УДК 616.5-002.44-02:616.14-007.64]-089.843-008.9-092.18-092.9

DOI: 10.37621/JNAMSU-2020-1-2-2

«Журнал НАМН України» | 2020 | Т. 26 | № 1–2 | С. 14–22

Використання стромальних клітин жирової тканини в комплексному лікуванні трофічних виразок в експерименті

В. І. Лупальцов[✉], І. В. Сорокіна, С. С. Кітченко, О. В. Калужина, А. І. Ягнюк

Харківський національний медичний університет МОЗ України, проспект Науки, 4, Харків 61022, Україна

Мета: вивчення ефективності лікування трофічних виразок за допомогою аутотрансплантації стромальних клітин жирової тканини в експерименті.

Матеріал і методи дослідження. В експерименті використали кролів лінії Шиншила віком понад 4 міс. обох статей з масою > 3 кг, яких розподілили на 2 групи: контрольна група, яка отримувала медикаментозну терапію (n = 7), і основна група, якій на тлі медикаментозної терапії проводили аутотрансплантацію стромальних клітин жирової тканини (n = 7). Трофічну виразку формували в два етапи: на першому – перев'язували стегнову вену, на другому – формували виразку шляхом висікання шкіри до поверхневої фасції з перифокальною ішемізацією країв рани нижче лігування вени. Стромально-судинну фракцію отримували з клубочкової області жирової тканини кролів з її подальшою фрагментацією, промиванням в фосфатному буфері тричі по 5 хв та інкубації в 0,1 % розчині колагенази (ліофілізат для приготування розчину для місцевого і парентерального застосування, Санкт-Петербурзький НДІ вакцин і сироваток, РФ) протягом 40 хв за температури 37 °С. Після центрифугування, обробки лізуючим буфером і повторного промивання проводили аутотрансплантацію клітинного матеріалу за допомогою шприца з товстою голкою перифокально і в дно виразки. На 1, 7, 14 і 21-шу добу після трансплантації виконували морфологічні та імуногістохімічні дослідження.

Результати. Вже на 7-му добу експерименту в основній групі показники лейкоцитарно-некротичного і лейкоцитарно-демаркаційного валів становили $(49,2 \pm 2,0) \%$ і $(18,0 \pm 1,6) \%$, відповідно, тоді як в контрольній групі – $(51,1 \pm 5,8) \%$ і $(19,2 \pm 1,4) \%$. Оптична щільність світіння колагену 3-го типу перевищувала аналогічний показник для колагену 1-го ти-

Use of fatty stromal cells in the complex treatment of trophic ulcers in the experiment

Volodymyr I. Lupaltsov[✉], Irina V. Sorokina, Sergii S. Kitchenko, Oksana V. Kaluzhyna, Andriy I. Yahniuk

Kharkiv National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, 4 Nauky Avenue, Kharkiv 61022, Ukraine

Aim: the purpose of the research is to study the effectiveness of the treatment of trophic ulcers by autologous transplantation of stromal cells from adipose tissue in the experiment.

Material and of research methods. Experimental studies of the effectiveness of the treatment of trophic ulcers of venous etiology by autotransplantation of adipose tissue cells on 14 rabbits of the Chinchilla line, aged more than 4 months in both sexes, weighing 3 kilograms, are presented. After receiving the trophic ulcer, the rabbits were divided into 2 groups. A control group of 7 rabbits who used drug therapy and a core group of 7 rabbits who underwent autotransplantation of stromal cells from adipose tissue against the background of drug therapy. Both groups performed morphological and immunohistochemical studies.

Results. Already on the 7th day of the experiment in the main group, the indicators of leukocyte-necrotic and leukocyte-demarcation shafts were $(49.2 \pm 2.0) \%$ and $(18.0 \pm 1.6) \%$, respectively, while in the control group – $(51.1 \pm 5.8) \%$ and $(19.2 \pm 1.4) \%$. The optical luminescence density of type 3 collagen exceeded that of type 1 collagen. For type 1 collagen, this indicator in the main and control groups was (0.036 ± 0.009) conventional units from and (0.030 ± 0.006) conventional units, respectively, and for collagen of the 3rd type – (0.069 ± 0.008) conventional units and (0.048 ± 0.008) conventional units, respectively. On the 21st day in the main group was determined by resorption of the necrotic cell, granulation tissue in the superficial areas with

пу. Для колагену 1-го типу цей показник в основній і контрольній групах склав $(0,036 \pm 0,009)$ ум. од. і $(0,030 \pm 0,006)$ ум. од., відповідно, а для колагену 3-го типу – $(0,069 \pm 0,008)$ ум. од. і $(0,048 \pm 0,008)$ ум. од., відповідно. На 21-шу добу в основній групі визначалася резорбція некротичного осередку, грануляційна тканина в поверхневих ділянках з численними мікросудинами, клітини фібробластичного ряду, макрофаги, лімфоцити і велика кількість гігантських багатоядерних клітин. Значно зменшилася кількість клітин, що експресували інтерлейкін-6 і фактор некрозу пухлин- α , спостерігалось переважання молодого інтерстиціального колагену 3-го типу. Візуально відмічалась повна епітелізація ранової поверхні.

Висновки. Визначено, що використання методу аутоотрансплантації стромально-судинної фракції жирової тканини при лікуванні трофічної виразки венозної етіології в експерименті у кролів призводить до прискорення процесів в загоєнні трофічної виразки, що проявляється підвищенням рівня цитокінпродукуючих клітин, які стимулюють процеси колагеноутворення, прискоренням дозрівання грануляційної тканини у більш зрілу сполучну тканину.

Ключові слова: трофічна виразка, жирова тканина, мезенхімальні стромальні клітини, морфологія, імуногістохімія.

Для цитування: Лупальцов ВІ, Сорокіна ІВ, Кітченко СС, Калужина ОВ, Ягнюк АІ. Використання стромальних клітин жирової тканини в комплексному лікуванні трофічних виразок в експерименті. Журнал Національної академії медичних наук України. 2020;26(1-2):14–22. DOI: 10.37621/JNAMSU-2020-1-2-2.

Стаття надійшла до редакції 27.11.2019 року
Направлена на рецензування 30.11.2019 року
Прийнята до друку 14.12.2019 року

numerous microvasculs, fibroblastic cells, macrophages, lymphocytes and a large number of giant multinucleated cells. Significantly decreased the number of cells expressing interleukin-6 and tumor necrosis factor- α , there was a predominance of young interstitial collagen type 3. Complete epithelialization of the wound surface was visually observed.

Conclusions. It is determined that the use of the method of autotransplantation of the stromo-vascular fraction of adipose tissue in the treatment of trophic ulcer of venous etiology in the experiment in rabbits leads to acceleration of the processes in the healing of trophic ulcer, which is increased by the level of cytokytinucleation, into more mature connective tissue.

Keywords: trophic ulcer, adipose tissue, mesenchymal stromal cells, morphology, immunohistochemistry.

For citation: Lupaltsov VI, Sorokina IV, Kitchenko SS, Kaluzhyna OV, Yaghiuk AI. Use of fatty stromal cells in the complex treatment of trophic ulcers in the experiment. Journal of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine. 2020;26(1-2):14–22. DOI: 10.37621/JNAMSU-2020-1-2-2.

The article was received on 27.11.2019
For review, 30.11.2019
Accepted for publication on 14.12.2019

ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

КАФЕДРА ХІРУРГІЇ № 3

Лупальцов Володимир Іванович – д. м. н., проф., чл.-кор. НАМН України, завідувач кафедри, ORCID: 0000-0003-2121-529X;

Ягнюк Андрій Іванович – к. м. н., доцент, ORCID: 0000-0002-8461-7897;

Кітченко Сергій Сергійович – асистент, ORCID: 0000-0001-6330-6187.

КАФЕДРА ПАТОЛОГІЧНОЇ АНАТОМІЇ

Сорокіна Ірина Вікторівна – д. м. н., проф., в. о. завідувачки кафедри, ORCID: 0000-0002-5945-2605;

Калужина Оксана Володимирівна – к. м. н., доцент, ORCID: 0000-0002-4181-9704.

INFORMATION ABOUT AUTHORS

DEPARTMENT OF SURGERY № 3

Volodymyr I. Lupaltsov – Dr. Sci. (Medicine), Prof., Cor. Member of the NAMS of Ukraine, Head of the Department, ORCID: 0000-0003-2121-529X;

Andriy I. Yaghiuk – Cand. Sci. (Medicine), Associate Professor, ORCID: 0000-0002-8461-7897;

Sergii S. Kitchenko – Assistant Professor, ORCID: 0000-0001-6330-6187.

DEPARTMENT OF PATHOLOGICAL ANATOMY

Irina V. Sorokina – Dr. Sci. (Medicine), Prof., Acting Head of the Department, ORCID: 0000-0002-5945-2605;

Oksana V. Kaluzhina – Cand. Sci. (Medicine), Associate Professor, ORCID: 0000-0002-4181-9704.

Volodymyr I. Lupaltsov
ORCID: 0000-0003-2121-529X
surgdis@ukr.net

ВСТУП

Серед численних гнійно-некротичних процесів нижніх кінцівок трофічні виразки займають особливе місце з огляду на їх широке розповсюдження і труднощі лікування. З цього приводу ще на початку XX сторіччя видатний хірург С. І. Спасокукотський писав: «виразки гомілки являють собою справжній хрест хірургів за своєю завзятістю і труднощами лікування» [1].

В теперішній час, за даними різних авторів, трофічні виразки ускладнюють перебіг хронічної венозної недостатності в 15–18 % випадків [2]. В Україні розповсюдженість цієї патології серед хворих на варикозну хворобу складає 43,6 % [3], а інвалідизація і втрата працездатності – від 10 до 67 % [4, 5]. У 81 % хворих наявність трофічних виразок призводить до погіршення якості життя, яке проявляється в наявності постійних або больових відчуттів, що періодично з'являються, обмеженні рухомості, органічних і косметичних порушеннях [6].

В економічно розвинених країнах на лікування хворих з варикозною хворобою нижніх кінцівок, посттромбофлебітичним синдромом витрачаються величезні кошти, що складають 1,5–2,0 % загального бюджету системи охорони здоров'я [2]. Разом з тим, частота розвитку трофічних виразок венозної етіології не має достатньої тенденції до зниження [7, 8]. В умовах сучасності для цього контингенту хворих відсутні не тільки загальноприйняті стандарти обстеження, але й лікування [9, 10].

Метою цієї роботи було вивчення ефективності лікування трофічних виразок за допомогою аутоотрансплантації стромальних клітин з жирової тканини в експерименті.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експериментальні дослідження проведені на 14 кролях лінії Шиншила віком понад 4 міс. обох статей з масою > 3 кг. Моделювання трофічної виразки венозної етіології у експериментальних тварин проводили наступним способом: під загальним знеболенням проводили оперативний доступ до стегнової вени по медіальній поверхні стегна з подальшою повною перев'язкою вени [11]. Далі нижче рівня лігування вени виконували формування виразки: висікали шкіру до поверхневої фасції перпендикулярними розрізами. По периферії поверхні рани, що утворилася, накладали кисетний шов, стягували його до зменшення діаметру рани < 30 мм, після чого з метою додаткової місцевої ішемії накладалися шкірно-фасціальні шви по периферії рани (рис. 1).

Цей спосіб дозволяє сформувати в експерименті трофічну виразку венозної етіології, яка може бути моделлю рецидивної виразки (після хірургічного лікування – венектомії – на поверхневій системі вен нижніх кінцівок). Ця трофічна виразка має усі характерні морфологічні ознаки хронічного ранового процесу, що знайшло підтвердження за результатами морфологічних досліджень.

Після отримання трофічної виразки і появи в'ялої грануляції кролів було розподілено на 2 групи: контрольна група отримувала системну медикаментозну терапію, яка включала щоденні перев'язки з обробкою трофічної ви-

разки розчином антисептика діоксидину і накладанням асептичної пов'язки з маззю на гідрофільній основі, яка мала в своєму складі хлорамфенікол і метилурацил (лево-меколь) (n = 7); дослідна група поряд з аналогічною медикаментозною терапією отримувала аутоотрансплантацію

стромальних клітин з жирової тканини.

Рис. 1 / Fig. 1.
Трофічна виразка венозної етіології / Trophic ulcer of venous etiology.

В основу методики виділення стромально-васкулярної фракції клітин жирової тканини покладено спосіб Р. А. Zuk et al. [12] (рис. 2).

Рис. 2 / Fig. 2. Схема отримання стромально-васкулярної фракції клітин жирової тканини [12] / The scheme of obtaining the stromal-vascular fraction of adipose tissue cells [12].

Забір жирової тканини здійснювали в реципієнтній зоні з клубової ділянки в асептичних умовах під наркозом, для чого проводили розріз шкіри до 0,8–1,0 см і забір гострим способом підшкірно-жирової тканини в об'ємі 5–7 см³. Після операційну рану ушивали і накладали асептичну пов'язку.

Отриману жирову тканину фрагментували на дрібні шматочки за допомогою скальпеля, а отриманий матеріал промивали у фосфатному буфері тричі по 5 хв. Після видалення буфера жирову тканину розчиняли в 0,1 % розчині колагенази (ліофілізат для приготування розчину для місцевого і парентерального застосування, Санкт-Петербурзький НДІ вакцин і сироваток, РФ) з застосуванням шейкеру при температурі 37 °C протягом 40 хв.

За допомогою центрифугування при 800 об/хв впродовж 10 хв зрілі адиפוцити і сполучну тканину відокремлювали від стромально-васкулярної фракції клітин. З отриманої суміші еритроцити видаляли лізуючим буфером (155 мМ NH₄Cl, 10 мМ KHCO₃ і 0,1 мМ EDTA). Стромальні клітини, що залишилися, промивали у фосфатному буфері з наступним цент-

рифугуванням при 800 об/хв впродовж 10 хв. Забір клітинного матеріалу здійснювали шприцом з товстою голкою.

Аутотрансплантацію стромально-васкулярної фракції клітин жирової тканини проводили перифокально і в дно виразки з дотриманням правил асептики після туалету виразки з наступним накладанням асептичної пов'язки (рис. 3).

Рис. 3 / Fig. 3.
Аутотрансплантація стромально-васкулярної фракції клітин жирової тканини / Autotransplantation of stromal-vascular fraction of adipose tissue cells.

Експериментальне дослідження проводили з дотриманням вимог «Європейської конвенції про захист хребетних, яких використовували для експериментальних та інших цілей» (Страсбург, 1986) і наказу Міністерства освіти і науки України «Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» від 01 березня 2012 р. № 249.

Морфологічні дослідження проводили на етапі утворення «чистої» виразки, а також на 7, 14 і 21-шу добу з моменту проведення клітинної терапії, для чого біопсійний матеріал брали єдиним блоком з краю виразки, її дна та з фрагментом незміненої прилеглої тканини. Шматочки тканини фіксували у 10 % розчині формаліну, проводили через спирти у концентраціях, що зростають, та заливали у парафін, після чого готували серійні зрізи товщиною 4–5 × 6–10 мм. Мікропрепарати забарвлювали гематоксиліном і еозином, пікрофуксином за ван Гізоном і за методом Малорі. Препарати вивчали на мікроскопі «Olympus BX-41» («Olympus Corporation», Японія) з вико-

ристанням програми «Olympus DP-soft version 3.1».

Морфометричні дослідження включали визначення відносного об'єму лейкоцитарно-некротичної зони, демаркаційного валу і грануляційної тканини [13].

Імуногістохімічні дослідження проводили на парафінових зрізах товщиною 5–6 × 6–10 мм методом Кунса за методикою М. Brosman [14] з використанням моноклональних антитіл (МКА) до клітин, що продукують інтерлейкін-6 (ІЛ-6) і фактор некрозу пухлин-α (ФНП α), колагену 1-го і 3-го типів з використанням люмінесцентного мікроскопа «Axioskop 40» («Carl Zeiss», Німеччина) і програми «Biostat.exe». Оптичну щільність імунофлуоресценції колагенів визначали за методом Г. І. Губіной-Вакулик та співавт. [15], а кількість імунних клітин досліджували в полі зору × 400.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Підтвердженням трофічних змін слугували морфологічні дослідження сформованої виразки у кролів, стінки якої мали наступну будову: поверхневий шар представляв ділянку епідермісу і дерми з підшкірно-жировою клітковиною, частково виразковою тканиною з некротичними змінами і загиблими лейкоцитами. Навколо розташовувався лейкоцитарний демаркаційний вал, який відокремлював некротичні тканини від незмінених (рис. 4).

Рис. 4 / Fig. 4.
Некротичні маси та лейкоцитарний вал. Забарвлення гематоксиліном та еозином, × 100 / Necrotic masses and leukocyte shaft. Hematoxylin and eosin

ТАБЛИЦЯ 1 / TABLE 1

ВІДНОСНІ ОБ'ЄМИ ОСНОВНИХ СТРУКТУРНИХ КОМПОНЕНТІВ ТРОФІЧНОЇ ВИРАЗКИ ВЕНОЗНОЇ ЕТІОЛОГІЇ У КРОЛІВ (% , M ± m) / RELATIVE VOLUMES OF MAIN STRUCTURAL COMPONENTS OF TROPHIC ULCER OF VENOUS ETIOLOGY IN RABBITS (% , M ± m)

Відносний об'єм (%) / Relative volume (%)	Термін дослідження (доба) / Research period (day)						
	1-а / 1 st	7-ма / 7 th		14-та / 14 th		21-ша / 21 st	
		КГ / CG	ОГ / MG	КГ / CG	ОГ / MG	КГ / CG	ОГ / MG
Зона некрозу / Zone of necrosis	62,03 ± 6,31	51,09 ± 5,82	49,21 ± 2,01	40,47 ± 3,13 *	32,08 ± 2,41 #	29,01 ± 1,92 **	–
Зона демаркації / Demarcation zone	23,52 ± 1,52	19,18 ± 1,41	18,03 ± 1,63	14,39 ± 1,81 *	10,42 ± 1,12 #	9,43 ± 0,99 **	4,94 ± 0,51 #
Зона грануляцій / Granulation zone	14,45 ± 2,42	29,73 ± 2,91	32,55 ± 2,43	45,14 ± 3,61 *	57,50 ± 5,51 #	61,56 ± 5,91 **	95,06 ± 7,82 #

Примітка / Note: КГ – контрольна група; ОГ – основна група; * – $p \leq 0,05$ – відмінність між показниками КГ (7–14-та доба) статистично значуща; ** – $p \leq 0,05$ – відмінність між показниками КГ (14–21-ша доба) статистично значуща; # – $p \leq 0,05$ – відмінність між показниками КГ та ОГ відповідних термінів статистично значуща / CG – control group; MG – main group; * – $p \leq 0,05$ – the difference between the indicators of CG (7–14th days) is statistically significant; ** – $p \leq 0,05$ – the difference between the indicators of CG (14–21st days) is statistically significant; # – $p \leq 0,05$ – the difference between the indicators of CG and MG of the corresponding terms is statistically significant.

staining, $\times 100$.

Відносний об'єм лейкоцитарно-некротичної зони склав, в середньому, $(62,03 \pm 6,31) \%$ (табл. 1).

Глибше розташовувалися окремі осередки формування грануляційної тканини (відносний об'єм – $(14,45 \pm 2,40) \text{ мм}^3$), що були представлені значною кількістю мікросудин з набряклим ендотелієм, а також великою кількістю клітинних елементів – фібробластів, фіброцитів і макрофагів. Крім того, визначались численні гранулоцитарні нейтрофіли та лімфоцити, а також нечисленні хаотично розташовані тонкі волокна сполучної тканини, забарвлені пірофуксином в червонуватий колір (рис. 5).

Рис. 5 / Fig. 5. Осередок утворення грануляцій. Забарвлення за ван Гізоном, $\times 400$ / The center of granulation formation. Van Gison staining, $\times 400$.

Серед клітин запального інфільтрату та грануляційної тканини виявляли імунні клітини, що експресували рецептори до ІЛ-6 та ФНПa. Імуногістохімічні дослідження з моноклональними антитілами до ІЛ-6 виявили $(28,0 \pm 0,5)$ клітин. Кількість клітин-продуцентів ФНПa була дещо меншою і складала $(23,0 \pm 0,8)$ клітин (рис. 6).

Рис. 6 / Fig. 6. Імунні клітини-продуценти ІЛ-6 серед клітин запального інфільтрату та грануляційної тканини в зоні «чистої» виразки. Непрямий метод Кунса з МКА до ІЛ-6, $\times 100$ / Immune cells producing interleukin-6 among

inflammatory infiltrate cells and granulation tissue in the area of «pure» ulcers. Indirect method of Koons from monoclonal antibodies to interleukin-6, $\times 100$.

В періульцерозній ділянці також були знайдені структурні зміни. При забарвленні за ван Гізоном визначались сполучно-тканинні колагенові та еластичні волокна з ознаками набряку. Імуногістохімічне дослідження з МКА до колагенів 1-го і 3-го типів виявило дуже слабке світіння нерівномірної інтенсивності з розмитими краями (рис. 7).

При цьому інтенсивність світіння більш зрілого колагену 1-го типу незначно перевищувала аналогічний показник для колагену 3-го типу, що свідчить про більшу стійкість зрілого інтерстиціального колагену 1-го типу у порівнянні з молодим колагеном 3-го типу.

Прилеглий до ранового дефекту епідерміс був представлений багат шаровим плоским зроговілим епітелієм з мізерною нейтрофільною інфільтрацією в його товщі. В епітеліальному пласті спостерігались ознаки дистрофії, в деяких полях зору були клітини зі зморщеним пікнотичним ядром і вузьким обідком цитоплазми. Базальна мембрана, на якій розташовувався епідерміс, мала рівномірні контури, місцями з інвагінаціями.

Рис. 7 / Fig. 7. Імунофлюоресценція колагену 1-го типу в періульцерозній зоні «чистої» виразки. Непрямий метод Кунса з МКА до колагену 1-го типу, $\times 600$ / Immunofluorescence of type 1 collagen in the periulcerous zone of the «clean» ulcer. Indirect Koons method with monoclonal antibodies to collagen type 1, $\times 600$.

У дермі з підлеглою гіподермою визначалась поліморфноклітинна інфільтрація, що була утворена нейтрофільними гранулоцитами, лімфоцитами й макрофагами (рис. 8).

Окрім того, в даних тканинах мали місце прояви порушення кровообігу, які характеризувались розширенням і повнокрів'ям судин мікроциркуляторного русла. Місцями спостерігались дрібновогнищеві діapedезні крововиливи.

Таким чином, вищеописана гістологічна та імуногістохімічна характеристика відповідає мікроскопічній картині трофічної виразки венозної етіології.

Рис. 8 / Fig. 8. Прилеглий до виразкового дефекту епідерміс. Забарвлення гематоксином та еозином, $\times 400$ / The epidermis adjacent to the ulcer defect. Staining with hematoxylin and eosin, $\times 400$.

На 7-му добу лікування у виразкових тканинах кролів контрольної групи визначались зміни у вигляді лейкоцитарно-некротичного і лейкоцитарно-демаркаційного валів, які у середньому становили $(51,09 \pm 5,82) \%$ і $(19,18 \pm 1,41) \%$, відповідно, тоді як у дослідній групі ці показники становили $(49,21 \pm 2,01) \%$ і $(18,03 \pm 1,63) \%$. Глибше розташовувалась грануляційна тканина, яка була утворена великою кількістю тонкостінних судин та клітинами фібробластичного ряду з домішками гранулоцитарних нейтрофілів, лімфоцитів і макрофагів. Для цієї тканини показники у

дослідній і контрольній групах становили $(32,55 \pm 2,43) \%$ і $(29,73 \pm 2,91) \%$, відповідно (табл. 2).

Окрім цього, серед великої кількості тонкостінних судин, а також клітин фібробластичного ряду з домішкою гранулоцитарних нейтрофілів, лімфоцитів та макрофагів, визначалась невелика кількість сполучно-тканинних волокон, які ідентифікувались при забарвленні за ван Гезоном та Малорі.

Серед вищевказаних клітин виявлялись клітини, що експресують ІЛ-6. Колагени 1-го і 3-го типу мали нерівномірну інтенсивність слабого світіння. Оптична щільність світіння колагену 3-го типу вірогідно перевищувала оптичну щільність світіння колагену 1-го типу (табл. 3).

У основній групі об'єми лейкоцитарно-некротичного і лейкоцитарно-демаркаційного валів, а також кількість клонів імунних клітин ІЛ-6 та ФНПа мали тенденцію до покращення і свідчили про більш активний реконструктивний процес.

На 14-ту добу в контрольній групі відзначалось змен-

шення зони некрозу, демаркаційна лінія ставала тонкішою, глибше підлягала грануляційна тканина з великою кількістю молодих тонкостінних кровоносних судин, які мали вертикальну спрямованість, і стінку, утворену базальною мембраною й ендотелієм. Окрім вказаних структур в грануляційній тканині виявлялись численні клітини фібробластичного ряду, макрофаги та лімфоцити, а також незначна кількість нейтрофільних гранулоцитів (рис. 9).

Рис. 9 / Fig. 9. Дно виразки. Забарвлення гематоксилином та еозином, $\times 400$ / The bottom of the ulcer. Staining with hematoxylin and eosin, $\times 400$.

ТАБЛИЦЯ 2 / TABLE 2

КІЛЬКІСТЬ ОКРЕМИХ КЛОНІВ ІМУННИХ КЛІТИН У СКЛАДІ ЗАПАЛЬНОГО ІНФІЛЬТРАТУ В ЗОНІ ТРОФІЧНОЇ ВИРАЗКИ ВЕНОЗНОЇ ЕТІОЛОГІЇ У КРОЛІВ В ПОЛІ ЗОРУ, $\times 400$ (%), $M \pm m$ / NUMBER OF INDIVIDUAL CLONES OF IMMUNE CELLS IN THE INFLAMMATORY INFILTRATE IN THE ZONE OF TROPHIC ULCER OF VENOUS ETIOLOGY IN RABBITS, $\times 400$ (%), $M \pm m$

Абсолютна кількість одиниць / Absolute number of units	Термін дослідження (доба) / Research period (day)						
	1-ша / 1 st	7-ма / 7 th		14-та / 14 th		21-ша / 21 st	
		КГ / CG	ОГ / MG	КГ / CG	ОГ / MG	КГ / CG	ОГ / MG
ІЛ-6 / Interleukin-6	$28,0 \pm 0,5$	$32,0 \pm 0,6$	$39,0 \pm 0,7^{\#}$	$40,0 \pm 1,1^*$	$46,0 \pm 0,9^{\#}$	$24,0 \pm 0,7^{**}$	$29,0 \pm 0,6^{\#}$
ФНПа / Tumor necrosis factor- α	$23,0 \pm 0,8$	$30,0 \pm 0,9$	$36,0 \pm 0,9^{\#}$	$38,0 \pm 0,8^*$	$42,0 \pm 0,7^{\#}$	$20,0 \pm 0,3^{**}$	$26,0 \pm 0,7^{\#}$

Примітки / Note: КГ – контрольна група; ОГ – основна група; * – $p \leq 0,05$ – відмінність між показниками КГ (7–14-та доба) статистично значуща; ** – $p \leq 0,05$ – відмінність між показниками КГ (14–21-ша доба) статистично значуща; $^{\#}$ – $p \leq 0,05$ – відмінність між показниками КГ та ОГ відповідних термінів статистично значуща / CG – control group; MG – main group; * – $p \leq 0,05$ – the difference between the indicators of CG (7–14th days) is statistically significant; ** – $p \leq 0,05$ – the difference between the indicators of CG (14–21st days) is statistically significant; $^{\#}$ – $p \leq 0,05$ – the difference between the indicators of CG and MG of the corresponding terms is statistically significant.

ТАБЛИЦЯ 3 / TABLE 3

ОПТИЧНА ЩІЛЬНІСТЬ ІМУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦІЇ ІНТЕРСТИЦІАЛЬНИХ КОЛАГЕНІВ В ЗОНІ ТРОФІЧНОЇ ВИРАЗКИ ВЕНОЗНОЇ ЕТІОЛОГІЇ У КРОЛІВ (УМ. ОД. СВ., $M \pm m$) / OPTICAL DENSITY OF IMUNOFLOURESCENCE OF INTERSTITIAL COLLAGENS IN THE ZONE OF TROPHIC ULCER OF VENOUS ETIOLOGY IN RABBITS (CONVENTIONAL UNITS OF GLOW, $M \pm m$)

Умовні одиниці світіння / Conventional units of glow	Термін дослідження (доба) / Research period (day)						
	1-ша / 1 st	7-ма / 7 th		14-та / 14 th		21-ша / 21 st	
		КГ / CG	ОГ / MG	КГ / CG	ОГ / MG	КГ / CG	ОГ / MG
Колаген 1-го типу / Collagen type 1	$0,029 \pm 0,007$	$0,030 \pm 0,006$	$0,036 \pm 0,009$	$0,057 \pm 0,012$	$0,116 \pm 0,014^{\#}$	$0,089 \pm 0,012$	$0,218 \pm 0,016^{\#}$
Колаген 3-го типу / Collagen type 3	$0,026 \pm 0,009$	$0,048 \pm 0,008$	$0,069 \pm 0,008^{\#}$	$0,112 \pm 0,010^*$	$0,144 \pm 0,018^{\#}$	$0,176 \pm 0,010^{**}$	$0,299 \pm 0,018^{\#}$

Примітки / Note: КГ – контрольна група; ОГ – основна група; * – $p \leq 0,05$ – відмінність між показниками КГ (7–14-та доба) статистично значуща; ** – $p \leq 0,05$ – відмінність між показниками КГ (14–21-ша доба) статистично значуща; $^{\#}$ – $p \leq 0,05$ – відмінність між показниками КГ та ОГ відповідних термінів статистично значуща / CG – control group; MG – main group; * – $p \leq 0,05$ – the difference between the indicators of CG (7–14th days) is statistically significant; ** – $p \leq 0,05$ – the difference between the indicators of CG (14–21st days) is statistically significant; $^{\#}$ – $p \leq 0,05$ – the difference between the indicators of CG and MG of the corresponding terms is statistically significant.

У порівнянні з 7-ю добою експерименту кількість ІЛ-6 і ФНПа-продуцентів значимо зростала, а кількість клітин у полі зору складала $(40,0 \pm 1,1)$ і $(38,0 \pm 0,8)$, відповідно. Також зменшувалися ознаки набряку, що свідчить про початок переходу гострого запалення у хронічне.

При цьому переважав колаген 3-го типу, який був представлений яскравою лінійною та вогнищевою імунофлюоресценцією з оптичною щільністю, що значно перевищувала таку на 7-му добу. Оптична щільність світіння колагену 1-го типу теж значно зростала (рис. 10).

Рис. 10 / Fig. 10. Колаген 3-го типу в молодій тканині та грануляціях. Непрямий метод Кунса з МКА до колагену 3-го типу, $\times 600$ / Collagen type 3 in young tissue and granulations. Indirect method of Koons from monoclonal antibodies to collagen type 3, $\times 600$.

В дослідній групі спостерігалось зменшення площі зони некрозу та збільшення відносного об'єму грануляційної тканини. Серед клітинного компонента, окрім фібробластів та фіброцитів, визначалась значна кількість лімфоцитів, мала кількість нейтрофільних гранулоцитів, а також поодинокі гігантські багатоядерні клітини сторонніх тіл без утворення гранулом (рис. 11). Як відомо, останні є вісниками хронічного запалення.

Рис. 11 / Fig. 11. Дно виразки. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 400$ / The bottom of the ulcer. Staining with hematoxylin and eosin, $\times 400$.

Знайдені клітини, що експресували ІЛ-6 і ФНПа. В порівнянні з 7-ю добою кількість ІЛ-6- і ФНПа-продуцентів вірогідно зросла і складала $(40,0 \pm 1,1)$ і $(38,0 \pm 0,8)$ клітин у полі зору, відповідно. Зменшення ознак набряку свідчило про початок переходу гострого запалення у хронічне (рис. 12). Навколо вказаних змін була зріла сполучна тканина з колагеновими та поодинокими еластичними волокнами, які ідентифікувались за допомогою забарвлення за ван Гізоном та Малорі.

Рис. 12 / Fig. 12. Клітини-продуценти ІЛ-6 в грануляційній тканині $\times 100$. Непря-

мий метод Кунса з МКА до ІЛ-6, $\times 100$ / Interleukin-6 producing cells in granulation tissue $\times 100$. Indirect method of Koons from monoclonal antibodies to interleukin-6, $\times 100$.

Епідерміс, що прилягав до ульцерозного дефекту, був дещо потовщений, з нечітко вираженою шаровою будовою, спостерігались поодинокі рогові кісти в поверхневих ділянках, дистрофічні зміни в епітелії та явища епітелізації з країв виразки (рис. 13).

Рис. 13 / Fig. 13. Придатки шкіри з ознаками атрофії. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 100$ / Skin appendages with signs of atrophy. Staining with

hematoxylin and eosin, $\times 100$.

Таким чином, у дослідній групі регенеративні процеси йдуть активніше, про що свідчать результати проведених морфологічних

досліджень.

При мікроскопії виразки на 21-шу добу у кролів групи порівняння встановлені наявність залишків некрозу та ледве помітної демаркації, у поверхневих ділянках дефекту спостерігалась грануляційна тканина з помірною кількістю судин з тонкими стінками, численними клітинами фібробластичного ряду, невеликою домішкою лімфоцитів, макрофагів і майже без явищ набряку в грануляційній тканині (рис. 14).

Рис. 14 / Fig. 14. Грануляційна тканина з судинами та клітинними елементами. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 400$ /

Granulation tissue with vessels and cellular elements. Hematoxylin and eosin staining, $\times 400$.

Відмічалось зменшення клітин, що експресують рецептори до ІЛ-6 і ФНПа в порівнянні з 7-ю добою, а також помірне та яскраве світіння інтерстиційних колагенів обох типів з переважанням колагену 3-го типу над зрілим колагеном 1-го типу (рис. 15). Епідерміс частково наповзав на грануляційну тканину, переважно, нещільно зростаючись з нею.

В дослідній групі при забарвленні гематоксиліном та еозином мала місце резорбція некротичного осередку, присутність грануляційної тканини у поверхневих ділянках, в яких також виявлялися численні мікросудини, клітини фібробластичного ряду, макрофаги, лімфоцити і більша (в порівнянні з попередніми строками спостереження) кіль-

кість гігантських багатоядерних клітин. Ознаки набряку в грануляційній тканині не визначалися (рис. 16).

Як і в попередньому періоді дослідження, спостерігались клітини, що експресували ІЛ-6 та ФНПа, але їх кількість значно зменшилась.

Рис. 15 / Fig. 15. Імунофлюоресценція колагену 1-го типу в сполучнотканинному компоненті. Непрямий метод Кунса з МКА до колагену 1 типу, $\times 600$ / Immunofluorescence of type 1 collagen in the connective tissue

component. Indirect method of Koons from monoclonal antibodies to collagen type 1, $\times 600$.

Рис. 16 / Fig. 16. Гігантські багатоядерні клітини в грануляційній тканині. Забарвлення гематоксилином та еозином, $\times 400$ / Giant multinucleated cells in granulation tissue. Staining with hematoxylin and eosin, $\times 400$.

Спостерігалось яскраве світіння колагенів обох типів з переважанням молодого інтерстиціального колагену 3-го типу. Зрілий колаген виявлявся вже не тільки у формі дрібних вогнищ, а й у формі лінійного світіння. Щільність обох колагенів в основній групі вірогідно перевищувала відповідні показники в контрольній групі, що може свідчити про активне дозрівання сполучної тканини та склерозування дна виразки. Епідерміс виразки частково покривав грануляційну тканину, місцями щільно зростаючись з нею.

При огляді ранового дефекту на 21-шу добу візуально спостерігалась повна епітелізація ранової поверхні (рис. 17).

Рис. 17 / Fig. 17. Вкрита епітелієм експериментальна

трофічна виразка / Epithelial-covered experimental trophic ulcer.

Таким чином, використання методу аутоотрансплантації стромально-судинної фракції жирової

тканини при лікуванні трофічної виразки венозної етіології у кролів в експерименті призводить до прискорення процесів загоєння рани. Це проявляється підвищенням рівня цитокінпродукуючих клітин, які стимулюють процеси колагеноутворення, підвищенням вмісту зрілого колагену 1-го типу в сполучнотканинному компоненті та більш швидким дозріванням грануляційної тканини з трансформацією в зрілу сполучну тканину. Окрім того, особливістю перебігу загоєння рани в цих тварин є наявність багатоядерних гігантських клітин сторонніх тіл, що може бути розцінене, як імунна реакція організму на стромальну васкулярну фракцію жирової тканини.

ВИСНОВКИ

1 Аутоотрансплантація стромальних клітин жирової тканини чинить позитивний вплив на перебіг хронічної виразки венозного генезу і швидкість репаративних процесів в рані шляхом прискорення дозрівання грануляційної тканини та її епітелізації, а також скорочення строків загоєння ранового дефекту.

2 Використання стромальних клітин жирової тканини є перспективним методом лікування хронічних виразок венозної етіології.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ / REFERENCES

1. Saveliev VS, Kirienko AI, editors. [Clinical Surgery] [Internet]. In 3 volumes. Vol. 1. Moskva: GEOTAR-Media, 2013 [cited 2020 Dec 05]. 832 p. Available from: <https://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970425725.html>. Subscription required. Russian.

2. Karapetyan GE, Yakimov SV, Mikitin IL, Kochetova LV, Pakhomova RA. [Treatment of patients with trophic ulcer]. Vestnik khirurgii im. I. I. Grekova. 2014;173(3):72-6. Russian.

3. Dryuk NF, Chernukha LM. [Reconstructive vein surgery in the treatment of patients with severe forms of chronic venous insufficiency]. Clinical surgery. 2004;(4-5):85-6. Russian.

4. Shevchenko YL, Stoyko YM, Mazayshvili KV. [Laser surgery of varicose disease]. Moskva: Borges; 2010.194 p. Russian.

5. Baranov EV, Buravsky AV, Kvacheva ZB, Vasilevich IB, Tretyak SI, Volotovskiy ID. [Local transplantation of multipotent mesenchymal stem cells of adipose tissue and skin fibroblasts: features of skin regeneration and a comparative assessment of the healing indicators of experimental wound defects]. Military medicine. 2017;(2):79-86. Russian.

6. Gulikyan GN, Karapetyan GE, Pakhomova RA, Kochetova LV. [The effectiveness of autologous transplantation of adipose tissue according to literature data]. Modern problems of science and education [Internet]. 2015 Nov 30 [cited 2020

Dec 05];(6). Available from: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=23699>. Russian.

7. Kudykin MN, Izmailov SG, Beschastnov VV, Kletskin AE, Mukhin AS, Vasiagin AN. [Combined treatment of trophic ulcers]. Flebologiya. 2008;2(3):16-20. Russian

8. Loots MA, Lamme EN, Zeegelaar J, Mekkes JR, Bos JD, Middelkoop E. Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. J Invest Dermatol. 1998 Nov;111(5):850-7. DOI: 10.1046/j.1523-1747.1998.00381.x.

9. Buzmakov DL. [Algorithm for the treatment of postthrombotic disease of the lower extremities]. Clinical surgery. 2014 Nov;(11):42-4. Ukrainian.

10. Moffatt CJ, Franks PJ. Implementation of a leg ulcer strategy. *Br J Dermatol*. 2004 Oct;151(4):857–67. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2004.06200.x.

11. Lupaltsov VI, Kitchenko SS, Yahniuk AI, Dekhtiaruk IA, Skalii MM, Kotovshchikov MS, inventor; Kharkiv National Medical University, assignee. [The method of modeling a trophic ulcer of venous etiology in the experiment]. Ukraine patent 141285. 2020 March 25. Ukrainian.

12. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001 Apr;7(2):211–28. DOI: 10.1089/107632701300062859.

13. Avtandilov GG. [Medical morphometry]. Guideline. Moskva: Meditsina; 1990. 384 p. Russian.

14. Brozman M. [Immunofluorescence investigation of formol-paraffin material]. *Cesk Patol*. 1979 Nov;15(4):215–20. Slovak.

15. Hubina-Vakulyk HI, Sorokina IV, Markovskiy VD, Kykhtenko OV, Kupriianova LS, Sydorenko RV, inventor; Kharkiv National Medical University, assignee. [The method of quantifying the content of antigen in biological tissues]. Ukraine patent 46489. 2009 December 25. Ukrainian.

РЕЗЮМЕ

Использование стромальных клеток жировой ткани в комплексном лечении трофических язв в эксперименте

В. И. Лупальцов, И. В. Сорокина, С. С. Китченко, О. В. Калужина, А. И. Ягнюк

Харьковский национальный медицинский университет МЗ Украины, проспект Науки, 4, Харьков 61022, Украина

Цель: изучение эффективности лечения трофических язв с помощью аутоотрансплантации стромальных клеток из жировой ткани в эксперименте.

Материал и методы исследования. В эксперименте использовали кролей линии Шиншилла в возрасте более 4 мес. обоего пола с массой > 3 кг, которых распределили на 2 группы: контрольная группа, которая получала медикаментозную терапию (n = 7), и основная группа, которой на фоне медикаментозной терапии проводили аутоотрансплантацию стромальных клеток жировой ткани (n = 7). Трофическую язву формировали в два этапа: на первом – перевязывали бедренную вену, на втором – формировали язву путем высечения кожи до поверхностной фасции с перифокальной ишемией краев раны ниже лигирования вены. Стромально-сосудистую фракцию получали из клубочковой области жировой ткани кролей с ее дальнейшей фрагментацией, промыванием в фосфатном буфере трижды по 5 мин и инкубации в 0,1 % растворе коллагеназы (лиофилизат для приготовления раствора для местного и парентерального применения, Санкт-Петербургский НИИ вакцин и сывороток, РФ) на протяжении 40 мин при температуре 37 °С. После центрифугирования, обработки лизирующим буфером и повторного промывания проводили аутоотрансплантацию клеточного материала с помощью шприца с толстой иглой перифокально и в дно язвы. На 1, 7, 14 и 21-е сутки после трансплантации выполняли морфологические и иммуногистохимические исследования.

Результаты. Уже на 7-е сутки эксперимента в основной группе показатели лейкоцитарно-некротического и лейкоцитарно-демаркационного валов составляли $(49,2 \pm 2,0) \%$ и $(18,0 \pm 1,6) \%$ соответственно, тогда как в контрольной группе – $(51,1 \pm 5,8) \%$ и $(19,2 \pm 1,4) \%$. Оптическая плотность свечения коллагена 3-го типа превышала аналогичный показатель для коллагена 1-го типа. Для коллагена 1-го типа этот показатель в основной и контрольной группах составил $(0,036 \pm 0,009)$ усл. ед. и $(0,030 \pm 0,006)$ усл. ед., соответственно, а для коллагена 3-го типа – $(0,069 \pm 0,008)$ усл. ед. и $(0,048 \pm 0,008)$ усл. ед., соответственно. На 21-е сутки в основной группе определялась резорбция некротического очага, грануляционная ткань в поверхностных участках с многочисленными микрососудами, клетки фибробластического ряда, макрофаги, лимфоциты и большое количество гигантских многоядерных клеток. Значительно уменьшилось количество клеток, экспрессировавших интерлейкин-6 и фактор некроза опухоли- α , наблюдалось преобладание молодого интерстициального коллагена 3-го типа. Визуально отмечалась полная эпителизация раневой поверхности.

Выводы. Определено, что использование метода аутоотрансплантации стромально-сосудистой фракции жировой ткани при лечении трофической язвы венозной этиологии в эксперименте у кроликов приводит к ускорению процессов в заживлении трофической язвы, что проявляется повышением уровня цитокинпродуцирующих клеток, стимулирующих процессы коллагенообразования, ускорением созревания грануляционной ткани в более зрелую соединительную ткань.

Ключевые слова: трофическая язва, жировая ткань, мезенхимальные стромальные клетки, морфология, иммуногистохимия.

Для цитирования: Лупальцов ВИ, Сорокина ИВ, Китченко СС, Калужина ОВ, Ягнюк АИ. Использование стромальных клеток жировой ткани в комплексном лечении трофических язв в эксперименте. *Журнал Национальной академии медицинских наук Украины*. 2020;26(1-2): 14–22. DOI: 10.37621/JNAMSU-2020-1-2-2.

Статья поступила в редакцию 27.11.2019 | Направлена на рецензирование 30.11.2019 | Принята в печать 14.12.2019