Федянин С.Д., Косинец В.А., Коваленко А.А., Самсонова И.В., Галецкая А.А., Яроцкая Н.Н., Клопова В.А.

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Витебск, Беларусь

Fedzianin S., Kosinets V., Kovalenko A., Samsonova I., Galetskaia A., Yarotskaya N., Klopova V.
Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Belarus

Влияние аутологичных аспиратов красного костного мозга на раневой процесс

The Influence of Autological Red Bone Marrow Aspirates
on the Wound Healing Process

Резюме

Цель. Исследовать влияние аутологичных аспиратов красного костного мозга на раневой процесс.

Материалы и методы. Выполнено рандомизированное исследование по изучению влияния аутомиелоаспиратов на раневой процесс у 72 пациентов с хирургическими инфекциями кожи и мягких тканей. Пациенты были разделены на основную и контрольную группы. В основной группе для стимуляции раневого заживления применялись аутологичные аспираты красного костного мозга. Стимуляция выполнялась при наличии признаков хронизации раневого процесса.

Планиметрию производили с помощью метода А.Н. Лызикова и соавторов (2008) и программного обеспечения Adobe Photoshop (Adobe Systems, США). Для оценки клеточной картины приготовление цитологических отпечатков выполняли с применением метода М.П. Покровской и М.С. Макарова (1942). Скорость раневого заживления рассчитывали по формуле Л.Н. Поповой. Кислотность раневого отделяемого определяли с помощью стерильной универсальной индикаторной бумаги. Иммуногистохимическое окрашивание гистологического материала выполнялось с использованием моноклональных антител anti-Collagen Type 1 и Bond™ Ki67. Для морфометрической оценки экспрессии маркера в образцах применяли программное обеспечение ImageJ 1.45s.

Результаты. Скорость заживления ран в основной группе составила 6 [5; 35]% в день, а в контрольной группе – 3 [3; 28]% в день и в 2 раза была достоверно выше при применении аутологичных аспиратов красного костного мозга ($p < 0,001$).

Сроки подготовки ран к пластическому закрытию в основной группе составили 5 [3; 7] дней, а в контрольной – 12 [9; 15] дней ($p < 0,001$).

Выявлено достоверное увеличение интенсивности экспрессии маркеров COL1 и Ki67 при применении аутомиелоаспиратов.

Выводы. Аутологичные аспираты красного костного мозга являются мощными стимуляторами раневого заживления.

Ключевые слова: хирургическая инфекция, гнойная рана, аутомиелоаспират, COL1, Ki67.

Abstract

Purpose. To study the effect of autologous red bone marrow aspirates on the wound healing process.

Materials and methods. A randomized study was carried out to study the effect of automyeloaspirates on the wound healing process in 72 patients with surgical infections of the skin and soft tissues. Patients were divided into main and control groups. In the main group autologous red bone marrow aspirates were used to stimulate wound healing. Stimulation was performed in case of chronic wound healing signs.

For planimetry the method of A.N. Lyzikov et al. (2008) and Adobe Photoshop software (Adobe Systems, USA) was used. To estimate the cellular pattern the cytological specimens were prepared with the M.P. Pokrovskaya and M.S. Makarov method (1942). The rate of wound healing was calculated using the formula of L.N. Popova. To determine the acidity of the wound discharge sterile the universal indicator paper was used. Immunohistochemical staining of histological material was performed using anti-Collagen Type 1 and Bond™ Ki67 monoclonal antibodies. For morphometric assessment of the samples markers expression the ImageJ 1.45s software was applied.

Results. The rate of wound healing in the main group was 6 [5; 35]% per day, and in the control group – 3 [3; 28]% per day and 2 times was significantly higher comparing with autologous red bone marrow aspirates ($p < 0,001$).

The duration of the wounds preparation for surgical plastic in the main group was 5 [3; 7] days, and in the control – 12 [9; 15] ($p < 0,001$).

A significant increase in the COL1 and Ki67 markers expression intensity was revealed in case of automyeloaspirates the use.

Conclusions. Thus, autologous bone marrow aspirates are potent stimulators of wound healing.

Keywords: surgical infection, purulent wound, automyeloaspirate, COL1, Ki67.

■ ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительный прогресс в клинической медицине, проблема лечения хирургических инфекций кожи и мягких тканей (ХИКМТ) остается весьма злободневной и требует существенных затрат финансовых ресурсов. Это определяется значительным числом гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей и послеоперационных гнойных осложнений. Удельный вес пациентов данной категории составляет порядка 40% лиц хирургического профиля [1, 2].

Перспективы в улучшении результатов лечения пациентов с ХИКМТ различной этиологии открыло внедрение в клиническую практику новых методов лечения (применение воздушных плазменных потоков, фотодинамической терапии, гидрохирургической обработки, тромбоцитарного концентрата). Однако и этот большой арсенал методов и средств не всегда приносит желаемый результат [1–3].

В последние десятилетия клеточные технологии начинают все более широко использоваться в лечении ХИКМТ. В Республике Беларусь разработан и внедрен в практику метод лечения трофических язв с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани, который характеризуется высокой эффективностью [4]. Однако стоимость данных методов достаточно велика, они могут использоваться

только в высокоспециализированных центрах и невыполнимы на уровне базового звена системы здравоохранения.

Поэтому альтернативой могут стать низкозатратные и доступные для базового звена системы здравоохранения методы стимуляции раневого заживления аутологичными аспиратами красного костного мозга [5–7].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовать влияние аутологичных аспиратов красного костного мозга на раневой процесс.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Республики Беларусь в рамках задания 4.3.19 «Разработать метод стимуляции раневого заживления» Государственной программы научных исследований «Трансляционная медицина», подпрограмма 4.3 «Инновационные технологии клинической медицины» (№ государственной регистрации 20200229 от 24 февраля 2020 г.) на базе учреждения здравоохранения «Витебская областная клиническая больница».

Проведено проспективное простое контролируемое рандомизированное клиническое исследование течения 2-й фазы раневого процесса у 72 пациентов с гнойными ранами различного происхождения и локализации в период с 2017 по 2021 г. Рандомизацию осуществляли методом игральные кости. При выпадении четного значения пациента относили к основной группе, нечетного – к контрольной.

Критериями включения в исследование были: возраст от 18 до 80 лет обоих полов, раны с признаками хронизации раневого процесса 2–4-го уровня поражений по классификации Ahrenholz D.H., компенсация соматической патологии, наличие информированного согласия пациента на участие в исследовании. Критериями хронизации раневого процесса являлись: отсутствие динамики раневого процесса, выражающееся в замедлении формирования и созревания грануляционной ткани, воспалительно-регенераторный или регенераторно-воспалительный тип цитогрaмм в мазках-отпечатках из ран, pH раневого отделяемого, равное 8.

Для стимуляции раневого заживления применялись аутологичные аспираты красного костного мозга. Под общей анестезией в месте прикрепления 3–4-го ребра по передней срединной линии иглой И.А. Кассирского выполнялся стерноцентез и аспирировался красный костный мозг. Ложкой Фолькмана производилось снятие налетов фибрина с раневой поверхности. Красный костный мозг вводился в края раневого дефекта путем инъекций и наносился на раневую поверхность, после чего накладывалась асептическая повязка. Выполнение процедуры производилось однократно.

Критериями исключения пациентов из исследования являлись: возраст меньше 18 лет, раны 1-го уровня поражения по классификации Ahrenholz D.H., наличие инфекции костей и суставов, ожоговые раны, беременность, тяжелая сопутствующая патология (застойная сердечная недостаточность, почечно-печеночная недостаточность,

онкологические заболевания в анамнезе до 5 лет после радикального лечения, системные заболевания соединительной ткани, инфаркт миокарда, пневмония, сепсис, кровотечение, декомпенсированный сахарный диабет, кахексия, психические нарушения). Также исключались пациенты, злоупотребляющие алкоголем, с лекарственной или наркотической зависимостью.

Таким образом, основную группу составили 37 пациентов (20 женщин (54,05%) и 17 мужчин (45,95%)), у которых применялся разработанный метод. Средний возраст в выборке составил $63,76 \pm 2,6$ года, площадь ран – $88,67 \pm 8,04$ см². Средний объем вводимого аутомиелоаспирата составил $34,46 \pm 3,23$ мл. Сахарным диабетом страдали 17 (45,95%) пациентов, облитерирующим атеросклерозом нижних конечностей – 7 (18,92%).

Контрольную группу составили 35 пациентов (18 женщин (51,43%) и 17 мужчин (48,57%)), у которых применялось традиционное комплексное лечение. Средний возраст в выборке составил $64,9 \pm 2,5$ года, площадь ран – $85,68 \pm 10,07$ см². Сахарным диабетом страдали 18 (51,43%) пациентов, облитерирующим атеросклерозом нижних конечностей – 5 (14,29%).

И в контрольной, и в основной группах гнойные раны возникли после хирургической обработки острых гнойно-воспалительных процессов мягких тканей, после травм, вследствие инфекции области хирургического вмешательства.

Основную часть обследованных пациентов составили лица с гнойными ранами после хирургической обработки острых гнойно-воспалительных процессов мягких тканей (гнойников): 36 человек (50%), в основной группе – 13 пациентов (18,06%), в контрольной – 23 (31,94%).

У 19 (26,39%) пациентов диагностирована инфекция области хирургического вмешательства: 12 пациентов в основной группе (16,67%) и 7 (9,72%) в контрольной. В подавляющем большинстве случаев инфекция развилась после ампутаций сегментов нижних конечностей: 11 случаев (15,28%) в основной группе (7 (9,72%) – после ампутации бедра; 1 (1,39%) – после ампутации голени; 3 (4,17%) – после ампутации пальцев стопы) и 7 случаев (9,72%) в контрольной группе (после ампутации бедра – 3 (4,17%), после ампутации голени – 4 (5,56%)). По глубине распространения все инфекции области хирургического вмешательства были глубокие с вовлечением фасций и мышц.

Раны травматического генеза встречались после бытовой травмы в 17 (23,61%) случаях – 12 (16,67%) в основной группе, 5 (6,94%) – в контрольной.

На фоне сахарного диабета раневой процесс на нижних конечностях протекал у 15 (40,5%) пациентов в основной группе и у 9 (25,71%) пациентов контрольной группы. У всех пациентов выявлена ХАН 3–4-й стадии по классификации Покровского – Фонтейна.

У 7 (18,92%) пациентов основной группы и у 5 (14,29%) контрольной с облитерирующим атеросклерозом нижних конечностей выявлена ХАН 3–4-й стадии по классификации Покровского – Фонтейна.

Основная и контрольная группы статистически значимо не отличались по полу, возрасту, наличию сопутствующих заболеваний, размерам раневых дефектов ($p > 0,05$).

Всем пациентам при поступлении и в процессе лечения проводилось общепринятое клиническое обследование, включающее детальное изучение локального статуса (локализация патологического очага, сроки с момента возникновения и длительность течения гнойно-некротического процесса, оперативные вмешательства в анамнезе); выполнялись также общий и биохимический анализы крови, мочи, анализ крови на группу и резус, коагулограмма, ЭКГ.

Планиметрию проводили по методу А.Н. Лызикова и соавт. [8] и с использованием программного обеспечения Adobe Photoshop (Adobe Systems, США).

Скорость раневого заживления рассчитывали по формуле Л.Н. Поповой. Для оценки клеточной картины приготовление цитологических отпечатков выполняли с применением метода М.П. Покровской и М.С. Макарова [9].

Кислотность раневого отделяемого определяли с помощью стерильной универсальной индикаторной бумаги (ООО «Экротим», Российская Федерация).

Иммуногистохимическое окрашивание выполняли в автоматическом режиме с использованием моноклональных антител anti-Collagen Type 1 (FNab01836, China), Bond™ Ki67 (MM1) (PA0118, UK) с помощью иммуногистостейнера Leica BOND-MAX. Морфометрическую оценку экспрессии маркера осуществляли при 200-кратном увеличении в 10 случайно выбранных полях зрения на бинокулярном микроскопе Leica DM 2000 с цифровой камерой и лицензионной программой Leica Application Suite, version 3.6.0. и с использованием программы ImageJ 1.45s. Результаты экспрессии маркеров выражали в пикселях.

Статистическую обработку полученных данных производили с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 и Microsoft Office Excel 2016. Оценка статистической значимости показателей и различий рассматриваемых выборок производилась при уровне значимости не ниже $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Скорость заживления ран в основной группе составила 6 [5; 35]% в день, а в контрольной группе – 3 [3; 28]% в день и в 2 раза была достоверно выше при применении аутологических аспиратов красного костного мозга ($p < 0,001$).

У пациентов основной группы до введения аутологических аспиратов красного костного мозга в мазках-отпечатках из ран преобладал воспалительно-регенераторный тип цитограммы – 34 (91,89%). Регенераторно-воспалительный тип выявлен в 3 (8,11%) случаях. В контрольной группе в начале 2-й фазы раневого процесса преобладал воспалительно-регенераторный тип цитограммы – 31 (88,57%). Регенераторно-воспалительный тип выявлен в 4 (11,43%) случаях.

При введении аутологических аспиратов красного костного мозга стимулирующий эффект выражался цитологически полным переходом к регенераторному типу цитограммы. Так, на момент выполнения планшечного закрытия у 37 (100 %) пациентов основной группы выявлен регенераторный тип цитограммы, в то время как в контрольной группе

у 30 (85,71%) пациентов выявлен регенераторный тип цитограммы, у 5 (14,29%) – регенераторно-воспалительный тип.

Сроки подготовки ран к пластическому закрытию в основной группе составили 5 [3; 7] дней, а в контрольной – 12 [9; 15] ($p < 0,001$).

Установлено, что для ран с признаками хронизации раневого процесса рН раневого отделяемого находилось в пределах 8.

При применении аутологичных аспиринов красного костного мозга отмечалось увеличение интенсивности экспрессии маркера COL1 с 5,6 [3,14; 10,42] (на момент введения аспиринов) до 10,96 [5,1; 14,1] (на момент выполнения пластического закрытия) ($p < 0,0001$). В то же время в группе контроля на момент выполнения пластического закрытия интенсивность экспрессии достоверно не отличалась ($p > 0,05$).

Коллагенизация раны (синтез коллагена) является важнейшим механизмом раневого заживления. Коллаген заполняет тканевой дефект, взаимодействует с различными рецепторами клеток и белками внеклеточного матрикса, регулируя миграцию клеток, адгезию, пролиферацию. Коллаген 1-го типа ускоряет образование межклеточного матрикса с помощью дермальных фибробластов, активирует ангиогенез [10, 11]. Экспрессия маркера COL1 в ранах до и после введения аутомиелоаспиринов представлена на рис. 1, 2.

При применении аутологичных аспиринов красного костного мозга отмечалось увеличение интенсивности экспрессии маркера Ki67 только у женщин с 0,85 [0,52; 1,53] (на момент введения аспиринов) до 1,44 [0,71; 3,7] (на момент выполнения пластического закрытия) ($p = 0,0005$). В то же время в группе контроля на момент выполнения пластического закрытия интенсивность экспрессии составляла 0,95 [0,69; 1,41] и была достоверно ниже ($p = 0,04$).

Антиген Ki67 представляет собой ядерный белок, который экспрессируется во всех активных частях клеточного цикла, но отсутствует в покоящихся клетках. Известно, что экспрессия Ki67 прямо коррелирует

Рис. 1. Экспрессия маркера COL1 в ранах до введения аутомиелоаспиринов. Окраска – Anti-Collagen Type 1 antibody. Ув. $\times 200$

Fig. 1. Expression of the COL1 marker in wounds before the injection of automyeloaspirates. Coloration – Anti-Collagen Type 1 antibody. Inc. $\times 200$

Рис. 2. Экспрессия маркера COL1 в ранах после введения аутомиелоаспиринов. Окраска – Anti-Collagen Type 1 antibody. Ув. $\times 200$

Fig. 2. Expression of the COL1 marker in wounds after the injection of automyeloaspirates. Coloration – Anti-Collagen Type 1 antibody. Inc. $\times 200$

Рис. 3. Экспрессия маркера Ki67 в ранах до введения аутомиелоаспиратов. Окраска – Anti-Ki67 antibody. Ув. ×200

Fig. 3. Expression of the Ki67 marker in wounds before the injection of automyeloaspirates. Coloration – Anti-Ki67 antibody. Inc. ×200

Рис. 4. Экспрессия маркера Ki67 в ранах после введения аутомиелоаспиратов. Окраска – Anti-Ki67 antibody. Ув. ×200

Fig. 4. Expression of the Ki67 marker in wounds after the injection of automyeloaspirates. Coloration – Anti-Ki67 antibody. Inc. ×200

с интенсивностью репаративных процессов в ранах и обратно – с уровнем бактериальной обсемененности [12, 13]. Экспрессия маркера Ki67 у женщин в ранах до и после введения аутомиелоаспиратов представлена на рис. 3, 4.

В основной группе у 35 (94,59%) пациентов после пластического закрытия раны заживали без осложнений, в то время как в контрольной группе – у 27 (77,14%) пациентов ($p < 0,05$). У 8 пациентов контрольной группы (22,86%) и у 2 (5,41%) пациентов основной отмечалось осложненное течение послеоперационного периода после пластического закрытия и понадобилось дополнительное лечение до полного заживления ран.

■ Выводы

1. Применение аутологических аспиратов красного костного мозга для стимуляции раневого заживления позволяет достоверно повысить скорость заживления раневых дефектов в 2 раза, сократить сроки подготовки ран к пластическому закрытию на 7 дней и увеличить эффективность выполнения пластического закрытия на 17,45%.
2. Аутологичные аспираты красного костного мозга увеличивают интенсивность экспрессии маркеров COL1, Ki67 у женщин, что характеризует стимуляцию регенераторных процессов в ранах.

Вклад авторов: Федянин С.Д. – концепция и дизайн исследования, редактирование, сбор материала, обработка, написание текста; Косинец В.А. – концепция и дизайн исследования, редактирование; Коваленко А.А. – концепция и дизайн исследования; Самсонова И.В., Галецкая А.А., Яроцкая Н.Н., Клопова В.А. – выполнение комплекса иммуногистохимических исследований.

Authors' contribution: Fedzianin S. – research concept and design, editing, material collection, processing, text writing; Kosinets V. – research concept and design, editing; Kovalenko A. – research concept and design;

Samsonova I., Galetskaya A., Yarotskaya N., Klopova V. – performing a complex of immunohistochemical studies.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Gelfand B. et al. (2015) *Hirurgicheskie infekcii kozhi i myagkih tkanej: Rossijskie nacional'nye rekomendacii* [Surgical infections of the skin and soft tissues: Russian national recommendations]. Moscow: MAI Publishing House. (in Russian)
2. Eryuhin I., Gelfand B., Shlyapnikov S. (2003) *Hirurgicheskie infektsii* [Surgical infections]. SPb.: Piter. (in Russian)
3. Gelfand B. (2017) *Sepsis: klassifikatsiya, kliniko-dagnosticheskaya koncepciya i lechenie* [Sepsis: classification, clinical diagnostic concept and treatment]. Moscow: Medical Information Agency. (in Russian)
4. Tret'yak S. et al. (2011) *Metod lecheniya s ispol'zovaniem autologichnykh mezenhimal'nykh stvolovykh kletok iz zhirovoj tkani u pacientov s troficheskimi yazvami – instrukciya po primeneniyu* [Method of treatment using autologous mesenchymal stem cells from adipose tissue in patients with trophic ulcers – instructions for use], no 093-0911, Minsk. (in Russian)
5. Badiavas E.V., Falanga V. (2003) Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells. *Arch. Dermatol.*, vol. 139, no 4, pp. 510–516.
6. Chittoria R.K., Nandhagopal V., Mohapatra D.P. (2016) Autologous bone marrow aspirate therapy in wound healing. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*, vol. 5, no 3, pp. 102–105.
7. Gupta G.J. Karki K., Jain P., Saxena A.K. (2017) Autologous bone marrow aspirate therapy for skin tissue engineering and tissue regeneration. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*, vol. 6, no 4, pp. 135–142.
8. Lyzikov A., Nadyrov E., Bereshchenko V. (2008) *Sposob opredeleniya ploshchadi ranevoj poverhnosti – instrukciya po primeneniyu* [Method for determining the area of the wound surface – instructions for use], no 065-0907, Gomel. (in Russian)
9. Kuzin M., Kostyuchenok B. (1990) *Rani i ranevaya infektsiya* [Wounds and wound infection]. Moscow: Medicine. (in Russian)
10. Parenteau-Bareil R., Gauvin R., Cliche S., Gariépy C., Germain L., Berthod F. (2011) Comparative study of bovine, porcine and avian collagens for the production of a tissue engineered dermis. *Acta Biomater.*, vol. 7, no 10, pp. 3757–3765.
11. Neve A., Cantatore F.P., Maruotti N., Corrado A., Ribatti D. (2014) Extracellular matrix modulates angiogenesis in physiological and pathological conditions. *BioMed Res. Int.*, vol. 2014, art. no 756078.
12. Veligockij A., Savickij R., Leonov A. (2018) Izmenenie proliferativnoj aktivnosti tkanej rany pri vozdeystvii nizko dozirovannogo vakuuma [Changes in the proliferative activity of wound tissues when exposed to a low-dose vacuum]. *Suchasni medichni tekhnologii*, no 4, pp. 51–54.
13. Sato T., Abe T., Ichioka S. (2018) Factors impairing cell proliferation in the granulation tissue of pressure ulcers: Impact of bacterial burden. *Wound Repair Regen.*, vol. 26, no 3, pp. 284–292.

Подана/Submitted: 23.09.2021

Принята/Accepted: 08.12.2021

Контакты/Contacts: fedyanin-1977@mail.ru