

Николай Анатольевич ПРОХОРОВ —
врач отделения нейрохирургии
областной клинической больницы № 2 (г. Тюмень),
кандидат медицинских наук

Юрий Геннадьевич СУХОВЕЙ —
директор Института клинической иммунологии
СО РАМН (Тюменский филиал),
доктор медицинских наук, профессор
tumiki@mail.ru

УДК 616.002.46

РЕГЕНЕРАЦИЯ ИНФИЦИРОВАННЫХ РАН В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИЦ

INFECTED WOUNDS REGENERATION IN CONDITIONS OF CELLS OF ORIGIN USAGE

АННОТАЦИЯ. В статье представлены результаты лечения пациентов с инфицированными ранами мягких тканей клетками-предшественницами в виде геля оригинального состава.

SUMMARY. The author describes the results of the treatment of patients with soft tissues infected wounds. The treatment was performed with the help of the cells of origin, in the form of the original gel.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА. Инфицированные раны мягких тканей, клетки-предшественницы, эпителизация, регенерация.

KEY WORDS. Infected wounds of soft tissues, cells of origin, epithelization, regeneration.

Проблема регенерации нормальных и патологически измененных органов нашла широкое отражение в работах ученых XX века [1], [2], [3], [4]. 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 [5], [6], [7], [8], [9].

Внедрение клеточных технологий в практику лечения различных заболеваний показало перспективность этого направления. Клинический эффект применения клеток-предшественниц объясняется их неспецифическим механизмом действия [3]. Тем не менее, несмотря на перспективность применения прогениторных клеток 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.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на 30 пациентах-мужчинах в стандартных условиях, в возрасте от 20 до 30 лет. Раны на голени (3-5 суток), диаметр 30 см². 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% 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 прогенеторные клетки 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% этиловом спирте, заливали в парафин и готовили гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилином Майера и эозином. Парафиновые срезы обрабатывали ферментными иммунными комплексами с проведением внутреннего контроля иммуногистохимических реакций для выявления проапоптотического маркера CD95+ и маркера пролиферации Ki67.

Результаты и обсуждение. До начала лечения раны неправильно округлой формы ее 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 определяются очаги некроза в соединительной и мышечной ткани, расширение кровеносных сосудов со стазом крови, экссудация 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.

На 1 сутки эксперимента во всех группах раны сохраняют свои размеры. В группах контроля стенки раневых дефектов сохраняют 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. Закрытие раневого дефекта с формированием грануляционной ткани и грубого соединительнотканного рубца наблюдается к 22-25 суткам эксперимента.

В группе контроля № 2 (традиционное лечение) закрытие раневого дефекта происходит к 20 суткам, гистологически сохраняются дистрофически-дегенеративные изменения подкожной клетчатки и мышц, дегенеративные изменения нервных стволиков.

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

крыто налетом фибрина. Гистологически расширение сосудов синусоидального типа со стазом крови, периваскулярно скопления моноцитов.

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.

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.

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 лимфоплазмóцитарная инфильтрация.

На 15 сутки эксперимента в экспериментальной группе полная эпителизация раневого дефекта. Гистологически отмечается пролиферативная активность клеток фибробластического ряда, трубчатая пролиферация фибробластов и эндотелия сосудов, в подкожной клетчатке определяются неповрежденные нервные стволы. К 7-10 суткам гистологическая картина эпителизации раны с сохранением всех функционирующих структур.

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%).

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 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», 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 прогенеторными клетками механизмов физиологической репаративной регенерации.

Выводы

1. Применение клеток-предшественниц приводит к ускорению течения всех фаз воспалительного процесса.

2. Регенерация в условиях применения клеток-предшественниц основана на физиологических механизмах апоптоза и пролиферации, что соотносится с разнонаправленной динамикой маркеров Ki67 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карлсон Б.М. Регенерация. М.: Наука, 1986. 296 с.
2. Лиознер Л.Д. Основные проблемы в учении о регенерации. М.: Наука, 1975. 103 с.
3. Полежаев Л.В. Регенерация путем индукции. М.: Наука, 1977. 184 с.
4. Рябинин В.Е. Использование методов клеточной и эфферентной терапии при лечении печеночной недостаточности // II Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2002. № 1. С. 42-49.
5. Воронцова М.А. Регенерация органов у животных. М.: Сов. наука, 1949. 270 с.
6. Воспаление. Руководство для врачей // Под ред. С.В. Серова, В.С. Паукова. М.: Медицина, 1995. 640 с.
7. 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.
8. 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.
9. 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.