечении ишемической болезни сердца. // Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Иркутск, 1999. 35 с.
12. *Люзнер Л. Д.* Основные проблемы в учении о регенерации. // М.: Наука, 1975. 103 с.
13. *Станков Д. С., Катунян П. И., Крашенинников М. Е.* Нейротрансплантация в лечении травмы спинного мозга // II Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2003. № 1. С. 44–52.
14. *Ченцова Е. В., Петриашвили Г. Г., Фомина И. А. и др.* Применение фетальных клеток роговицы человека для лечения различной патологии органа зрения // Офтальмохирургия. 1999. № 4. С. 2–9.
15. *Шумаков В. И., Расулов М. Ф.* Сравнительная оценка эффективности применения аллогенных эмбриональных фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для терапии глубоких ожоговых ран // II Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2002. № 4. С. 7–11.
16. *Wolpert L.* Positional information and pattern formation // Curr. Top. Develop. Biol. 1971. Vol. 6. P. 183–224.

Статья поступила в редакцию 15 июня 2010 г.