

© Петренко О. М., Зубов Д. О., Родніченко А. Є., Безродний Б. Г.

УДК 616-002.3-89:615.361.014.41

¹Петренко О. М., ^{2,3}Зубов Д. О., ^{2,3}Родніченко А. Є., ¹Безродний Б. Г.

ЗАСТОСУВАННЯ КЛІТИННИХ ТЕХНОЛОГІЙ В ЛІКУВАННІ ХРОНІЧНИХ РАНОВИХ ДЕФЕКТІВ

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця (м. Київ)

²ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини
НАМН України» (м. Київ)

³Біотехнологічна лабораторія *ilaya.regeneration*,
Медична компанія *ilaya®* (м. Київ)

olegnpetrenko@ukr.net

Робота є фрагментом НДР «Розробка та впровадження методів діагностики та лікування гострої хірургічної патології органів черевної порожнини та гнійних захворювань м'яких тканин», № державної реєстрації 0114U003980.

Вступ. Хірургічне лікування хронічних ранових дефектів залишається однією із актуальних проблем сучасної хірургії, вирішення якої полягає у закритті дефектів шкіри та, у ряді випадків, збереження опорної функції нижньої кінцівки. Ампутації на рівні стопи та некретомії при синдромі діабетичної стопи, розкриття флегмон та гнояків, в комплексному лікуванні гнійно-некротичних ускладнень бешихи та некротичних фасциїтів може призводити до утворення обширних ранових дефектів, які у подальшому потребують пластичного закриття [1].

Патолофізіологія ран, які тривало не загоюються, складна та різноманітна, але усі вони мають одну загальну властивість – тривалий перебіг запалення, яке призводить до значного ураження тканин та перешкоджає загоєнню. За ряду умов раньовий процес набуває хронічного характеру. До цих умов можна віднести синдром діабетичної стопи, венозні трофічні виразки гомілки, пролежні, ішемічні виразки. Для даних патологічних станів характерно наявність ознак усіх 3 фаз раньового процесу. Дно даної рани одночасно покрито фібрином та грануляціями, можливо наявність ділянок некрозу та гнійного вмісту. Грануляції, зазвичай, в'ялі та бліді, краї рани навколо набряклі та щільні, інколи має місце крайова епітелізація. Характерним для ран, що тривало не загоюються є підвищена активність тканинних ферментів, які руйнують екстрацелюлярний матрикс, підвищена імунізація тканин, порушена васкуляризація та знижена здатність тканин до регенерації через активацію тканинних прозапальних цитокінів. За рахунок даних факторів пластичне закриття хронічних ран, як правило, призводить до лізису трансплантатів.

Не дивлячись на наявність значної кількості методик у лікуванні хронічних ран, результати залишаються не втішними. Продовжується пошук нових лікарських препаратів як природних, так і біосинтезованих. До сучасних перев'язувальних матеріалів висувається ряд вимог. Пов'язка має бути не тільки антисептиком, але і активно стимулювати репара-

тивні процеси в рані, враховуючи порушення обміну речовин, ангіо та нейропатію, які мають місце у хронічних ранах. Останнім часом для лікування ран поряд із біотехнологічними розробками (колагенопластика, ксеноскіра, біополімерні покриття), стали застосовувати методи клітинної терапії [2,3].

На сьогодні одним із прогресивних методів лікування є трансплантація алогенних мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) жирової тканини отриманих *in vitro*. Підтверджена численними дослідженнями плюрипотентність МСК робить їх найбільш перспективними для застосування в регенераторній медицині. Клітини транспортують до рани шляхом ін'єкцій або на біодеградуючих матрицях на основі колагену, фібрину або гіалуронової кислоти. Доведено, що при введенні МСК на післяопіковій рани прискорює процеси васкуляризації та епітелізації, що призводить до її швидкого та якісного загоєння. Дані ефекти досягаються шляхом стимуляції росту судин завдяки секреції фактору росту епітелію (VEGF). Разом з тим, МСК мають імуносупресорну дію (пригнічують активність Т-лімфоцитів), протизапальну дію. Даним клітинам властива низька імуногенність. МСК вивільнюють сигнальні клітини, які стимулюють не тільки ушкоджені, але й здорові клітини, таким чином регенеруючи навколишні тканини [4,5,6].

Тому **метою роботи** було дослідження механізмів та оцінка ефективності застосування дермального еквіваленту (ДЕ), що складається із фібринового гідрогелю та культивованих алогенних мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини (ММСК-ЖТ) на перебіг раньового процесу у пацієнтів з хронічними рановими дефектами.

Об'єкт і методи дослідження. Обстежено 41 пацієнта із хронічними рановими дефектами, які знаходились на стаціонарному лікуванні у відділенні гнійно-септичної хірургії київської міської лікарні № 4 (клінічна база кафедри хірургії № 2 НМУ ім. О. О. Богомольця) за період 2015-2016 роки. Серед них було 24 (%) чоловіків та 17 (%) жінок віком від 43 до 78 років. Середній вік пацієнтів становив 65,4±4,2 роки. Середня тривалість ранових дефектів складала 5,4±0,5 роки. Патологічними станами, які приводили до утворення ранових дефектів були: наслідки гнійно-некротичних фасциїтів – 6 пацієнтів,

ускладнення бульозно-некротичної форми бешихи (9), пост травматичні ураження нижніх кінцівок (5), венозні варикозні виразки (5) та пацієнти із гнійно-некротичними ускладненнями синдрому діабетичної стопи (16).

За час перебування в стаціонарі пацієнти отримували потужну етіопатогенетичну терапію. Усім пацієнтам проводили комплексну дезагрегантну, судинну та антибіотикотерапію, а також адекватну медикаментозну терапію направлену на підтримання функціонального стану основних органів та систем життєзабезпечення організму, корекцію хронічної ішемії нижніх кінцівок.

Більшість пацієнтів (78%) мали супутні захворювання (ішемічна хвороба серця, гіпертонічна хвороба, хронічні захворювання легень, ожиріння, дисцирляторна енцефалопатія), яким проводилась симптоматична терапія. Обстеження пацієнтів передбачало визначення загально клінічних та біохімічних лабораторних показників.

З діагностичною метою хворим проводилось визначення кровообігу за допомогою ультразвукового доплерівського дослідження. Стан кісткової системи оцінювали рентгенологічно.

Оперативні втручання здійснювались під загальним знеболенням в усіх 41 пацієнтів. При виборі хірургічної тактики враховувалась клінічна форма, уточнювався етіологічний фактор, характер та глибина уражень тканин, варіанти розповсюдження гнійного процесу а також кількісний та якісний характер мікрофлори. В подальшому у пацієнтів, в післяопераційному періоді сформувались обширні ранові поверхні, дном яких були кістки, сухожилля та м'язи. В результаті проведеного лікування відбувалось завершення гнійно-некротичної фази із переходом у фазу грануляцій. Середня площа ранового дефекту становила $98,3 \pm 5,6$ см² (мінімальна 28 см² та максимальна 215 см²), що потребувало проведення аутодермопластики.

Пацієнтів було розділено на 2 групи: групу порівняння – 22 хворих та основну – 19 пацієнтів. По нозології, віковим та статевим ознакам, супутній патології групи були репрезентативні. Місцева терапія в I фазу ранового процесу у хворих обох груп проводилась за загальними правилами та не відрізнялась по суті.

В II фазу ранового процесу у пацієнтів групи порівняння застосовували мазі: левомеколь, мірамістин, метилуруцилова, облепіхова олія.

У основній групі пацієнтів застосовували дермальний еквівалент (ДЕ), що складається із фібринового гідрогелю та культивованих алогенних мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини (ММСК-ЖТ).

ДЕ виготовляли на основі пулованої та обстеженої донорської плазми, з додаванням ММСК-ЖТ із розрахунку 1 млн. клітин на 1 мл фібринового гідрогелю.

Біологічний матеріал (ліпоаспірат) було отримано від донора. Ізолювання ММСК-ЖТ проводили за загально прийнятими методиками. Тобто, для ферментативного дезагрегування ліпоаспірату використовували 0,2% розчин колагенази IA (Sigma,

США). Отриману суспензію стромально-васкулярної фракції ліпоаспірату висівали в культуральні флакони (SPL, Південна Корея) площею 75 см². Культивування ММСК-ЖТ до п'ятого пасажу проводили в мультифлашках загальною площею 875 см² (Corning, США) в живильному середовищі alpha MEM (Sigma, США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (ETC; Sigma, США), 10 мМ L-глутаміну (Sigma, США) та по 100 МО/мл пеніциліну та стрептомицину (Дарниця, Україна), в мультигазовому інкубаторі (Binder, Німеччина) при 37°C і 5% атмосфері CO₂ і 5% O₂. Зміна середовища проводилась кожну 3-4 добу культивування. Методом проточної цитофлуориметрії було виявлено, що ММСК-ЖТ є позитивними на стромальні маркери та негативними на гемопоетичні, і мають наступний фенотип: CD90⁺/CD73⁺/CD105⁺/CD34⁻/CD45⁻/HLA-DR⁻ [5,6].

Полімеризацію фібринового гідрогелю проводили у пластикових чашках Петрі діаметром 100 мм та з атравматичною марлевою пов'язкою на дні типу Grassolind neutral (Hartmann, Germany) для зручності маніпулювання. Один відсоток рани закривався двома такими чашками Петрі з ДЕ (20 млн. клітин). У середньому використовували 1-2 чашки на маніпуляцію.

ДЕ дозволений до клінічного застосування: ліцензія МОЗ України на медичну практику, серія АГ № 598879 від 07.06.2012; ліцензія МОЗ України на діяльність банків пуповинної крові, інших тканин та клітин людини, серія АЕ № 186342 від 12.07.2013. Клітини ДЕ секретують значну кількість біоактивних ліпідів, цитокинів, хемокінів, метаболітів та факторів росту. При застосуванні ДЕ з клітинами, останні стимулюють репаративні процеси в рані за рахунок паракринного (трофічного) впливу та імунomodуючої, протизапальної, протимікробної, протифібротичної та нейротрофічної дії.

Дермальний еквівалент застосовували у вигляді апікацій на гранулюючу ранову поверхню та після проведення аутодермопластики, накладаючи даний препарат на трансплантат. Перев'язки проводили через дві, три доби. В залежності від кількості ексудату, який продукується раною. Перев'язки проводили до готовності рани до проведення дерматопластики.

Критеріями оцінки ефективності лікування були: візуальна оцінка регенеративних процесів в ділянці рани; динаміка больового синдрому.

Результати досліджень та їх обговорення. Візуальну оцінку регенеративних процесів в ділянці рани (наявність грануляцій, епітелізація, кількість ранового вмісту, стан навколишніх тканин) проводили за допомогою системи підрахунку балів на початку, при перев'язках (кожні 3 доби) та в кінці лікування (табл. 1).

Згідно бальної системи оцінювання стану рани, мінімальна сума балів може складати 2 бали, а максимальна – 10. Збільшення кількості балів свідчить за сприятливі умови та загоєння рани.

У всіх пацієнтів на початку дослідження відмічались в'ялі грануляції, відсутність епітелізації, інтенсивна або помірна ексудація, наявність мацерації навколишніх тканин.

Таблиця 1.

Бальна оцінка стану рани

Показники	Бали
Грануляції	1 – немає 2 – в'ялі 3 – хороші
Епітелізація	0 – відсутня 1 – слаба 2 – виражена
Виділення із рани (ексудація)	1 – інтенсивна 2 – помірна 3 – відсутня
Дерматит	0 – присутній 2 – відсутній

На третю добу у пацієнтів основної групи було відмічено збільшення кількості балів за рахунок зменшення ексудації, відсутність явищ дерматиту. Разом з тим, уже на третю добу пацієнти перестали скаржитись на болі, свербіж та гіперемію в ділянці рани. На п'яту добу дослідження у пацієнтів основної групи кількість балів значно наростає за рахунок зменшення ексудації, появи грануляцій. Навколишні тканини були без набряку та явищ дерматиту. Мала місце крайова епітелізація рани.

Починаючи з восьмої доби кількість балів значно перевищувала кількість балів у групі порівняння. Візуально рани у пацієнтів основної групи відмічались більш рясними грануляціями, задовільною крайовою епітелізацією, помірною ексудацією та відсутністю реакції з боку навколишніх шкіряних покривів (**табл. 2**). У пацієнтів групи порівняння на восьму добу лікування мали місце скарги на важкість в ділянці рани, болі. Грануляції були дрібнозернистими та блідими. Крайова епітелізація була синюшна. Явищ мацерації не було, натомість мав місце свербіж навколишніх тканин.

Таблиця 2.

Візуальна оцінка регенеративних процесів рани в динаміці

Групи спостереження	Кількість балів			
	1 доба	3 доба	5 доба	8 доба
Основна група n=19	5,5	7,3	8,2	9,6
Група порівняння n=22	5,4	5,5	6,0	6,4

Важливим показником ефективності лікування є інтенсивність больового синдрому, ступінь якого оцінювали за допомогою візуальної аналогової шкали.

На початку дослідження, в першу добу лікування, 100% пацієнтів обох груп оцінювали больові відчуття як помірні. Дана характеристика болі пояснюється нещодавно проведеним оперативним втручанням та хірургічною корекцією ран. На третю добу у всіх пацієнтів основної групи відмічали зменшення больового синдрому до

слабої у 10 пацієнтів, та повного зникнення болі у 9 хворих. У пацієнтів контрольної групи усі пацієнти (22 хворих) не відмічали будь-яких змін у больових відчуттях. На 5 добу усі пацієнти основної групи відмічали повну відсутність больового синдрому. В той же час у пацієнтів групи порівняння на 5 добу дослідження 12 пацієнтів відмічали зменшення больового синдрому до слабого. На восьму добу лише 8 пацієнтів у групі порівняння відмічали слабкий больовий синдром лише під час проведення перев'язок (**табл. 3**).

Аплікації алогенних стромальних клітин на раньову поверхню, після очищення рани, дозволяє доставити дані клітини безпосередньо до грануляційної тканини, суттєво знижує небажані втрати лікувального ефекту, пов'язаних з можливим швидким розпадом та загибеллю стромальних клітин. Це дозволяє суттєво покращити результати лікування хронічних ран: ініціювати репаративні процеси в грануляційній тканині, стимулювати ангіогенез, зменшити явища запалення у рані, підготувати рану до пластичного закриття. Разом з тим, дані клітини можна наносити на раньову поверхню у будь-який потрібний момент, в залежності від процесів, які відбуваються в рані. Повне приживлення трансплантатів досягається за рахунок покращення васкуляризації та трофіки грануляційної тканини, стимуляції залишкових епітеліальних ділянок шкіри, зменшення ознак запалення, імунорегулюючої та антифібротичної активності клітин.

Застосування дермального еквіваленту відбувалось без ускладнень. Пов'язка Grassolind neutral видалялась на третю добу лікування. В подальшому застосовували пов'язки із розчинами антисептиків. Марлеві серветки не «вросли» та не присихали до рани, а при проведенні перев'язок поверхневі серветки легко видалялись. У фазі регенерації пацієнти отримували пов'язки із облепіховою олією або мазями на жировмісній основі.

Висновки

1. Застосування дермального еквіваленту, що складається із фібринового гідрогеля та культивованих алогенних мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини у пацієнтів із хронічними рановими дефектами дозволило прискорити розвиток регенеративних процесів в ранах та в більш короткі терміни підготувати рану до подальшого етапу лікування – дерматопластики.

2. При використанні даного дермального еквіваленту пацієнтами відмічено зменшення больового

Таблиця 3.

Візуальна аналогова шкала болі

	Основна група n=19				Контрольна група n=22			
	1 доба	3 доба	5 доба	8 доба	1 доба	3 доба	5 доба	8 доба
Болі немає	-	9	19	19	-	-	-	14
Біль слаба	-	10	-	-	-	-	12	8
Біль помірна	19	-	-	-	22	22	10	-
Біль сильна	-	-	-	-	-	-	-	-

синдрому до слабого протягом перших трьох днів лікування.

Перспективи подальших досліджень. Застосування клітинних технологій у лікуванні хронічних ранових дефектів є перспективним напрямком в лікуванні даної патології. Враховуючи той факт, що кількість ран, які тривало не загоюються, не зменшу-

ється, подальші методи лікування будуть направлені на закриття ранових дефектів із одночасною стимуляцією регенераторних процесів у ранах. В цьому плані провідну роль будуть відігравати клітинні технології, які із розвитком наукового прогресу будуть удосконалюватись та ставати більш доступними.

Література

1. Бреговский В.Б. Поражение нижних конечностей при сахарном диабете / В.Б. Бреговский. – СПб.: Диля. – 2004. – 263 с.
2. Винник Ю.С. Клеточные технологии и тканевая инженерия в лечении длительно не заживающих ран / Ю.С. Винник, А.Б. Салмана, А.И. Дробушевская, О.В. Теплякова, Е.А. Пожиленкова, Л.Д. Зыкова // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2001. – Т. 4, № 2. – С. 392-397.
3. Петренко А.Ю. Стволовые клетки из жировой ткани / А.Ю. Петренко, Э.Н. Иванов, Ю.А. Петренко // Биотехнология. – 2008. – Т. 1, № 4. – С. 39-48.
4. Bello Y.M. Tissue-engineered skin in wound healing / Y.M. Bello, A.F. Falabella, W.H. Eaglstein // Am. J. Dermatol. – 2000. – Vol. 2, № 5. – P. 305-315.
5. Gareth E. Jones Human Cell Culture Protocols / E. Jones Gareth. – Totowa, New Jersey: Humana Press, 1996. – 545 p.
6. Zuk P.A. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / P.A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian [et al.] // Mol. Biol. Cell. – 2002. – Vol. 13. – P. 4279-4295.

УДК 616-002.3-89:615.361.014.41

ЗАСТОСУВАННЯ КЛІТИННИХ ТЕХНОЛОГІЙ В ЛІКУВАННІ ХРОНІЧНИХ РАНОВИХ ДЕФЕКТІВ

Петренко О. М., Зубов Д. О., Родніченко А. Є., Безродний Б. Г.

Резюме. В статті наведена оцінка ефективності застосування дермального еквівалента (ДЕ) на основі фібринового гідрогеля та культивованих алогенних мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини (ММСК-ЖТ) на перебіг раньового процесу у пацієнтів із ранами, які тривало не загоюються. Виявлено прискорення регенеративних процесів при застосуванні поверхневої аплікації ДЕ за рахунок зменшення запальної реакції у рані (візуальна оцінка регенеративних процесів в ділянці рани, динаміка болювального синдрому), прискорення темпів васкуляризації та дозрівання повноцінної грануляційної тканини.

Ключові слова: дермальний еквівалент, мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини з жирової тканини (ММСК-ЖТ), хронічні ранові дефекти.

УДК 616-002.3-89:615.361.014.41

ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКИХ РАНЕВЫХ ДЕФЕКТОВ

Петренко О. Н., Зубов Д. А., Родниченко А. Е., Безродный Б. Г.

Резюме. В статье приведена оценка эффективности применения дермального эквивалента (ДЭ) на основе фибринового гидрогеля и культивированных алогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на течение раневого процесса у пациентов с длительно не заживающими ранами. Выявлено ускорение регенеративных процессов в гнойных ранах при использовании поверхностной аппликации ДЭ за счет уменьшения воспалительной реакции в ране (визуальная оценка регенеративных процессов в ране и динамика болевого синдрома), ускорения темпов васкуляризации и созревания полноценной грануляционной ткани.

Ключевые слова: дермальний еквівалент, мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини з жирової ткани (ММСК-ЖТ), хронічна рана, ранова мазок, регенеративна медицина.

UDC 616-002.3-89:615.361.014.41

CELL TECHNOLOGIES IN TREATMENT OF NON-HEALING WOUNDS

Petrenko O. M., Zubov D. A., Rodnichenko A. E., Bezrodny B. G.

Abstract. Surgical treatment of chronic wound defects remains one of the urgent problems of modern surgery, the resolution of which comprises skin defects closure and, in some cases, the maintaining of the lower limb support function. Amputation at foot and necrectomy diabetic foot syndrome, opening abscesses and boils in treatment of purulent-necrotic complications of erysipelas and necrotic fasciitis can lead to the formation of extensive wound defects that need further plastic closure.

Despite the presence of a large number of techniques in the treatment of chronic wounds, the results are not reassuring. The search for new drugs of both conventional and biomedical ones is still continuing. There are a number of requirements for modern dressings. The bandage should not be only antiseptic, but also actively promote wound reparative processes, with considering metabolism, angio- and neuropathy that occur in chronic wounds. Recently, for the wound treatment, along with the skin substitutes' approach (collagen plastics, xenogeneic skin substitutes, biopolymer coating), cell therapy methods are widely used.

It is known about regenerative medicine approach with promising results and clinical outcomes in combat casualty when using of cultured multipotent mesenchymal stem/stromal cells. It was also reported the exosomes derived from human MSCs aid the repair of skin burn injuries through paracrine actions.

The aim of our study was to explore the mechanisms and assess the effectiveness of dermal equivalent (DE) application, consisting of a fibrin hydrogel and cultured allogeneic adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells from adipose tissue (MSCs/ADSCs) on wound healing processes in patients with chronic traumatic defects.

Methodology: visual assessment of regenerative processes in the area of the wound (the presence of granulation, epithelization, amount of wound content, state of surrounding tissue) was carried out by means of scoring test at early stage, the dressings changes (every 3 days) and at the end of treatment.

Results and discussion: DE applications on wound surface after cleaning the wound, can deliver the cells to the forming granulation tissue, significantly reducing unwanted loss of therapeutic effect associated with possible rapid collapse and cell death. It can significantly improve the results of chronic wounds' treatment, initiate repair processes in granulation tissue, stimulate angiogenesis, reduce the wound inflammation, and to prepare a wound to plastic closure. However, these cells can be applied over wound surface at any desired time, depending on the processes that occur in the wound. DE effects achieved by improving the vascularization of granulation tissue, stimulation of skin residual epithelial islets, reduce signs of inflammation, immune-regulating and anti-fibrotic activities.

Conclusion: the use of DE in patients with chronic traumatic defects allowed accelerating the regenerative processes triggering in wounds and in less time to prepare a wound for further treatment dermoplasty stage. When using this dermal equivalent marked decrease patient pain to slightly during the first three days of treatment.

Keywords: dermal equivalent, adipose derived multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs/ADSCs), chronic wound, *wound swabbing* techniques, regenerative medicine.

Рецензент – проф. Дудченко М. О.

Стаття надійшла 29.09.2016 року