

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Свистушкин Михаил Валерьевич

**Экспериментальное обоснование применения мезенхимных стромальных
клеток в лечении рубцовых повреждений голосового отдела гортани**

14.01.03 – Болезни уха, горла и носа

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Старостина Светлана Викторовна

Научный консультант:

доктор химических наук, доцент

Тимашёв Пётр Сергеевич

Москва - 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Микроанатомия голосовых складок и её роль в биомеханике голосообразования.....	16
1.2. Этиология рубцовых повреждений голосового отдела гортани.....	23
1.3. Экспериментальные исследования рубцовых повреждений голосовых складок на животных моделях.....	25
1.4. Классификация рубцовых повреждений голосового отдела гортани.....	29
1.5. Диагностика рубцовых повреждений голосового отдела гортани.....	32
1.6. Лечение пациентов с рубцовыми повреждениями голосового отдела гортани	34
1.7. Регенеративная медицина: основные понятия и определения.....	40
1.8. Возможности методов регенеративной медицины в лечении рубцовых повреждений голосового отдела гортани.....	45
1.8.1. Общая характеристика экспериментальных исследований.....	46
1.8.2. Механизмы антифибротических эффектов клеточной терапии повреждений голосовых складок.....	49
1.8.3. Методы оценки результатов клеточной терапии в восстановлении морфологических и механических свойств голосовых складок.....	52
1.8.4. Результаты клеточной терапии в восстановлении морфологических и механических свойств голосовых складок в экспериментах.....	54
1.8.5. Трансляция результатов экспериментальных работ в клиническую практику	59
1.9. Заключение.....	61
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	63

2.1. Дизайн и структура исследования.....	63
2.2. Хирургические и клеточные методы, использованные в экспериментах	68
2.2.1. Усовершенствование и отработка воспроизводимости экспериментальной модели рубцового процесса голосовых складок кролика.....	68
2.2.2. Создание модельного дефекта рубцового повреждения голосовых складок у животных экспериментальных групп	74
2.2.3. Получение аспирата костного мозга кроликов	76
2.2.4. Подготовка клеточных продуктов для имплантации	77
2.2.5. Подкожная имплантация ПЭГ-фибринового геля малым лабораторным животным	80
2.2.6. Техника операций по имплантации клеточных продуктов аутологичных МСК костного мозга и МСК костного мозга человека, комплекса ПЭГ-фибринового геля с МСК костного мозга человека, ПЭГ-фибринового геля в голосовые складки кроликов.....	81
2.3. Методы оценки результатов исследования	84
2.3.1. Метод оценки интенсивности интраоперационного кровотечения и длительности операций при имплантации клеточных продуктов: суспензии МСК человека в фосфатно-солевом буферном растворе и комплекса МСК человека с ПЭГ – фибриновым гелем	84
2.3.2. Метод оценки дыхательных нарушений в раннем послеоперационном периоде и оценки восстановления активности и питания животных на 1-е сутки после имплантации клеточных продуктов: суспензии МСК человека в фосфатно-солевом буферном растворе и комплекса МСК человека с ПЭГ – фибриновым гелем	86
2.3.3. Морфологические методы исследования	87
2.3.4. Метод атомно-силовой микроскопии	92

2.3.5. Метод оценки механических характеристик голосовых складок методом наноиндентирования в жидкой среде.....	94
2.3.6. Метод исследования вибрационной динамики тканей голосовых складок..	96
2.4. Методы статистической обработки.....	99
Глава 3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ: УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ С ОЦЕНКОЙ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА И ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЬ-ФИБРИНОВОГО ГЕЛЯ	103
3.1. Результаты усовершенствования экспериментальной модели рубцового процесса голосовых складок кролика	103
3.2. Оценка возможности применения клеточных продуктов на основе МСК человека и ПЭГ-фибринового геля при восстановлении голосовых складок в эксперименте <i>in vivo</i>	107
3.2.1. Результаты морфологического исследования ПЭГ-фибринового геля при подкожном введении малым лабораторным животным на ранних сроках	107
3.2.2. Результаты оценки интенсивности интраоперационного кровотечения и длительности операций при имплантации клеточных продуктов суспензии МСК человека в фосфатно-солевом буферном растворе и комплекса МСК с ПЭГ – фибриновым гелем	113
3.2.3. Результаты оценки дыхательных нарушений и восстановления активности животных в раннем послеоперационном периоде после имплантации клеточных продуктов суспензии МСК в фосфатно-солевом буферном растворе и комплекса МСК с ПЭГ – фибриновым гелем	116
3.2.4. Локализация и распределение МСК костного мозга человека, введенных в голосовые складки в виде суспензии и комплексе с ПЭГ-фибриновым гелем	119

Глава 4. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ: ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И БИОМЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ГОЛОСОВОГО ОТДЕЛА ГОРТАНИ ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК.....	121
4.1. Результаты морфологического и морфометрического исследования препаратов голосовых складок	121
4.2. Анализ толщины собственной пластинки голосовых складок	128
4.3. Результаты иммуногистохимического определения и анализа содержания коллагена I и III типов в препаратах голосовых складок.....	129
4.4. Результаты атомно-силовой микроскопии препаратов голосовых складок в экспериментальных и контрольной группах.....	130
Глава 5. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ: ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И БИОМЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ГОЛОСОВОГО ОТДЕЛА ГОРТАНИ ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА.....	140
5.1. Морфологическое исследование, полуколичественная оценка морфологических признаков в экспериментальных и контрольной группах	140
5.2. Анализ толщины собственной пластинки голосовых складок	150
5.3. Результаты исследования механических характеристик голосовых складок методом наноидентирования в жидкой среде	152
5.4. Результаты исследования вибрационной динамики тканей голосовых складок	154
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	156
ПЕРСПЕКТИВЫ ВНЕДРЕНИЯ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ В КЛИНИЧЕСКУЮ ПРАКТИКУ	171
ВЫВОДЫ	175
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	176

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	177
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	196

ВВЕДЕНИЕ

Голос является как важнейшим способом социального взаимодействия, так и профессиональным инструментом для людей, чья работа связана с вербальным общением. Нарушение голосовой функции ведёт не только к негативным последствиям для социальной и профессиональной сферы жизнедеятельности человека, тем самым снижая качество жизни, но и наносит значительный ущерб экономике, что делает патологию голоса, как вид коммуникативных расстройств, проблемой общественного здравоохранения, масштабы которой в 21-м веке будут увеличиваться [139; 165; 192; 211].

Одной из самых сложных в лечении проблем ларингологии, приводящей к стойкому нарушению голосовой и дыхательной функции, являются рубцовые повреждения голосового отдела гортани [15; 23]. Причины их формирования чрезвычайно многообразны: острое и хроническое воспаление, избыточные голосовые нагрузки, травма любой этиологии, в том числе при хирургических вмешательствах и эндотрахеальной интубации [5; 75; 93; 111].

Рубцы голосовых складок (ГС) характеризуются пространственной дезорганизацией, качественным и количественным дисбалансом белков экстрацеллюлярного матрикса собственной пластинки слизистой оболочки, замещающихся преимущественно утолщенными и хаотично расположенными пучками коллагена, что ведет к увеличению ригидности и плотности ткани [29; 113]. В свою очередь результатом этого является потеря уникальных биомеханических характеристик голосовых складок, необходимых для генерации волн слизистой оболочки и звукообразования соответственно [36; 75; 83]. В фибротический процесс также может вовлекаться щито-черпаловидная мышца, внутренняя надхрящница, хрящ и область передней комиссуры, результатом чего является несмыкание, полное отсутствие колебаний ГС, формирование стеноза голосового отдела гортани [15; 23].

В настоящее время лечебная тактика при рубцах голосовых складок складывается на следующих принципах. Консервативное лечение, как правило, является первой линией выбора: в профилактике и раннем лечении рубцов определенную роль играют глюкокортикостероиды, антибиотики, муколитическая и антирефлюксная терапия [12; 36; 75]. Фонопедия показывает хорошие результаты при небольших рубцах и применяется как изолированно, так и дополнительно в послеоперационном периоде [23; 184].

Хирургическое лечение рекомендуется проводить не ранее, чем через 6 месяцев после формирования рубца [23; 184; 150]. Целью операций является увеличение объёма, медиализация голосовой складки и улучшение её эластичности. Для этого применяется обширный ряд хирургических методик, включающих эндоларингеальные инъекционные и имплантационные медиализации, медиализационную тироластику, отсепаровку эпителия от рубца, внутрислизистые имплантации синтетических препаратов, например, на основе гиалуроновой кислоты и аутологичных тканей, таких как жир и фасции, а также различные комбинации этих техник и лазерное воздействие на рубцовую ткань [23; 67; 164; 167; 197; 205; 214; 227]. В случаях рубцового стеноза голосового отдела гортани эффективным является восстановление просвета с помощью пластики лоскутами слизистой оболочки на ножке, установка эндоларингеальных стентов, расширяющих просвет гортани и предотвращающих контакт раневых поверхностей, использование CO₂ лазера [1; 2; 3; 15; 17; 20; 21; 22; 23].

Несмотря на разнообразие методик, их результат в реабилитации голосовой функции непредсказуем и существенно ограничен. Данная проблема связана с тем, что существующие методы уменьшают потерю воздуха и усталость при фонации, но не восстанавливают структуру собственной пластинки слизистой оболочки голосовой складки, которая обеспечивает необходимые для её вибрации биомеханические свойства, голосовая складка остаётся жёсткой и неподвижной [75; 83; 152].

Технологии, относящиеся к регенеративной медицине, открывают для клиницистов новые перспективы в разработке методов лечения и профилактики

рубцовых повреждений голосовых складок, и в последнее время интерес к её достижениям в мировой оториноларингологии значительно возрос [33; 111; 135; 152]. Идея, заложенная в такие медицинские стратегии, заключается в восстановлении нормальной структуры и функции тканей голосовых складок на клеточном и молекулярном уровне за счёт целенаправленной, контролируемой активации пролиферации и дифференцировки прогениторных клеток, нормализации синтеза компонентов межклеточного матрикса и ограничения интенсивности воспалительного процесса [120; 231; 182]. Терапевтическими агентами, имплантируемыми в область повреждения, при этом являются биомедицинские продукты на основе клеток из различных источников, несущие их матрицы, выполняющие функцию каркаса (скаффолды), сигнальные молекулы и тканеинженерные конструкции [63; 69; 116; 136; 142; 145; 234].

Исследования в области регенерации голосовых складок – это тема, которая в настоящее время разрабатывается большим числом международных команд, некоторые методы лечения апробированы в клинических испытаниях [100; 115; 151; 154;]. Однако на сегодняшний день остаются открытыми многие вопросы как в изучении механизмов регенерации голосовых складок, выборе эффективного и безопасного источника клеток, подборе скаффолдов и тканеинженерных комплексов, так и в подходах к проведению доклинических исследований, которые позволят результативно транслировать разрабатываемые технологии в клиническую практику.

Цель исследования

Изучение потенциала мезенхимных стромальных клеток в восстановлении морфологических и биомеханических характеристик голосовых складок в эксперименте *in vivo* при рубцовых повреждениях.

Задачи исследования

1. Усовершенствование экспериментальной модели рубцового процесса голосовых складок на лабораторных животных для обеспечения её воспроизводимости при восстановлении структуры голосового отдела гортани методами регенеративной медицины.

2. Оценить возможность применения клеточных продуктов на основе мезенхимных стромальных клеток (МСК) костного мозга человека и клеточного носителя – полиэтиленгликоль (ПЭГ)-фибринового геля *in vivo* при восстановлении рубцовых повреждений голосовых складок на экспериментальной модели.

3. Оценить эффективность восстановления морфологических свойств голосового отдела гортани с использованием МСК костного мозга: аутологичных – в суспензии; человеческих – в суспензии и в комплексе с ПЭГ-фибриновом гелем – на экспериментальной модели рубцового процесса голосовых складок.

4. Оценить эффективность восстановления локальных биомеханических свойств голосового отдела гортани с использованием МСК костного мозга: аутологичных – в суспензии; человеческих – в суспензии и в комплексе с ПЭГ-фибриновом гелем – на экспериментальной модели рубцового процесса голосовых складок.

Научная новизна исследования

1. Данная работа является первым отечественным исследованием, показывающим возможности МСК костного мозга в восстановлении структуры голосового отдела гортани при рубцовых повреждениях.

2. Впервые в рамках одного исследования проведено экспериментальное обоснование эффективности репарации рубцовых повреждений голосового отдела гортани с помощью имплантации аутологичных и человеческих МСК.

3. Впервые на экспериментальной модели *in vivo* показаны возможности использования ПЭГ-фибринового геля и его комплекса с МСК костного мозга человека при восстановлении рубцовых повреждений голосовых складок.

4. Впервые дана комплексная оценка влияния МСК костного мозга на восстановление коллагеновых структур голосовых складок при рубцовых повреждениях.

5. Впервые показана эффективность МСК костного мозга в восстановлении локальных биомеханических свойств голосовых складок при рубцовых повреждениях.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Усовершенствованная в ходе эксперимента модель рубцового процесса голосовых складок на лабораторных животных может быть использована в дальнейших экспериментальных исследованиях по разработке способов восстановления структуры голосового отдела гортани с помощью методов регенеративной медицины и других новых технологий.

Полученные результаты достоверно и наглядно показывают механизмы восстановления голосовых складок при имплантации МСК костного мозга после иссечения рубца и являются основой для применения таких технологий в клинической практике, дальнейшей разработки новых методов лечения пациентов с рубцовыми повреждениями голосового отдела гортани.

Реализация результатов работы

Экспериментальная модель, материалы и методы исследования, основные научные положения и выводы исследования используются в научно-исследовательских работах кафедры болезней уха, горла и носа и Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ России (Сеченовский университет). Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедре болезней уха, горла и носа при изучении дисциплины «Инновации в оториноларингологии» для студентов, аспирантов клинических ординаторов, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ России (Сеченовский университет).

Соответствие диссертации паспорту специальности

Научные положения, отраженные в данном диссертационном исследовании, соответствуют формуле специальности 14.01.03 «Болезни уха, горла и носа». Результаты научно-исследовательской работы соответствуют области исследования специальности, конкретно – пунктам 1 (исследования по изучению этиологии, патогенеза и распространения ЛОР-заболеваний) и 3 (экспериментальная и клиническая разработка методов лечения ЛОР-заболеваний и внедрение их в клиническую практику) паспорта специальности.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие во всех этапах проведения исследования, в том числе самостоятельно проводил эксперименты, связанные с хирургическими методами на лабораторных животных. Диссертант лично проводил сбор материала, его анализ и статистическую обработку данных. Основные результаты исследования оформлены диссертантом в виде публикаций и доложены на российских и международных конференциях.

Степень достоверности результатов

Достоверность и обоснованность результатов работы основана на подробном обзоре и анализе литературы, посвященной выбранной теме диссертации, достаточных размерах экспериментальных групп, четком соблюдении методик исследования, тщательной обработке полученных результатов при помощи современных методов статистической обработки данных. Достоверность первичной документации исследования подтверждена их экспертной оценкой.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Мезенхимные стромальные клетки костного мозга при имплантации в острую фазу раны голосовой складки кролика после иссечения рубца увеличивают степень регенерации голосовых складок, приближая её структуру и биомеханические свойства к нативным, по сравнению с дефектами, репарация которых проходит без введения клеток.

2. Использование полиэтиленгликоль-фибринового геля и его комплекса с МСК костного мозга человека уменьшает интенсивность кровотечения во время операции, не увеличивает риск дыхательных нарушений и делает возможным улучшить результаты клеточной терапии повреждений голосовых складок кролика в конечной точке наблюдения.

3. Способность мезенхимных стромальных клеток костного мозга уменьшать образование рубцов и улучшать механические свойства голосовых складок кролика после острой травмы может быть перенесена на потенциальную клиническую модель иссечения рубца голосовых складок с последующей имплантацией мезенхимных стромальных клеток костного мозга.

Апробация результатов исследования

Основные материалы диссертации доложены на форуме «Наука будущего – наука молодых» (Севастополь, 2015); научно-практической конференции оториноларингологов ЦФО «Актуальное в оториноларингологии» (Москва, 2019); VIII Петербургском форуме оториноларингологов России. (Санкт-Петербург 2019). Собрании Европейского отдела Международного общества тканевой инженерии и регенеративной медицины (TERMIS EU 2019); (Родос, Греция 2019); VII Троицкой конференции с международным участием "Медицинская Физика" (ТКМФ-7); (Троицк 2020). IX Петербургском форуме оториноларингологов

России (Санкт-Петербург 2020); IV Сеченовском международном биомедицинском саммите 2020 (SIBS 2020) (Москва 2020). 13-м Конгрессе Европейского Ларингологического общества (ELS Meeting 2021, on-line); IX Международном междисциплинарном конгрессе по заболеваниям органов головы и шеи (Москва 2021); 47-м Конгрессе Европейского общества искусственных органов (47th ESAO Congress 2021, Лондон, on-line); XX съезде оториноларингологов России (Москва 2021).

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 12 печатных работ: 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации, из них - 1 статья индексируется в SCOPUS, (Q3); 2 статьи в зарубежных изданиях, индексируемых в SCOPUS, (Q1 и Q2); 7 тезисов в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 196 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы, характеризующей материалы и методы исследования, трёх глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Текст документирован 7 таблицами, 56 рисунками. Указатель литературы содержит 237 наименований, из них 28 отечественных источников и 209 зарубежных.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Рубцовое поражение голосового отдела гортани является актуальной и сложной проблемой в оториноларингологии и приводит к стойкому нарушению голосовой функции у пациентов с данной патологией. В тоже время, по данным Консенсусного доклада Комитета по фонохирургии Европейского ларингологического общества (Friedrich G., Dikkers F.G., Arens C., et al., 2013) и ряда других авторов не существует метода лечения, позволяющего полноценно восстановить морфологические и вибрационные характеристики голосовых складок и соответственно голосовую функцию при рубцовых повреждениях [75; 83; 152; 142]. В последнее время в мировой оториноларингологии возрос интерес к достижениям регенеративной медицины, в том числе для восстановления рубцовых дефектов [111; 152; 33; 135]. Ремакль М., Эккель Х. Э. в книге «Хирургия гортани и трахеи» отмечают, что «в регенеративных медицинских стратегиях заложен многообещающий лечебный потенциал» (цит. по: [23])

1.1. Микроанатомия голосовых складок и её роль в биомеханике голосообразования

Морфологически голосовая складка состоит из 6 слоёв в направлении от голосовой щели к пластине щитовидного хряща: эпидермиса, базальной мембраны, поверхностного, промежуточного и глубокого слоя собственной пластинки и голосовой (щито-черпаловидной) мышцы [141; 54; 108; 95].

Голосовые складки покрыты многослойным плоским неороговевающим эпителием, в то время как другие отделы гортани покрыты многорядным реснитчатым эпителием [85; 106; 95]. По данным Gray S.D. (2000), в голосовом отделе гортани последний также обнаруживается в задних отделах и в небольшом количестве в области передней комиссуры [85]. В том же исследовании Gray S.D. (2000) сообщается о наличии микрорельефа на поверхности эпителиальных

клеток, который, по-видимому, играет роль в адгезии муцинов и адсорбции воды, а также необходим для слипания поверхности голосовых складок при вибрации [85]. В экспериментальном исследовании Fisher K. V. и соавт. (2001) в эпителиальных клетках ГС обнаружили также Na^+ - K^+ -АТФазу и транспорт электролитов, обусловленный ее активностью, которые обеспечивают внутренние механизмы регуляции объема клеток, а также гидратацию голосовой складки [68]. Между собой клетки эпидермиса связаны межклеточными контактами по типу десмосом, что по мнению Kutty J. (2008) обуславливает их устойчивость к механическим нагрузкам при фонации [141]. Ближайшие к просвету гортани плоские эпителиальные клетки постепенно сменяются делящимися клетками базальных слоёв, но при этом, в отличие от эпидермиса кожи - сохраняют метаболическую активность до момента слущивания [85]. Голосовые складки, несмотря на отсутствие желёз непосредственно в подлежащих структурах, покрыты мукополисахаридным «одеялом», в котором, как и в других отделах дыхательных путей, присутствуют два слоя: муциновый (ближайший к просвету, медиальный) и серозный (прилегающий к эпителию, латеральный). Движение и обновление мукополисахаридного покрова осуществляется за счёт мукоцилиарного транспорта из трахеи в гортань, который в норме происходит со скоростью 4–21 мм/мин. в циркулярном направлении назад и вверх, в сторону межчерпаловидной области, где затем происходит проглатывание слизи [85; 117; 76].

Под эпителием располагается зона базальной мембраны, которая участвует в прикреплении эпителия к поверхностному слою собственной пластинки голосовой складки. Основными морфофункциональными элементами зоны базальной мембраны являются якорные белки, состоящие из коллагена IV и VII типов, при этом коллаген IV типа связывается с клетками базального слоя эпителия, а коллаген VII типа в виде петель опускается до поверхностного слоя собственной пластинки, где через них проходят коллагеновые волокна; Gray S. D. и соавторы (1994) ассоциируют такую архитектуру с механизмом закрепления эпидермиса [85; 141; 87]. Количество анкерных фибрилл генетически

детерминировано и в норме составляет от 80 до 120 на единицу площади, а в случае гетеро- и гомозиготных рецессивных аллелей по коллагену VII типа уменьшается, что может быть ассоциировано с развитием патологических изменений в голосовых складках, например певческих узелков [85; 87; 223].

Между эпителием, зоной базальной мембраны и голосовой мышцей находится собственная пластинка голосовой складки, толщиной около 1 мм [178]. Она отчетливо разделена на три слоя, различие между ними заключается в качественном, количественном составе и 3-мерной архитектонике компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) [95; 84; 107]. Поверхностный слой собственной пластинки, ближайший к эпителию, также известный как пространство Рейнке, содержит наименьшее количество фибриллярных белков, таких как коллаген и эластин, что определяет его высокую подвижность [84]. В промежуточном (среднем) слое преобладает эластин, а в глубоком слое собственной пластинки его количество уменьшается и одновременно начинает преобладать коллаген, содержание которого там достигает относительного максимума [84; 92]. По данным исследования Gray S.D. и соавторов (1993) коллаген в собственной пластинке представлен I, II и III типами [86; 178]. При этом коллаген III типа преобладает и встречается во всей собственной пластинке, тогда как коллаген I типа обнаруживается в поверхностном и глубоком слоях [218]. Промежуточный и глубокий слой собственной пластинки формируют собственно голосовую связку. Коллагеновые пучки представлены продольно-ориентированными волокнами и, в виду высокой механической плотности и резистентности к растягиванию, придают прочность собственной пластинке голосовой складки, а эластические волокна – способность к её деформации и возвращению в исходное состояние [85; 84]. Помимо фибриллярных белков в собственной пластинке присутствуют такие интерстициальные молекулы, как гликопротеины – фибронектин; протеогликаны – декорин, фибромодулин, версикан; кислые глюкозамингликаны – гиалуроновая кислота [85; 172; 84; 92; 88]. Функция интерстициальных белоксодержащих молекул заключается в связывании и изменении кинетики образования коллагена (фибромодулин, декорин и фибронектин), что регулирует размер, морфологию

фибрилл и соответственно играет роль в организации ВКМ голосовой складки [85; 172; 88; 94]. Декорин в большей степени присутствует в поверхностном слое собственной пластинки. По данным *in vitro* исследований, в его присутствии коллагеновые волокна созревают более тонкими и небольшого размера, что, по мнению Gray S. D. и соавторов (1999), может объяснять меньший риск рубцевания голосовых складок при операциях, не выходящих за пределы пространства Рейнке [172; 88; 94]. По данным тех же авторов, фибромодулин, располагаясь в промежуточном и глубоком слое, выполняет функцию снижения трения эластина и коллагена для адаптации к определённым вокальным нагрузкам [172; 88]. Вторая важная задача интерстициальных молекул заключается в связывании воды и повышении вязкости ткани, ключевую роль в этом играет гиалуроновая кислота. Последняя в наибольшем количестве обнаруживается в промежуточном слое собственной пластинки и компенсирует вибрационные нагрузки, выполняя амортизационную функцию [31; 85; 88; 172].

С позиции биомеханики вибраций, необходимых для возникновения голоса, структуру голосовых складок разделяют на так называемый «покров» и «тело», согласно основополагающим работам Минору Хирано, выполненным в 1970-х годах. Слизистая оболочка (эпителий и поверхностный слой собственной пластинки) являются «покровом» и представляют собой единую морфофункциональную единицу, способную к самоподдерживающимся колебаниям относительно «тела», которое образовано глубоким слоем собственной пластинки, лежащим на голосовой мышце, средний же слой собственной пластинки обозначается как «переходная зона» [106; 108; 107]. Позднее были предложены несколько иные деления, различия в которых в основном касаются положения промежуточного слоя собственной пластинки, так Dijkers F. G. (1994) относит к «телу» голосовую мышцу и эластический конус, в который входит средний и глубокий слой собственной пластинки, а Hammond T. H. и соавторы (1998) большую часть промежуточного слоя присоединяют к «покрову» [95; 61; 91]. В любом случае, основная идея заключается в том, что «покров» и «тело» обладают разной биомеханикой, что в свою очередь

определяется строением межклеточного матрикса. Для слизистой оболочки характерны вязкоупругие свойства, это связано с низким содержанием фибриллярных белков (коллагена и эластина), а также сложными межмолекулярными взаимодействиями между другими компонентами ВКМ, наибольшее значение среди которых имеет гиалуроновая кислота [88; 53]. Количественно биомеханика слизистой оболочки в работах Chan R. W. и Titze I. R. (1999) описывается в двух параметрах: 1) модуль упругого сдвига (μ), измеряющийся в системе СИ в Паскалях и, в целом, он отражает эластичность (энергия, накопленная тканью во время одного колебания, для возврата в исходное состояние); 2) динамическая вязкость (η), в системе СИ единица измерения – Паскаль-секунда, показывает вязкость ткани (часть энергии от всей приложенной для колебания, которая «безвозвратно» рассеялась в ткани) [51; 52]. Эти параметры различаются между полом, возрастом и имеют линейную зависимость с подскладковым давлением воздуха, необходимым для начала фонации [88; 51]. Следует отметить практическую составляющую данных исследований, так, например, из аутологических материалов, широкого используемых в фонохирургии, жировая ткань обладает наилучшим сходством по параметру динамической вязкости со слизистой оболочкой голосовых складок, что было показано в работе Chan R..W. и Titze I..R. (1998) [53].

Механические свойства промежуточного и глубокого слоя собственной пластинки (голосовой связки) количественно хорошо описываются классическим модулем упругости (Юнга), при этом его значения существенно отличаются при измерении в поперечном направлении (Tran Q.T. et al., 1993) и продольном (Min Y.B. et al., 1995) [226; 158]. Модуль упругости голосовой складки при продольном измерении также не является константой, а изменяется в сторону увеличения при растяжении голосовой складки, и такая зависимость – больше, чем линейная, то есть при слабом напряжении голосовая складка в продольном направлении растягивается легко, а при дальнейшем – сопротивление возрастает многократно [226]. Такая анизотропия механических свойств связана с архитектурой фибриллярных белков голосовой связки, одним из объяснений является то, что

эластин растягивается первым, а затем растяжение усложняется за счёт коллагеновых волокон [84]. Важным параметром является и строение фибрилл, из которых состоят коллагеновые волокна, их спиральная скрученность служит буфером, благодаря которому в начале растяжения голосовая складка деформируется без значимых усилий. Наиболее подробные данные о связи микроархитектоники собственной пластинки с биомеханикой голосовых складок были получены с помощью атомно-силовой и лазерной сканирующей микроскопии и математически обоснованы в работах Miri A.K. и соавторов (2012; 2013) [161; 159; 96]. Схематичное изображение компонентов экстрацеллюлярного матрикса собственной пластинки голосовых складок представлено на Рисунке 1.

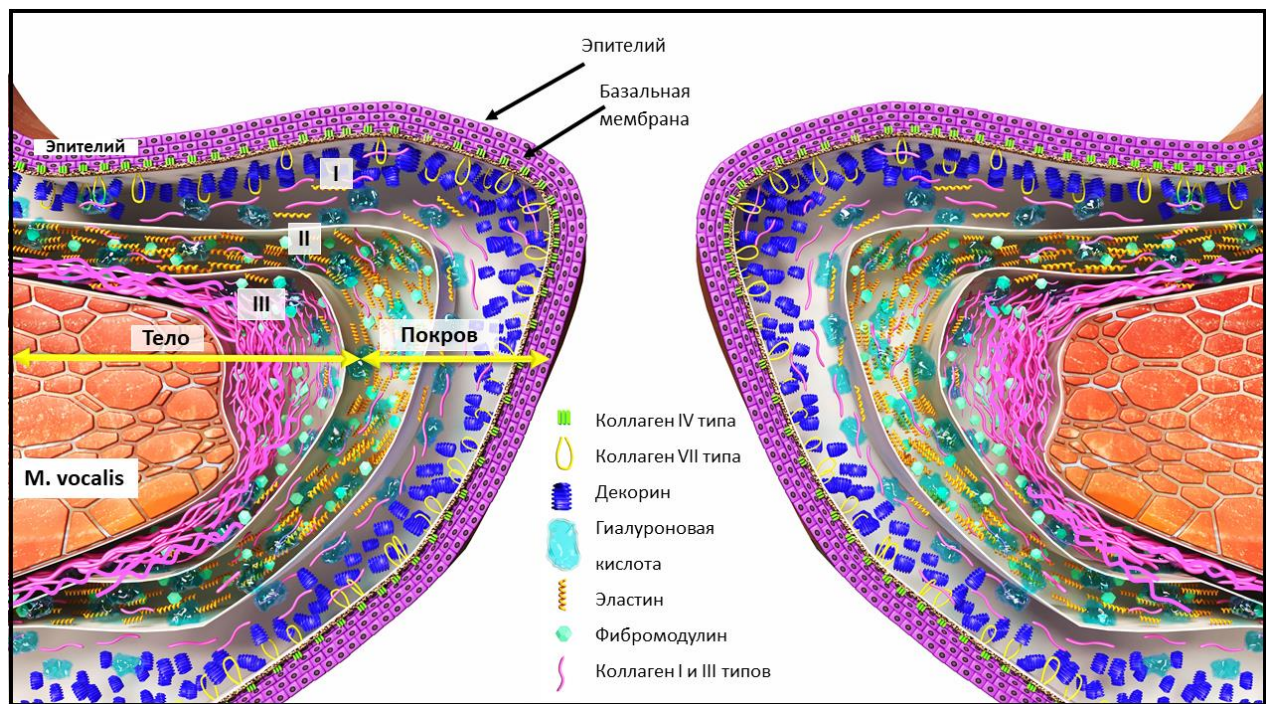


Рисунок - 1. Схема строения голосовых складок: I – поверхностный, II – промежуточный, III – глубокий слои собственной пластинки. Собственное моделирование (Autodesk 3ds Max).

Основными мышцами, влияющими на конфигурацию голосовых складок, за счёт чего реализуются возможности частотного диапазона, заложенные в их

биомеханических характеристиках, являются щито-черпаловидная и перстне-щитовидная (Hirano M., 1974, 1988), что также подтверждено математической моделью в работе Vahabzadeh-Hagh A. M. и соавторов (2017) [105; 109; 229].

По клеточному составу в собственной пластинке голосовой складки преобладают фибробласты, также присутствуют миофибробласты и макрофаги [38; 48; 104]. Около переднего и заднего конца собственной пластинки голосовой складки между щитовидным и черпаловидным хрящом, соответственно, располагаются так называемые жёлтые пятна (*maculae flavae*), фактически, собственная пластинка располагается между ними [203]. *Maculae flavae* имеют размер около 1,5×1,5 мм, заметны при эндоскопическом исследовании гортани в виде бело-желтых масс на концах мембранозной части голосовых складок, основным компонентом *maculae flavae* являются плотные скопления звёздчатых клеток, вокруг которых располагаются коллагеновые, эластические, ретикулярные волокна и гиалуроновая кислота, что подробно описано, включая 3D визуализацию структуры жёлтых пятен, в работах Sato K. и соавторов (2003, 2010); [201; 199]. Звёздчатые клетки являются отдельным видом клеток голосовых складок, они имеют множество отростков, внутри обнаружены развитые органеллы, большое количество везикул с липидами и витамином А, для которых характерна постоянная метаболическая активность в синтезе компонентов ВКМ [201; 199; 204]. *Macula flavae* играют важную роль в развитии, формировании и старении ВКМ голосовой складки, в том числе в поддержании слоистой структуры собственной пластинки [203; 201; 199; 204]. При рождении собственная пластинка голосовой складки отсутствует, а жёлтые пятна обнаруживаются на тех же местах, что и во взрослом возрасте; в *maculae flavae* новорожденных количество звёздчатых клеток в 5 раз выше, чем у взрослых [95; 204]. Считается, что именно вибрационные нагрузки, возникающие с началом фонации, стимулируют развитие собственной пластинки голосовой складки; также доказано, что вибрационные нагрузки оказывают значительное влияние на профиль синтезируемых компонентов ВКМ собственной пластинки голосовой складки [202; 124].

Голосовые складки человека – это уникальная система в человеческом организме, в которой возможны управляемые колебания с частотой 100–1000 Гц и выше и амплитудой волн слизистой оболочки около 1 мм [124; 225]. Такие возможности обеспечиваются сложноустроенной морфологией и микроархитектоникой компонентов собственной пластинки ГС, создающих необходимые для колебаний и фонации биомеханические свойства голосового отдела гортани.

1.2. Этиология рубцовых повреждений голосового отдела гортани

Рубцовые повреждения голосового отдела гортани возникают в результате широкого спектра патологических состояний, ряд из которых может быть врождённым, но чаще является приобретённым заболеванием, возникшим в результате замещения нормальной ткани рубцовой в результате воспалительного процесса после травмы [36].

Малыми анатомическими аномалиями, патофизиологически соответствующие рубцам, являются борозды голосовых складок, которые характеризуются атрофией участка собственной пластинки и расположением эпителия в этом месте непосредственно на голосовой связке или на щито-черпаловидной мышце (Старостина С. В., 2016; Giovanni A. и др., 2007); [79; 26]. Ряд авторов считает, что борозды ГС являются врождённой патологией, которая этиологически тесно связана с такой микроаномалией гортани, как эпидермоидные кисты, то есть по сути являются открытой формой такой кисты [162]. Подтверждением такого взгляда является длительный анамнез дисфонии у таких пациентов, начиная с детства, случаи борозд голосовых складок у монозиготных близнецов и частая коморбидность борозд голосовых складок, эпидермоидных кист и мостиков слизистой оболочки (возможный результат прорыва кисты выше и ниже свободного края голосовой складки); [79; 162; 42; 39]. В тоже время другие учёные считают, что данная патология может быть

приобретенной, так как у 73% пациентов с бороздами голосовых складок дисфония возникла после 40 лет [128]. По заключению Giovanni A. и соавторов (2007) в обзорной работе, посвященной проблеме борозд голосовых складок, в пользу возможной приобретенной этиологии говорит и то, что случаи двусторонних борозд маловероятно могут быть объяснены симметричным разрывом эпидермоидных кист; в целом врожденная и приобретенная теории борозд голосовых складок являются комплементарными [79]. В исследовании Sato K. и Hirano M. (1998), по данным электронной микроскопии отмечена дегенерация фибробластов, коллагеновых и эластических волокон жёлтого пятна при бороздах голосовых складок [200].

Непосредственными причинами приобретенных рубцов являются автодорожные, бытовые, спортивные острые и тупые травмы гортани, ожоги, острый и хронический ларингит, особенно в сочетании с рефлюксной болезнью, перенапряжение голоса [23; 36; 28; 9; 121]. Особую сложность в диагностике и лечении представляют колото-резаные и огнестрельные ранения шеи, сопровождающиеся сочетанным повреждением полых органов (Мустафаев Д. М., Егоров В. И., 2017); [14]. Отдельно стоит выделить ятрогенные повреждения голосовых складок при интубации трахеи, длительной ИВЛ, хордэктомии по поводу карцином голосовых складок и хирургическом лечении предраковых заболеваний гортани [5; 184; 137; 235] Высоким риском формирования рубцовых повреждений гортани, в частности рубцовой мембраны в области передней комиссуры, сопровождаются повторные операции при респираторном папилломатозе (Солдатский Ю. Л. и др., 2011; Егоров В. И. и др., 2018); [8; 24]. Также существенным остаётся риск рубцовых повреждений голосовых складок в результате эндоскопических операций по поводу доброкачественных поражений голосовых складок при травме промежуточного и глубокого слоя собственной пластинки ГС [111; 235; 176; 150]. По данным исследования Shin Y. S. и соавт. (2013), у 39 (5,2%) из 755 пациентов после хирургического лечения доброкачественных поражений голосовых складок была диагностирована

дисфония и более чем в 50% случаев её причина заключалась в рубцовом повреждении [207].

Вне зависимости от причины при травме голосовых складок происходит нарушение их макро- и микроструктуры, вслед за которым незамедлительно начинаются репаративные процессы, к которым может быть применено классическое разделение на стадии воспаления, пролиферации и ремоделирования [40; 220].

1.3. Экспериментальные исследования рубцовых повреждений голосовых складок на животных моделях

Морфологические особенности и патофизиологические механизмы острой травмы голосовых складок. По очевидным этическим нормам большинство детальных исследований, характеризующих этапы и механизмы репаративных процессов, выполняются на животных моделях. При гистологическом исследовании препаратов голосовых складок кроликов и крыс с острой хирургической травмой, нанесённой холодным инструментарием, было показано, что в первые сутки рана голосовой складки покрывается фибрином, к третьему дню происходит его замещение грануляционной тканью, которая покрывается эпителием [40; 219]. Также на 3-и сутки в области раны наблюдается наибольшая клеточная инфильтрация за счёт лейкоцитов и фибробластов [40; 147]. Значительные изменения по сравнению с интактными голосовыми складками наблюдаются в составе и «архитектуре» компонентов ВКМ слизистой оболочки. По результатам исследования Tateya T. и соавторов (2006), количество гиалуроновой кислоты в ней увеличивается к 5-му дню, однако затем происходит существенное снижение, подобные процессы наблюдаются и при заживлении повреждений кожи, эти данные могут быть объяснены участием гиалуроновой кислоты в клеточной миграции (Stephens P. и соавторы, 2002) [213; 219]. В этом

же исследовании показано, что образование коллагена III типа начинается с 1-го дня после травмы, а коллагена I типа с 3-го дня, что, по мнению авторов, может быть связано с функционированием коллагена III типа в качестве матрицы для удержания формирующейся грануляционной ткани [219]. К 5-му дню образование коллагена значительно возрастает, в дальнейшем к 14-му дню происходит увеличение плотности депозитов коллагена и нарастание дезорганизованности коллагеновых волокон по сравнению с интактными голосовыми складками [40; 219]. Содержание фибронектина, гликопротеина, участвующего в процессах эпителизации, адгезии клеток, реконституции внеклеточного матрикса, количество которого увеличивается при травме, в голосовых складках его содержание также возрастает к 3-му дню и продолжается параллельно отложению и ремоделированию коллагена [219].

По мнению ряда исследователей, наблюдаемые морфологические воспалительные и пролиферативные процессы в первые несколько дней после повреждения голосовых складок отражают своеобразную критическую точку, определяющую дальнейшее течение репарации и конечный функциональный результат, что диктует необходимость поиска и разработки методов предотвращения рубцевания на ранних этапах [29; 40; 219; 43]. В свою очередь данные процессы являются логической цепочкой патофизиологических реакций, когда провоспалительные цитокины, первоначально высвобождаясь из тромбоцитов, осуществляют хемотаксис нейтрофилов и макрофагов, что затем приводит к активации фибробластов и синтезу ими компонентов ВКМ [29].

Эти межклеточные взаимодействия управляются сложной схемой регуляторных факторов, что было показано в ряде исследований на животных моделях с помощью оценки экспрессии соответствующих генов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [191; 233; 146]. По данным работы Welham N. V. и соавт. (2008), в течении 1 часа после травмы голосовой складки крыс в месте повреждения – по сравнению с интактными голосовыми складками – статистически значимо повышается экспрессия мРНК циклооксигеназы-2, (ЦОГ-2), фактора некроза опухолей альфа (TNF- α), интерлейкина – 1 β (ИЛ-1 β) и

гиалуронсинтазы (HAS)-1 [233]. На протяжении 72 часов после травмы голосовых складок кроликов наблюдалось значимое повышение экспрессии матриксных металлопротеиназ 1 и 9 (MMPs-1; -9), коллагена I, коллагена III и фибронектина – по данным исследования Rousseau V. G. и соавторов (2008) [191]. В работе со схожим дизайном, но проведённой на крысах (Lim X. et al., 2006), через 4 и 8 часов было выявлено динамическое увеличение экспрессии ИЛ-1 β и ядерного фактора $\kappa\beta$, через 72 часа - наблюдался пик экспрессии, трансформирующего фактора роста β (TGF- β), проколлагена 1 и 3, HAS-2 [146]. Одним из потенциально важных медиаторов, участвующим в формировании фиброзных изменений голосовых складок является TGF- β , в исследовании Branski R. C. и соавторов (2009) было показано, что воздействие TGF- β через Smad-сигнальные пути значительно усиливает экспрессию коллагена и миграцию фибробластов голосовых складок [41]. Значение этого фактора, а также матриксных металлопротеиназ, сосудистого эндотелиального фактора роста A и других потенциальных мишеней подчёркнуто в обзорном исследовании Вавина В. В. и соавторов (2020) [4].

Такая согласованность результатов разных исследований и их корреляция с морфологическими изменениями позволяют говорить о достаточно типичном тканевом ответе голосовой складки на острую механическую травму.

Характеристика рубцов голосовых складок. Описанные фазы воспаления и пролиферации, начинаются практически одновременно сразу после травмы, при этом стадия пролиферации длится дольше воспаления и после восстановления эпителиального покрова постепенно сменяется стадией ремоделирования, заключающейся в постепенном превращении грануляционной ткани в зрелый рубец [220; 64; 213]. Началом этой фазы, которое обычно происходит через 3 недели после травмы, можно считать уравнивание скорости синтеза коллагена и его деградации, то есть фактически прекращение увеличения количества коллагена в ране, длительность данной стадии может значительно варьировать и продолжаться до 1 года [174].

Так, по данным работы Thibeault S. L. и соавторов (2002) через 2 месяца после травмы голосовых складок кролика в созревающем рубце методом иммуногистохимии обнаруживается значительное количество проколлагена I по сравнению с интактными голосовыми складками, что по заключению авторов свидетельствует о продолжающемся его синтезе в раннюю фазу ремоделирования [222]. В исследовании Hirano S. и соавторов (2003) также показано, что у собак в голосовых складках как через 2 месяца, так и через 6 месяцев после травмы, по сравнению с нормой, значимо повышен уровень фибронектина, при этом через 6 месяцев дополнительно происходит увеличение содержания коллагена, что говорит о незрелой ткани рубца через 2 месяца [112].

По заключению Tateya T. и соавт. (2005), в экспериментальной работе на крысах – через 2 месяца после травмы – рубцы голосовых складок являются зрелыми; обнаружены отличия заживления голосовых складок по сравнению с кожей, заключающиеся в первоначальном увеличении в рубце голосовых складок коллагена I и III типа, с последующим снижением количества коллагена I типа, для рубцов кожи – напротив, характерно замещение коллагена III типа I-м. При этом следует отметить, что в норме в голосовых складках крыс также значительно преобладает коллаген III типа [220]. Различающиеся сроки созревания рубцовой ткани следует учитывать при планировании экспериментов на животных моделях.

По данным ряда исследований на животных, рубцовая ткань голосовых складок через 2–6 месяцев после травмы характеризуются пространственной дезорганизацией, качественным и количественным дисбалансом белков экстрацеллюлярного матрикса собственной пластинки, которая замещается преимущественно утолщенными и хаотично расположенными пучками коллагена (Thibeault S. L. et al., 2002; Rousseau B. et al., 2003, 2004). Количество эластических волокон значительно снижается, уменьшается их плотность, волокна фрагментируются и укорачиваются. В рубцово-поврежденных голосовых складках повышается жесткость и вязкость ткани, что выражается в увеличении показателей модуля упругого сдвига и динамической вязкости по данным

исследования механических свойств методом параллельной реометрии [222; 190; 189].

Несмотря на присутствие гиалуроновой кислоты в собственной пластинке голосовых складок и предполагаемую роль в поддержании вязкоупругих свойств (Gray S. D. et al., 1999), её содержание не имело существенных различий между рубцами голосовых складок и контролем во всех рассматриваемых работах. Однако, учитывая значимое увеличение гиалуронсинтаз и собственно гиалуроновой кислоты в ранние сроки после травмирования голосовых складок (Welham N. V. et al., 2008; Lim X. et al., 2006; Tateya T. et al., 2006), гиалуроновая кислота может играть роль в предотвращении избыточного фиброза в раннюю фазу повреждения [88; 146; 219; 233].

В целом, в приведённых исследованиях авторы полагают, что в потере нормальных механических свойств голосовых складок наряду с количественными изменениями компонентов ВКМ, в частности, отложением депозитов коллагена, большая роль принадлежит нарушению микроархитектоники белков ВКМ, что согласуется с исследованиями, проведенными впоследствии Miri A. K. и соавторами (2013; 2015), по данным которых модуль упругости тканей голосовых складок с одинаковой концентрацией коллагена в большей мере зависит от степени сшивки и структурных конфигураций, чем просто от концентрации коллагеновых фибрилл [159; 222; 190; 189, 97].

1.4. Классификация рубцовых повреждений голосового отдела гортани

Для подскладковых, эндотрахеальных и сочетанных ларинготрахеальных рубцовых стенозов существует два типа классификаций, основанных на степени сужения просвета, например по Myer C. M. и Cotton R. T. (1994) и на степени распространённости процесса вдоль дыхательной трубки, например классификация McCaffrey T. V. (1992); [166; 57]. Опубликовано несколько различных классификаций рубцовых повреждений голосового отдела гортани, так

Ford C. N. и соавт. (1996) предложена классификация борозд голосовых складок, в которой выделено 3 типа на основании глубины дефекта и сопутствующих симптомах: 1) физиологическая борозда, затрагивающая только поверхностный слой собственной пластинки и не связанная со специфическими симптомами; 2) патологический тип, приводящий к умеренной дисфонии и объективно характеризующийся полосой дистрофии собственной пластинки, разделяющей медиальный край голосовой складки на верхнюю и нижнюю губу, (стрия); 3) патологический тип, истинная борозда, для которой характерна атрофия слизистой оболочки в форме кармана, которая затрагивает глубокие слои собственной пластинки вплоть до щито-черпаловидной мышцы и клинически проявляющаяся выраженной дисфонией [70].

Классификация рубцовых повреждений гортани по этиопатогенетическому принципу предложена Benninger M. S. и соавт. (1996) и включает в себя рубцы: 1) в результате тупых и проникающих ранений; 2) рубцы после лучевой терапии и хирургического лечения онкологических заболеваний; 3) рубцы в результате ятрогенных травм (оротрахеальной интубации, фонохирургических вмешательств и т. д.); 4) рубцы в результате воспалительных заболеваний (ГЭРБ, ревматоидный артрит, полихондрит, бактериальные инфекции, приводящие к некротическим процессам и т. д.); 5) рубцы в результате смешанных причин [36].

Рабочий комитет Европейского Ларингологического Общества (Remacle M., Eckel H. E. et al., 2000) разработал классификацию эндоларингеальных хордэктомий, её приведение в данной работе представляется целесообразным ввиду очевидной связи объёма оперативного вмешательства и последующих рубцовых изменений. Изначально было выделено 5 типов операций, 5-й тип разделен на 3 подтипа, а в 2007 году добавлен 6-й тип (Remacle M., Van Haverbeke et al., 2007): 1) субэпителиальная (резекция эпителия); 2) сублигаментная (резекция эпителия и собственной пластинки); 3) резекция слизистой оболочки и частично голосовой мышцы; 4) тотальная резекция голосовой складки от голосового отростка до передней комиссуры; 5) расширенная, которая в свою очередь разделена на 3 подтипа в зависимости от направления: 5а – резекция

включает переднюю комиссуру и противоположную голосовую складку; 5b – резекция голосовой складки и голосового отростка черпаловидного хряща с ипсилатеральной стороны; 5c – резекция голосовой складки и складки преддверия с ипсилатеральной стороны; 5d – резекция голосовой складки с расширением до 1 см в подскладковое пространство, однако авторы отмечают, что ряд хирургов считает такой тип операций противопоказанным; б) резекция области передней комиссуры с переменным включением передних отделов ГС с обеих сторон [183; 185].

М. Ремакль, Х. Э. Эккель в книге «Хирургия гортани и трахеи» (2014), выделяют 4 типа рубцов голосовых складок на основании выраженности рубцового процесса: тип I – рубцы, вовлекающие слизистую оболочку и собственную пластинку, приводящие к снижению вибраций ГС и лёгкому или умеренному несмыканию; II – рубцы, вовлекающие голосовую мышцу и проявляющиеся умеренным несмыканием ГС в передней комиссуре и отсутствием вибрации ГС; III – рубцы, вовлекающие внутреннюю надхрящницу и хрящ, с возможным распространением на надскладковый отдел и черпаловидные хрящи; IV – рубцы, приводящие к формированию рубцовой мембраны в области передней комиссуры и билатеральному нарушению вибрации [23].

В 2019 году Американской Ларингологической Ассоциацией и Европейским Ларингологическим Обществом предложена классификация рубцов голосовых складок по глубине и распространённости повреждения, включающая 4 типа и несколько подтипов. Для I типа характерны повреждения собственной пластинки ГС с возможным вовлечением эпителия – при стробоскопии определяется вогнутость медиального края, к этому виду также отнесены пресбифонические изменения и борозды ГС, данный тип разделен на два подтипа: а) односторонняя патология; б) двусторонняя. Ко II типу отнесены глубокие рубцы с вовлечением голосовой мышцы, как и для I типа, выделено два подтипа по такому же принципу. Рубцы III типа – это рубцы, возникшие в области передней комиссуры, к ним отнесены последствия хордэктомии 5-го и 6-го типов и врожденные мембраны. IV типом являются обширные одно- или двусторонние

рубцовые повреждения голосового отдела гортани с распространением в задние отделы и фиксацией ГС (тип IVa) и возникновением над- или подскладкового стеноза (тип IVб); [93].

1.5. Диагностика рубцовых повреждений голосового отдела гортани

Механизм клинических проявлений рубцов голосовых складок связан с нарушением геометрии и биомеханических характеристик голосовых складок, необходимых для генерации волн слизистой оболочки и звукообразования соответственно [75; 36; 83]. Жалобами при рубцах гортани являются длительная охриплость вплоть до афонии, быстрая голосовая утомляемость, потеря контроля над фонацией. Диагностический алгоритм помимо тщательного сбора анамнеза должен включать видеоларингостробоскопию, а также при необходимости фиброларингоскопию, высокочастотную видеосъемку или кимографию [23; 75; 36]. Фактически, видеоларингоскопия в режиме стробоскопического эффекта – это главный инструмент в диагностике таких состояний [36]. В случае значимого дефекта, как после хордэктомии, диагностика не вызывает затруднений, в отличие от небольших дефектов, в т. ч. борозд ГС. Проявлениями являются веретенообразная голосовая щель при фонации и вогнутый край голосовой складки, которые ведут к неполному смыканию и утечке воздуха. Ко второй группе ларингоскопических признаков относят нарушение вибрации ГС в виде снижения амплитуды колебаний, нерегулярности, асинхронности, асимметрии волн слизистой оболочки, либо его полного отсутствия, также может выявляться локально утолщенный невибрирующий бледный участок, препятствующий распространению волны свободного края ГС [75; 36]. Следует учитывать возможность развития компенсаторных гипертонусных фонационных паттернов, например, вестибулярного голоса, особенно при предшествующих дисфонии операциях [75; 36]. Antoine Giovanni и соавт. (2007) при планировании лечения указывают на возможность прямой опорной микроларингоскопии для выявления

труднодиагностируемых борозд ГС [79]. Европейским Ларингологическим обществом (Dejonckere P. H., Bradley P., Clemente P. et al., 2001) предложен базовый протокол функциональной оценки патологии голоса для исследования эффективности фонохирургического лечения и новых методов оценки. В него включены 5 позиций: 1-я – выраженность охриплости и одышки по визуально-аналоговым шкалам; 2-я – оценка видеоларингостробоскопии (смыкание ГС, регулярность колебаний, качество волны слизистой оболочки, симметричность колебаний); 3-я – аэродинамика (максимальное время фонации, либо коэффициент фонации по формуле ЖЕЛ/макс. время фонации); 4-я – акустические данные (параметры «jitter» и «shimmer», максимальная частота фонации, интенсивность при максимальном голосовом комфорте); 5-я – влияние голоса на качество жизни: данные опросника (voice handicap index) или визуально-аналоговых шкал [60].

Отдельно стоит рассмотреть результаты гистологического исследования рубцовых повреждений голосовых складок человека. В работе Hirano S. и соавт. (2009) были исследованы 9 образцов рубцовой ткани голосовых складок, полученные при биопсии у пациентов, которым требовалась ревизионная микроларингоскопия через 3–13 месяцев после хордэктомии по поводу плоскоклеточного рака голосового отдела гортани. По результатам исследования, была выявлена зависимость между типом хордэктомии, согласно классификации Европейского Ларингологического Общества (Remacle M., Eckel H. E. et al., 2000) и выраженностью рубцовых повреждений [183]. В препаратах участков голосовых складок после хордэктомии I типа наблюдалось меньше депозитов коллагена и сохранение эластических волокон по сравнению с таковыми после хордэктомии II и III типов, в которых были обнаружены массивные отложения коллагена, состоящие из дезорганизованных и утолщенных волокон, и исчезновение или дезорганизация эластина. Авторы отмечают, что от типа хордэктомии мало зависело содержание в препаратах фибромодулина и гиалуроновой кислоты, однако количество декорина было несколько выше после щадящих резекций [113].

1.6. Лечение пациентов с рубцовыми повреждениями голосового отдела гортани

«Лечение рубцов гортани является одной из самых сложных проблем в ларингологии» (цит. по: [23]). В настоящее время лечебная тактика при рубцах голосовых складок строится на следующих принципах. Консервативное лечение, как правило, является первой линией выбора: в профилактике и ранней терапии рубцовых повреждений определенную роль играют глюкокортикостероиды, антибиотики, муколитическая и антирефлюксная терапия [75; 36; 12; 6]. Фонопедия показывает хорошие результаты при небольших рубцах и в ряде случаев может оказать единственным необходимым методом реабилитации несмотря на то, однако полноценного восстановления голоса, как правило, не происходит [36; 235]. Фонопедия может применяться как изолированно, так и быть важным дополнительным методом послеоперационного ведения пациента [23; 184]. Занятия с фонопедом начинают как можно раньше в послеоперационном периоде, для снижения риска развития компенсаторной гипертонусной дисфонии, и продолжают до завершения ремоделирования рубца, что делает возможным снизить его механическую плотность [75; 36]. Интересным, однако мало распространенным на сегодняшний день, вариантом голосовой коррекции в реабилитации пациентов с рубцами ГС являются занятия пением на основе упражнений, которые используют профессиональные певцы во время распевания [188]. Также пациентам с высокой вокальной нагрузкой, например учителям и лекторам, рекомендуется использовать технические средства, усиливающие голос (микрофон); [188].

Хирургическое лечение рекомендуется проводить не ранее чем через 6 месяцев после формирования рубца [23; 184; 150]. Целью операций является увеличение объёма, медиализация голосовой складки и улучшение её эластичности, что необходимо для уменьшения выраженности основных

клинических проявлений: потери воздуха при фонации и нарушения вибрации слизистой оболочки ГС [75].

Медиализация ГС применяется, когда ведущей причиной дисфонии служит неполное закрытие голосовой щели. Путем исправления геометрии ГС достигается их смыкание, что приводит к увеличению громкости голоса, снижению голосового напряжения и потери воздуха. Необходимо отметить, что основным показанием к медиализационным методикам остаётся односторонний паралич гортани, сопровождающихся вторичной мышечной атрофией складок и недостижением медианного положения при фонации, однако в случае несмыкания ГС при рубцовой деформации их эффективность также была доказана [23; 75; 36; 7; 10]. Существуют две основные разновидности этих операций: медиализационная тиропластика и инъекционная медиализация.

Медиализационная тиропластика. Данный тип операций относится к хирургии хрящей гортани и, в случае рубцов голосового отдела гортани, может быть использован при рубцах III типа (после полной или расширенной хордэктомии) по М. Ремаклю [23]. Медиализационная тиропластика впервые предложена Paug E. (1915), впоследствии концепция активно разрабатывалась Isshiki N (1975, 1989). При этом главная идея остаётся неизменной, несмотря на многочисленные модернизации, и заключается в механическом сдвиге пораженной складки в медиальном направлении на расстояние достаточное для полного смыкания ГС во время фонации [173; 71; 127; 126]. Для этого со стороны щитовидного хряща создаётся разрез или чаще «окно» в проекции голосовой складки, через которое вводится имплант. Имплант может быть как из аутологичного материала, например хряща, так и синтетическим [205; 126; 74; 78; 155].

Наиболее распространенным вариантом является использование титанового импланта, разработанного Friedrich G. (1999), однако также описано применение «растянутого» политетрафторэтилена (Gore-Tex®), силикона [126; 74; 78; 155]. Медиализация ГС с помощью аутологичного импланта в форме прямой призмы с треугольным сечением из хряща перегородки носа предложен

Старостиной С. В. и соавторами (2012), способ позволяет до операции рассчитать размер импланта, необходимый для обеспечения смыкания ГС по разработанным формулам с учётом положения парализованной голосовой складки пациента и антропометрических данных [18]. Медиализационная тиропластика рекомендуется пациентам с неполным закрытием голосовой щели более 1,5 мм и сохранённой подвижностью черпаловидного хряща [36]. Особенностью операций этого типа является проведение вмешательства открытым доступом, что оставляет ГС интактными и снижает дополнительную травматизацию, в то же время работа в области окна в связи с рубцовыми изменениями тканей технически затруднена и существует риск разрыва фиброзной ткани, при необходимости дополнительно может быть выполнена подслизистая инъекция аутологичного жира или коллагена с целью попытки восстановления волн слизистой оболочки [23; 36].

Из эндоларингеальных подходов М. Ремаклем предложено формирование кармана на уровне голосовой складки с его заполнением в несколько слоёв хрящом перегородки носа, автор отмечает риск перфорации в подскладковое пространство при создании кармана оптимального размера [23].

Инъекционная медиализация. Согласно названию, медиализация ГС в данных методиках осуществляется за счет инъекции различных материалов в ГС для увеличения ее объема и изменения формы, что приводит к закрытию голосовой щели. Инъекция может быть выполнена с помощью прямой ларингоскопии или через коническую связку, щитовидный хрящ или щитоподъязычную мембрану, транскутанные методики не требуют общей анестезии, в исследовании Sulica L. и соавт. (2010) из 460-и медиализаций ГС – около половины операций были выполнены без наркоза, при этом частота осложнений была низкой и не различалась в зависимости от вида использованной анестезии [214]. Крайне важно точное введение материала в глубокие слои *m.vocalis*, при поверхностном введении в собственную пластинку существует большая вероятность смещения субстрата, грозящее обструкцией просвета

гортани или усугублением дисфонии [75]. Повысить эффективность и безопасность операции позволяет предварительный расчёт объёма импланта на основании размеров голосовой щели и антропометрических данных пациента (Старостина С. В., Мареев О. В., 2011); [27].

Было разработано большое количество синтетических материалов, применяемых в качестве субстрата для инъекционной медиализации, что свидетельствует об отсутствии идеального варианта. В литературе представлены данные об инъекционном применении тефлона, (Teflon®), гидроксилатапата кальция (Radiesse®), полидиметилсилоксана (Vox Implant®); [232; 37; 35]. Имплантация синтетических субстратов ассоциирована с риском развития гранулем, воспалительных реакций на имплант и его миграции, большинство описанных осложнений касается тефлона (Ellis J. C. et al., 1987; Rubin H. J., 1975; Dedo H. H., Carlsson B., 1982); [193; 65; 59]. В тоже время и для гидроксилатапата кальция описаны случаи ухудшения голоса при введении имплантата поверхностно – в собственную пластинку, за счёт увеличения её жёсткости, что требовало ревизионных вмешательств (Carroll T. L., Rosen C. A., 2011). Также отмечено, что использование гидроксилатапата кальция для компенсации недостаточности смыкания при рубцовых дефектах ГС, в отличие от односторонних парезов гортани, не является эффективным [47; 77].

Среди биоматериалов применяются субстраты на основе аутологичного жира, также описано использование фасции [187; 179]. На животных моделях продемонстрирована технология медиализации ГС с помощью инъекции измельчённого хряща ушной раковины [144]. Эти материалы имеют отличную биосовместимость, не вызывают тканевых реакций, но подвержены резорбции, что приводит к необходимости повторных операций, в меньшей степени подвержены резорбции фасции и хрящи [187; 144]. Исследование Hertegard S. (2004) и соавторов не показало значимых различий за двухлетний период наблюдения между гиалуроновой кислотой с перекрёстными молекулами и коллагеном (Zyderm®) после инъекционной медиализации ГС, выполненной 70-и пациентам [98].

Потеря вибрационных свойств ГС при рубцовых поражениях связана с замещением собственной пластинки фиброзной тканью и адгезией к ней эпителия, за счёт чего значительно повышается жесткость медиального края. Задача хирургического лечения при воздействии на это патофизиологическое звено состоит в попытке воссоздать «физиологический разрыв» между эпителием и голосовой мышцей и увеличить эластические свойства этого слоя [23]. Большинство описанных методов предполагает работу с эпителием и рубцовой тканью скарифицированной собственной пластинки, то есть поверхностно. Это отличает данные подходы от описанных выше медиализационных операций, проводящимися на глубоких слоях щито-черпаловидной мышцы, ближе к внутренней надхрящнице щитовидного хряща. Основная концепция заключается в «освобождении эпителия» с одновременным подэпитеальным удалением патологических тканей. Sataloff R. T., Courey M. S. и соавт. (1986) описано создание микролоскута слизистой оболочки голосовых складок, для формирования которого изначально предложено проводить относительно длинный разрез по верхнему краю ГС [198]. Однако выход работ Gray S. D. (1994), посвященных зоне базальной мембраны эпителия ГС, и случаи нарушения вибраций ГС после таких операций побудили к созданию лоскута на медиальной ножке непосредственно в области патологического образования, минимизирующего объём отсепаровки эпителия [87; 197]. При бороздах голосовых складок Bouchayer M. и Cornut G. (1992) предложили технику отсепаровки сохраняемого эпителиального лоскута, который после удаления рубцовой ткани собственной пластинки укладывается обратно и фиксируется фибриновым клеем, под лоскут дополнительно вводится гидрокортизон: такой подход в сочетании с длительными фонопедическими упражнениями обеспечил улучшение голоса в большинстве случаев [39]. Pontes P. и соавторы (1993) в качестве метода лечения борозд ГС наносили множественные поперечные насечки на слизистую оболочку – для уменьшения силы продольного натяжения собственной пластинки [177]. Основное ограничение таких операций связано с риском усугубления скарификации вследствие непредсказуемости процессов

реадгезии эпителия [75]. Описано множество комбинаций данных техник с подэпителиальной имплантацией различных материалов в собственную пластинку для улучшения ее реологических свойств. В экспериментальных и клинических исследованиях для этой цели применялись аутологичный жир, материалы на основе гиалуроновой кислоты, желатиновые губки [36; 67; 196; 237]. Tsunoda К. и соавторы (2005) разработали методику имплантации аутофасции в собственную пластинку пациентам с бороздами ГС: операция позволила добиться стойкого увеличения амплитуды фонационных волн слизистой и полного закрытия голосовой щели [227]. Описана малоинвазивная операция по созданию субэпителиальных туннелей, в которые иглой вводится аутологичный жир (Neuenschwander M. C. et al., 2001); [167].

Предложены варианты пластики ГС трансплантатами слизистой оболочки щеки. Операция может выполняться как эндоларингеально, так и открытым способом через ларингофиссуру; толщина выделяемого трансплантата слизистой оболочки подбирается в зависимости от глубины дефекта, образующегося после удаления рубца [168; 72; 73]. Одним из перспективных методов является воздействие на рубцы ГС лучом ангиолитических лазеров таких как PDL (импульсный цветной лазер) и КТР (калий-титанил-фосфатный лазер), в исследовании Mortensen M. M. и соавторов у 10 из 11 пациентов с рубцами ГС после лечения с применением PDL было выявлено субъективное и объективное улучшение голосовых характеристик [164; 180].

При врождённых мембранах голосового отдела гортани с развитием стеноза, спайках передней комиссуры (рубцы IV типа по М. Ремаклю и III типа по классификации Европейского общества ларингологов, 2019) используется пластика с помощью замещающих лоскутов на ножке, выкраивающихся с противоположной ГС, установка эндоларингеальных стентов (Цветков Э. А., Павлов П. В., Попов А. В., 2000; Павлов П. В. 2010; Свистушкин В. М., Старостина С. В., Волкова К. Б., 2015), рёберных ауто трансплантатов (Захарова М. Л., Павлов П. В., 2018), расширяющих просвет гортани и предотвращающих контакт раневых поверхностей с обеих сторон до завершения эпителизации [23;

17; 21; 19; 16]. Также предложен оригинальный вариант эндопротезирования голосового отдела гортани с использованием стента на основе оксицеллюзы со встроенным баллоном и каналами, позволяющими увеличивать размер стента и инстиллировать лекарственные препараты (Крюков А. И., Кунельская Н. Л., Кирасирова Е. А., и др., 2017); [20]. В настоящее время при лечении стенозов гортани, в том числе для выкраивания лоскутов успешно применяется СО₂ лазер, что показано в работах Нажмудинова И. И., Вавина В. В., Гаращенко Т. И. и соавторов (2019, 2020); [15; 1; 22; 3; 2].

Несмотря на разнообразие методик, их результат в реабилитации голосовой функции при рубцах голосового отдела гортани часто непредсказуем и существенно ограничен. При использовании последних уменьшается потеря воздуха и усталость при фонации, в определенной степени улучшаются вязко-эластические характеристики голосовых складок. Однако на данный момент не существует метода, способного восстановить уникальную структуру слоёв собственной пластинки голосовой складки, обеспечивающего необходимые для вибрации биомеханические свойства, его поиски непрерывно продолжаются [75; 83; 152]. Технологии, относящиеся к регенеративной медицине, важную часть которых составляет клеточная терапия открывают для клиницистов новые перспективы в разработке методов лечения и профилактики рубцовых повреждений голосовых складок и в последнее время интерес к её достижениям в мировой оториноларингологии значительно возрос [111; 152; 33; 135].

1.7. Регенеративная медицина: основные понятия и определения

Для активного развития методов регенеративной медицины, которые с середины 1980-х годов стали обширным полем для научной и практической деятельности существовал ряд предпосылок [45; 228]. В первую очередь – это развитие клеточной биологии и трудноразрешимые проблемы трансплантологии и реконструктивной хирургии: нехватка донорских органов, необходимость в

пожизненной иммуносупрессивной терапии у реципиентов, недостаток аутологичных тканей и их изменения при проведении пластических хирургических вмешательств, невозможность полной биологической интеграции искусственных протезов [195]. Термин «тканевая инженерия», впервые был озвучен профессором Y. C. Fung в 1987 г. (Университет Калифорнии, Сан-Диего, США), спустя около 10 лет время появилось такое понятие как «регенеративная медицина» [66]. Соотношение этих терминов по-прежнему вызывает немало споров в научном сообществе. Ряд учёных считает, что тканевая инженерия является частью регенеративной медицины, другие видят эти понятия связанными с разными областями, для третьей группы регенеративная медицина ассоциирована с использованием клеточной терапии.

Исходя из общепринятых стандартов, в настоящее время регенеративная медицина представляет собой область медицины, в которой восстановление поврежденных органов и тканей осуществляется под контролем искусственной регенерации, за счёт целенаправленной, контролируемой активации пролиферации и дифференцировки прогениторных клеток, нормализации синтеза компонентов межклеточного матрикса и ограничения интенсивности воспалительного процесса [231; 120; 182; 195]. Стратегии регенерации при этом различаются в зависимости от вида терапевтических агентов, имплантируемых в область повреждения и применимых к ним технологий, их условно делят на 3 группы: 1) использование биомедицинских продуктов на основе клеток из различных источников (клеточная терапия); 2) использование нативных и синтезируемых матриц, выполняющих функцию каркаса, несущего клетки (скаффолды); 3) использование сигнальных молекул (факторов роста), а также различные комбинации данных технологий, в том числе применение полноценных тканеинженерных конструкторов (Рисунок 2); [234; 69; 145; 63; 116; 136; 142; 195].



Рисунок - 2. Стратегии регенеративной медицины

Клеточная терапия

Клетки и синтезируемый ими экстрацеллюлярный матрикс являются основой всех тканей; в ряде случаев, при небольших дефектах, замещение по принципу реституции, то есть полного морфологического восстановления может происходить за счёт собственных клеточных ресурсов. Однако при обширных повреждениях и/или недостаточном количестве прогениторных клеток в области дефекта, своеобразным адъювантом, усиливающим регенерацию, может служить внешний источник, то есть клеточные продукты, содержащие живые накопленные клетки, которые имплантируются в повреждённую ткань. Во многих тканях организма обнаружены собственные прогениторные клетки, которые теоретически могут быть выделены и накоплены, однако, на данный момент для целей регенеративной медицины в фундаментальных, доклинических и клинических исследованиях наиболее часто используются клетки следующих категорий.

I. Мезенхимные стромальные клетки (МСК) – мультипотентные клетки, источником которых является костный мозг, жировая и другие ткани, которые могут быть выделены и расширены в культуре, сохраняя при этом свою способность *in vitro* дифференцироваться в различные мезодермальные клеточные фенотипы, у которых экспрессируются антигены CD105, CD73, CD90 и отсутствует экспрессия CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19, человеческого лейкоцитарного антигена II класса, данные условия для мезенхимных стромальных клеток определены в минимальных критериях Dominici M. (2006); [62; 149]. Следует отметить, что далеко не все мезенхимные стромальные клетки являются мезенхимными стволовыми клетками: длительно живущими, самообновляющимися клетками, способными дифференцироваться в специфические, множественные типы клеток *in vivo*. Существенная разница между этими терминами долгое время не принималась во внимание во многих исследованиях, этому также способствовало использование акронима МСК, которым обозначаются клетки обоих типов [122]. При имплантации в повреждённую область регенераторный эффект МСК реализуется через секрецию широкого спектра противовоспалительных медиаторов, цитокинов и трофических факторов, положительные эффекты от клеточной терапии данного типа клеток не должны ассоциироваться с дифференцировкой имплантированных клеток в клетки повреждённых тканей [231; 44]. Один из основоположников регенеративной медицины, Caplan A. I., популяризовавший в 1990-х годах термин МСК, как «стволовые клетки», в 2017 г. предложил использовать термин «медицинские сигнальные клетки» (Medicinal Signaling Cells), когда речь идёт о клеточной терапии с помощью мезенхимных стромальных клеток, тем самым подчёркивая значение паракринных эффектов [44]. В отношении данных клеток накоплен наибольший опыт клинических исследований при широком спектре заболеваний [212]. В настоящее время зарегистрировано более 70 клинических исследований по терапии острого респираторного дистресс синдрома при COVID-19 с помощью МСК [81].

II. Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) – плюрипотентные клетки с самым высоким потенциалом пролиферации и дифференцировки. Однако, существует ряд факторов, ограничивающих ближайшие перспективы их широкого использования в клинической практике: 1) этические конфликты при получении из эмбрионального материала; 2) риск формирования тератом; 3) трудности культивирования [195; 103]. В какой-то степени к этой группе также можно отнести амниотические стволовые клетки, получаемые из амниотической жидкости или плаценты, эти клетки лишены проблем, ассоциируемых с ЭСК, в настоящее время ведётся большое количество исследований по оценке возможностей клеточной терапии с использованием данного источника [195; 103].

III. Индуцированные стволовые клетки (iPS) – плюрипотентные клетки с высоким потенциалом дифференцировки, которые получают путём генетического перепрограммирования с помощью трансдукции ретро и лентивирусными векторами, несущими транскрипционные факторы Oct3/4, Sox2, c-Myc, и Klf4. Для этих клеток также не исключены и неполностью управляемы потенциальные онкогенные риски, их исследования также активно продолжаются [195; 103].

В зависимости от типа клеток по отношению к реципиенту, клеточный продукт может быть охарактеризован как аутологичный (из клеток организма реципиента), аллогенный – из клеток организмов того же вида, ксеногенный – из клеток организмов других видов.

Использование скаффолдов

В ткани клетки находятся в окружении внеклеточного матрикса, который является их естественной средой, поэтому имплантация клеток в составе скаффолда (клеточного носителя), который создаёт благоприятное микроокружение клеток, стало ещё одной стратегией регенеративной медицины, такой подход увеличивает продолжительность жизни клеток, обеспечивает их миграцию, облегчает ангиогенез и тем самым усиливает регенераторные эффекты. По описанию Ito J. в книге *Regenerative Medicine in Otolaryngology* (2015) скаффолд должен обладать хорошей гистосовместимостью, не вызывать

иммунологическое отторжение, иметь пористую структуру для облегчения проникновения клеток и обеспечения диффузии нутриентов и кислорода, поддерживать форму в течение определенного периода времени и обладать способностью к биодegradации после окончания регенеративных процессов [182]. Современные скаффолды изготавливаются на основе натуральных материалов, синтетических биополимеров и децеллюляризованного внеклеточного матрикса. Наиболее часто применяются гиалуроновая кислота, коллаген, фибрин, хитозан, матриксы на основе подслизистого слоя тонкого кишечника, полигликолевой кислоты, полимолочной кислоты [195].

Факторы регуляции

Рост клеток и их дифференцировка в процессе регенерации управляются факторами регуляции. Они обладают множеством функций, включая потенциацию и ингибирование роста клеток, их деления и перехода в апоптоз, факторы регуляции не работают по одному, образуя целые группы, они могут действовать синергично, параллельно, либо как антагонисты. Существует большое количество видов таких факторов, например, факторы, воздействующие на клетки гемопоэтического ряда - цитокины, другая большая группа – факторы роста [182; 186; 156].

1.8. Возможности методов регенеративной медицины в лечении рубцовых повреждений голосового отдела гортани

В литературе представлено большое количество исследований, посвящённых восстановлению голосовых складок методами регенеративной медицины. При поиске в базах данных PubMed, Ovid MEDLINE, и Embase, eLIBRARY.ru, сайте <https://clinicaltrials.gov/>, только по комбинациям ключевых терминов «vocal fold scars»; «vocal fold atrophy»; «laryngeal scar stenosis» «stem cells»; «regenerative medicine»; «tissue engineering» и их русскоязычным переводам

отображается более 20 работ. Большинство исследований являются экспериментальными, клинические работы остаются единичными.

1.8.1. Общая характеристика экспериментальных исследований

Выбор лабораторного животного и экспериментальная модель повреждений голосовых складок являются одними из ключевых точек дизайна доклинических исследований, при этом в порядке убывания частоты используются следующие животные: лабораторные кролики, крысы и собаки [130; 102; 143; 236; 215]. Основой экспериментальных моделей является травма голосовой складки с последующей имплантацией продукта, оказывающего регенеративный эффект [152; 234]. В большинстве работ дефект ГС создаётся с помощью холодного микроинструментария (щипцы и/или ножницы), в некоторых исследованиях также используется коагулятор, либо лазер, травма слизистой оболочки ГС наносится в области передней и средней трети складки с затрагиванием поверхностных слоев щиточерпаловидной мышцы, однако в ряде исследований, например, в работах Shiba T. L. и соавт. (2016), Goel A. N. и соавт. (2018) слизистая оболочка удаляется на всем протяжении [152; 234; 206; 80].

Введение имплантата в жидкой форме осуществляется путем инъекции, при этом, как правило, используется эндоларингеальный доступ, редко – наружный (Kanemaru S. et al., 2005; De Bonnecaze et al., 2016); [130; 58]. В случае использования плотных скаффолдов или тканеинженерных конструктов, осуществляется их имплантация в сформированный субэпителиальный карман ГС, также эндоларингеально (Ohno S. et al., 2011; Hiwatashi N., 2015), либо фиксация в область резецированной ГС после срединной тиротомии [206; 80; 169; 119]. В значительно преобладающем числе исследований используется введение продукта в острую первичную рану голосовой складки, непосредственно сразу после травмы, в некоторых работах имплантация проводится в ранние сроки – в

течении 1-й недели (Xu W. et al., 2011; Hu R. et al., 2014), в ряде экспериментов - через 1-2 месяца (Johnson B. et al., 2010; Ohno S. et al., 2011; Svensson B. et al., 2011; Hiwatashi N. et al., 2014, 2015; Bartlett R. S. et al., 2016). Редко встречаются и другие сроки: через 18 месяцев – в исследовании Valerie A. и соавт. (2016), а также за 4 дня до травмы – в работах Kanemaru S. и соавт. (2003), Lee B. J. и соавт. (2006); [143; 236; 215; 169; 119; 123; 129; 118; 34; 230; 131].

В обзорном исследовании Mattei A. и соавт. (2017) отмечено, что проведение экспериментов в два этапа, то есть отсроченное введение импланта, больше соответствует условиям клинической практики, так как лечение рубцов не следует проводить ранее, чем через 6 месяцев [152]. В данных работах введение клеточного продукта проводилось не ранее, чем через 2 месяца после создания дефекта, то есть уже в фазу ремоделирования рубцовой ткани. Лишь в одном исследовании проводилось предварительное иссечение рубцовой ткани (Svensson B. et al., 2011), в остальных работах – имплантация осуществлялась непосредственно в область скарификации ГС и при этом вне зависимости от того, используется ли клеточный носитель, который может влиять на объём и вязкоупругие характеристики тканей ГС, например, на основе гиалуроновой кислоты, Extracel (Glycosan BioSystems, Inc., Salt Lake City, UT) в работе Johnson B. и соавт. (2010) или ателоколлагена в исследовании Hiwatashi N. и соавт. (2015), либо используются клетки без скаффолда, то есть осуществляется инъекция клеточной суспензии в буферном растворе (Valerie A. et al., 2016, Hiwatashi N. et al., 2014); [215; 119; 129; 118; 230]. Данные особенности важно учитывать, так как в случаях использования клеток без специализированного носителя эффекты терапии могут быть объяснены только её влиянием на ремоделирование межклеточного матрикса в уже относительно зрелой рубцовой ткани, что имеет большое значение при экстраполяции на условие клинических исследований, где потенциальные риски усугубления фиброза при хирургической травме должны сводиться к минимуму.

В литературе представлены исследования по регенерации ГС со всеми типами клеточных продуктов с позиции источника клеток по отношению к

реципиенту – лабораторному животному. В большом числе работ используется ксеногенные продукты стромальных и стволовых клеток человека: МСК костного мозга (Hertegard S. et al., 2006, 2019; Svensson B. et al., 2011; Bartlett R. S. и et al., 2016), жировые МСК (Kim Y. M. et al., 2014) эмбриональные стволовые клетки (Cedervall J. et al., 2007; Svensson B. et al., 2015), индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (Imaizumi M. et al., 2017), такой подход согласуется с позицией Европейского Медицинского Агентства (ЕМА), обозначенном в аналитическом документе с требованиями к качеству доклинических и клинических испытаний по медицинским продуктам на основе стволовых клеток (ЕМА/САТ/571134/2009), где указано, что с целью доказательства концепции наиболее подходящим вариантом при проведении доклинических исследований на животных моделях является использование клеток человека, так как именно этот продукт потенциально будет применяться в клинической практике [215; 34; 102; 99; 217; 133; 125; 181; 49].

В то же время использование ксеногенного клеточного продукта у животных не иммунодефицитных линий может потенциально влиять на конечный результат терапии, тем не менее иммуносупрессивная терапия (такролимус) использовалась только в одной серии экспериментальных работ (Svensson B., Hertegard S., Cedervall J. et al., 2006; 2007; 2010; 2011), этими же авторами в монографии («Restoration of scarred vocal folds with stem cell implantation – analyses in a xenograft model», 2011) показано, что использование такролимуса снижает антифибротические эффекты МСК человека при их имплантации в повреждённые ГС кролика [102; 215; 49; 215; 216].

Kim Y. M. и соавт. (2014) в своей работе указывают на отсутствие признаков воспалительной реакции при имплантации жировых МСК человека в геле гиалуруновой кислоты/альгината в ГС кролика и объясняют данный феномен токсическими иммуномодулирующими свойствами МСК, ссылаясь на исследование Ryan J. M. и соавт. (2005); [133; 194].

Помимо клеток человека в ряде работ используются МСК костного мозга зелёных трансгенных мышей, клетки которых экспрессируют флюоресцирующий

белок, что делает возможным определение клеточного материала в препаратах на конфокальном микроскопе, тем не менее такие клетки являются ксеногенным продуктом по отношению к другим видам, в связи с чем в работах Kanemaru S. и соавт. (2005), Johnson B. и соавт. (2010) использовались иммунодефицитные линии крыс и сопутствующая иммуносупрессивная терапия не проводилась [130; 129].

Из других типов клеточных продуктов больше всего исследований проведено в отношении аутологичных жировых МСК (Lee B. J. et al., 2006; Xu W. и et al., 2011; Valerie A. et al., 2016; De Bonnecaze G. et al., 2016), в единичных работах используются аутологичные МСК костного мозга (Ohno S. et al., 2011), дифференцированные фибробластоподобные клетки из жировых МСК (Hu R. et al., 2014), аутологичные МСК из слизистой оболочки надгортанника (Peng H. et al., 2013); [143; 230; 236; 169; 58; 123; 175].

Следует отметить, что количество имплантируемых клеток также сильно различается в исследованиях и находится в пределах от 10 тысяч (Valerie A. et al., 2016) до 20 миллионов (Choi J. W., 2014). Наиболее часто встречаемая доза от 100 тысяч до 1 миллиона, только в исследовании Bartlett R. S. и соавт. (2016) проводилось сравнение двух доз МСК костного мозга человека 150 и 300 тысяч клеток [34; 230; 56]. Оценка результатов в большинстве работ проводилась через 1–3 месяца после имплантации [143; 236; 215; 118; 34; 230; 131].

1.8.2. Механизмы антифибротических эффектов клеточной терапии повреждений голосовых складок

Выживаемость клеток после имплантации в ГС через 1–6 месяцев, в целом, является низкой. В исследовании Svensson B. и соавт. (2006) через 4 недели после введения в область острой травмы ГС кролика выживаемость МСК костного мозга человека составила 0,18%. В работе Hertegård S. и соавт. (2019) через 25 дней человеческие костномозговые МСК в ГС обнаружены не были – после

введения как в суспензии, так и в геле гиалуроновой кислоты в качестве скаффолда [102; 99]. Также в работе Hiwatashi N. и соавт. (2014) МСК жировой ткани и МСК костного мозга через 1 месяц после введения в ГС не были выявлены ни в одном из срезов препаратов; при использовании коллагенового скаффолда в работе этих же авторов (2015) клетки обнаруживались через 1 месяц, но отсутствовали через 6 месяцев [119; 118]. В тоже время в исследовании Choi J. W. (2014) показано, что МСК костного мозга обнаруживаются через 8 недель после имплантации в остро травмированную ГС, однако следует отметить, что количество вводимых клеток в данной работе составляло 20 миллионов, что в несколько раз выше, чем в указанных выше [56]. Peng H. и соавт. (2013) наблюдали постепенное уменьшение количества аутологических МСК из слизистой оболочки надгортанника после имплантации их комплекса с коллагеновым скаффолдом в модельный дефект ГС, при этом авторы отметили признаки дифференцировки клеток в фибробласты и миофибробласты [175]. В работах Svensson B. и соавт. (2007, 2015), посвященных эмбриональным стволовым клеткам показано, что через 1 месяц после имплантации в остро травмированную ГС кролика 10 тысяч клеток выживаемость составляла 5,1%, также наблюдалась их дифференцировка в эпителиальную, мышечную и хрящевую ткань, однако через 3 месяца – тканевые регенераты, как и выжившие клетки обнаружены не были, что, однако, не повлияло на значимое улучшение морфологических и механических характеристик ГС, по сравнению с ГС без лечения [217; 49].

Индукцированные плюрипотентные клетки человека в исследовании Imaizumi M. и соавт. (2017) обнаруживались как в повреждённых, так и в интактных ГС в течение двух недель после их имплантации в комплексе с гиалуроновой кислотой и добавлением эпидермального фактора роста, в дальнейшие сроки выживаемость данного типа клеток не изучалась [125]. В исследовании Bartlett R. S. и соавт. (2016) сохранение МСК костного мозга человека, имплантированных в травмированные ГС кролика, как в электролитном растворе, так и в комплексе с гелем на основе гиалуроновой кислоты, было

крайне низким, что было оценено по данным гистологического исследования и по уровню экспрессии β -актина человека [34].

Имплантированные в повреждённые ГС клетки модулируют течение воспалительной реакции и профиль синтеза компонентов внеклеточного матрикса за счёт паракринных эффектов. В исследовании Hiwatashi N. и соавт. (2017) показано, что среда, в которой культивировались МСК костного мозга человека, после удаления клеток оказывает ингибирующее влияние на профибротические эффекты фибробластов голосовых складок, которые стимулировались TGF- β 1, что имитировало условия травмы ГС; данное влияние реализуется через изменение активности TGF- β ассоциированных клеточных сигналов (в т.ч. Smad-сигнальных путей); [120]. Также в работе Kim C. S. и соавт. (2019) антифибротические эффекты среды, в которой МСК нижних носовых раковин человека культивировались в условиях гипоксии, при её инъекции в травмированную ГС крыс, были аналогичными с таковыми после имплантации эквивалентного количества клеточного продукта аналогичных МСК. Они заключались в увеличении экспрессии гиалуронсинтетаз 1 и 2 и уменьшении экспрессии проколлагена III. Авторы отметили, что результаты гистологического исследования препаратов ГС после терапии в обеих группах сопоставимы по содержанию гиалуроновой кислоты, однако в группе ГС, инъецированных средой, количество коллагена в рубцах было меньше; в обеих группах фиброзные изменения выражены значительно меньше, чем в контрольных [132].

В целом ряде работ с помощью ПЦР анализируется экспрессия генов белков межклеточного матрикса и связанных с ними ферментов в препаратах ГС с имплантированным клеточным продуктом, наиболее часто исследуют различные типы гиалуронсинтетаз и гиалуронидаз, проколлагены I и III типов, фибронектин и матриксные металлопротеиназы 1 и 8 [129; 134; 163]. Вторым направлением использования ПЦР является определение активности экспрессии факторов роста и других медиаторов, модулирующих ход репарационных процессов в голосовых складках. Так, в исследовании Morisaki T. (2017) было показано, что в ГС после

имплантации аллогенных жировых МСК сразу после травмы экспрессия проколлагена I и III, матриксной металлопротеиназы 1 и 8 на 3-й и 14-й дни была ниже по сравнению с ГС без лечения, также в этой группе была значимо выше экспрессия фактора роста фибробластов (Fgf), фактора роста гепатоцитов (HGF) по сравнению с контролем на 14-й день [163]. В ГС через 1 месяц после введения костномозговых МСК в область механического повреждения наблюдалось значительное ослабление экспрессии фибронектина и трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (Kim Y. M., 2013); [134].

В работе Bartlett R.S. и соавт. (2016), в которой лечение ГС кроликов с помощью человеческих МСК обеспечивало раннюю нормализацию экспрессии генов проколлагена, TGF $\beta 1$, интерлейкина- 1β , интерлейкина- 17β и фактора некроза опухоли по сравнению с контрольной группой без лечения [34].

1.8.3. Методы оценки результатов клеточной терапии в восстановлении морфологических и механических свойств голосовых складок

Основополагающим объектом анализа является морфология голосовых складок. Морфологическое исследование в экспериментальном поле регенеративной медицины гортани в целом совпадает с подходами для других областей, хотя безусловно имеет свои особенности. По результатам анализа публикаций выделяются три направления: классическая гистология с использованием окрасок, учитывающих специфику межклеточного матрикса слизистой оболочки голосовых складок, иммуногистохимическая визуализация компонентов, которые недоступны окраске стандартными способами и различные способы получения и сравнения количественной информации. В большинстве исследований применяется окраска гематоксилин-эозином, трихромом по Массону и пикросириусом для выявления коллагена, орсеином и по Ван-Гизону на эластик, а также альциановым синим для идентификации глюкозамингликанов [236; 169; 34; 133; 125; 56; 163]. Объектами иммуногистохимического исследования в первую очередь являются коллаген I типа

и фибронектин; в работе Ну R. и соавторов (2014) также исследовались декорин, эластин, гиалуроновая кислота [58; 123; 217; 133; 175]. Отдельно стоит рассмотреть подходы к объективизации исследований за счет морфометрии. Наиболее часто используется сравнение относительного количества компонентов межклеточного матрикса. Для этого производится измерение площади оцифрованного изображения гистологического среза, имеющей определенный цвет после соответствующего окрашивания. Данный подход в экспериментах на гортани представляется наглядным и во многих работах показывает уверенные статистические различия при оценке результатов восстановления голосовых складок. В первую очередь так сравнивалось содержание общего коллагена, глюкозамингликанов и эластических волокон [34; 236; 169; 134; 175]. Аналогичным образом с применением иммуногистохимии – коллагена I типа и фибронектина [217; 133; 58]. Также достаточно часто применяется полуколичественная балльная оценка морфологических признаков с использованием субъективных шкал. При этом оценивается как общий уровень фиброзных изменений в тканях по четырех и трех балльным шкалам, например в работах Bengt Svensson и соавт.(2015) и Stellan Hertegård и соавт. (2019), так и количества коллагена, эластина, гиалуроновой кислоты в исследовании Valerie A. и соавт. (2016); [230; 99; 217]. Еще одним популярным методом является измерение толщины собственной пластинки слизистой оболочки голосовых складок [169; 58; 118; 230; 217].

Пул применяемых исследований для анализа механических свойств условно можно разделить исходя из оцениваемых характеристик – это способы изучения механики тканей и способы изучения вибрационных свойств голосовых складок. Надо отметить, что обе группы в экспериментах в области регенеративной медицины голосовых складок представлены достаточно скудно. Доминирующим по частоте использования методом первой группы является параллельная реометрия, позволяющая оценить такие параметры, как динамическая вязкость и модуль упругого сдвига [102; 217; 133; 134]. Несмотря на то, что параллельная реометрия уверенно показывает статистические различия в данных параметрах между

экспериментальными группами, она предполагают работу с макрообразцом голосовой складки, исключая при этом прецизионный анализ характеристик собственной пластинки слизистой оболочки голосовых складок и структур белков межклеточного матрикса. Анализ вибрационных свойств голосовых складок проводился в нескольких исследованиях [206; 169; 133; 56]. Во всех - в качестве экспериментального метода использовалась высокочастотная съемка вибрации голосовых складок макропрепарата гортани с последующей оценкой амплитуды волны слизистой оболочки. Вибрационная активность голосовых складок при этом индуцировалась с помощью пропускания потока воздуха через трахею. Однако наряду с амплитудой колебаний голосовых складок, крайне важным параметром является и частотный анализ вибрации. В клинической практике на данный момент в качестве метода объективизации фонации широко используется акустический анализ голоса, однако для лабораторных животных он не применим [221; 89]. В ряде работ показаны перспективы использования лазерной виброметрии для оценки колебаний голосовых складок, однако такая оценка в экспериментах по восстановлению ГС методами регенеративной медицины по данным литературы не проводилась [50; 148].

1.8.4. Результаты клеточной терапии в восстановлении морфологических и механических свойств голосовых складок в экспериментах.

Оценка ларингоскопической картины в динамике проводилась в работе Lee В. J. и соавт. (2006), в качестве лабораторных животных использовались собаки, травма ГС наносилась через 4 дня после имплантации 1–3 млн МСК в правую ГС и ателоколлагена в левую ГС (контроль), на 2-й, 4-й, 8-й и 24-й неделях изменения в виде гранулём, неровности поверхности ГС, атрофии преобладали на левых ГС [143]. В работах Svensson В., Hertegard S., Cedervall J. и соавт. (2006, 2011) с применением МСК костного мозга человека показано, что через 1 и 3

месяца после имплантации около 100 тысяч клеток кроликам в острую первичную рану ГС, а также во вторичное повреждение ГС после иссечения предварительно созданного рубца, в группах голосовых складок после лечения происходит уменьшение общего уровня фиброза, толщины рубцовой ткани и содержания коллагена I типа. Также в этих группах наблюдалось восстановление механических параметров (динамической вязкости и модуля упругого сдвига), причём восстановление механических свойств более выражено через 3 месяца и к этому сроку не имело значимых отличий от интактных образцов [102; 215]. Подобные результаты были получены этой же группой авторов и при использовании эмбриональных стволовых клеток человека в экспериментах со схожим дизайном [217; 49].

De Vonnecaze и соавт. (2016) в своей работе – после имплантации 2 млн аутологичных МСК жировой ткани в остро травмированную ГС кроликов – через шесть недель демонстрировали значительно меньшее воспаление, чем в контрольных ГС без имплантации, кроме того, гипертрофия собственной пластинки и фиброз были значительно снижены после введения клеток. Восстановление вязко-эластических параметров в группе с введением МСК также наблюдалось, однако было менее выражено и не достигало статистической значимости по сравнению с контролем [58]. Исследование Valerie A. и соавт. (2016) показало, что после имплантации 10 тысяч аутологичных МСК из жировой ткани в зрелую рубцовую ткань ГС, в рубцах ГС после клеточной терапии толщина собственной пластинки была значительно уменьшена в группе по сравнению с рубцами контрольной группы без лечения; депозиты коллагена, гиалуроновой кислоты, уровень эластина и организация эластических волокон также имели тенденцию к возвращению к норме [230].

Интересные данные представлены в работе Hu R. и соавторов (2014), в ней проводилось сравнительное исследование результатов имплантации аутологичных клеточных продуктов жировых МСК, фибробластов, выделенных из ГС и фибробластоподобных клеток, дифференцированных из МСК жировой ткани в количестве 300–400 тысяч в ГС собак через 7 дней после травмы.

Результаты показали, что после имплантации поверхность реципиентных голосовых складок стала почти гладкой в группах жировых МСК и фибробластоподобных клеток, но оставалась вогнутой и более жёсткой в группе фибробластов; количество эластина значительно возросло и поддерживалось на высоком уровне в группе фибробластоподобных клеток. Количество коллагена через 6 месяцев в группах МСК и фибробластоподобных клеток не отличалось от интактных ГС, тогда как в группе фибробластов его было больше, чем в других группах и расположение было более неупорядоченным; количество гиалуроновой кислоты, декорина и фибронектина было одинаковым между тремя имплантированными группами [123].

Использование различных клеточных носителей может улучшать конечный результат восстановления повреждений ГС за счёт изменения свойств клеток, уменьшения их потери при имплантации и увеличения продолжительности их жизни. В *in vitro* исследовании Park H. и соавт. (2010) проводилась оценка влияния различных гидрогелей, применяемых при хирургических вмешательствах на ГС на дифференцировку МСК жировой ткани в фибробласты и синтез белков собственной пластинки. По данным работы в культурах клеток с фибрином и с комплексами фибрина с ГК и с коллагеном было обнаружено в два раза большее количество общей ДНК, чем в культурах с коллагеном и ГК по отдельности; экспрессия эластина была значительно выше в клетках, выращенных в гелях на основе фибрина, чем в других группах [171].

В исследовании Nahn M. S. (2006) показано, что ко-гель коллагена с альгинатом способны поддерживать жизнеспособность инкапсулированных фибробластов голосовых складок, стимулировать формирование веретенообразной морфологии клеток и релевантный синтез компонентов ВКМ голосовой складки и не приводить к выраженному уплотнению матрицы в течение 42 дней по сравнению с ко-гелем коллагена и ГК [90]. В обзорном исследовании Li L. и соавт. (2016) представлен подробный анализ материалов, имеющих перспективу применения для восстановления ГС с помощью

тканеинженерных подходов; описан не только широкий выбор химических основ, но и современные возможности их химической и физической модификации для создания подходящей для имплантации в ГС 3-мерной архитектуры [145].

В ряде работ показано, что полиэтиленгликоль (ПЭГ)-фибриновый гель в соотношении 5 : 1 обеспечивает наиболее благоприятное микроокружение для распространения, роста и пролиферации фибробластов и ангиогенеза за счёт гомогенно распределенных гибких фибрилл с меньшим пространством между ними, по сравнению с нативным фибрином [82; 209; 208].

В *in vivo* исследовании Xu W. и соавт. (2011) имплантация жировых МСК в комплексе со скаффолдами на основе гиалуроновой кислоты и коллагена через 3-5 дней после острой травмы ГС способствовала более полноценному восстановлению морфологических характеристик ГС, которые оценивались на протяжении 12 месяцев, по сравнению с группами МСК без клеточного носителя и скаффолдов без клеток. Относительное содержание коллагена, гиалуроновой кислоты и фибронектина в группе МСК-скаффолдов не имело статистически значимых различий с интактными ГС через 12 месяцев. Следует отметить, что в данной работе комплексы МСК с гиалуроновой кислотой и коллагеном вводились разным животным, однако ГС после лечения МСК с обоими типами скаффолдов оценивались как одна группа, то есть сравнение преимуществ носителей на основе ГК и коллагена не проводилось [236].

Kim Y. M. и соавт. (2013) в исследовании с человеческими МСК жировой ткани показали, что имплантация 1млн. клеток в комплексе с гелем гиалуроновой кислоты – альгината в острую рану ГС оказывает более выраженные регенераторные эффекты, чем имплантация МСК в солевом растворе. Через 1 месяц уменьшилось избыточное отложение коллагена I типа, большее количество клеток синтезировало фактор роста гепатоцитов, в группе МСК-гель и МСК значимо снизились динамическая вязкость и модуль упругого сдвига по сравнению с рубцами без имплантации по данным реологического исследования;

в группе МСК-гель спустя 1 месяц оставались жизнеспособные клетки, некоторые из которых дифференцировались в фибробласты [133].

В исследовании Choi J. W. и соавт. (2014) в травмированные ГС кроликов имплантировались 20 млн костномозговых МСК, комплекс эквивалентного количества клеток и подслизистой основы тонкого кишечника (SIS), либо SIS, оценка результатов проводилась через 8 недель. Гистологический анализ показал повышенное накопление гиалуроновой кислоты, уменьшение депозитов коллагена и восстановление архитектоники коллагеновых волокон и улучшение амплитуды волны слизистой оболочки в группе МСК-SIS, по сравнению с остальными группами лечения. Кроме того, на протяжении периода наблюдения в группе МСК-SIS количество имплантированных клеток снижалось медленнее и через 8 недель было в 3,91 раза выше, по сравнению с суспензией в буферном растворе [56].

По данным Hertegård S. и соавт. (2019) имплантация костномозговых МСК человека в геле ГК в повреждение ГС кроликов уменьшает утечку клеток после введения, однако не способствует их более длительному выживанию в тканях: гель рассасывается к 25-му дню, клетки на этом сроке также не обнаруживаются, также как и при имплантации в растворе; по данным работы – клеточная терапия уменьшала воспаление в тканях и экспрессию коллагена I типа [99].

Однако в исследовании Bartlett R. S. и соавт. (2016) в эксперименте *in vivo* персистирующее воспаление было выявлено во всех группах, которым вводился гидрогель на основе ГК, лечение острого повреждения ГС только с МСК костного мозга оказалось наиболее эффективным и безопасным, обеспечивая раннее восстановление вязкоупругих свойств ГС и экспрессию генов, согласующуюся с желательным ремоделированием внеклеточного матрикса [34]. В работах Shiba T. L., Goel A. N. и соавт. (2016; 2018) показана успешная имплантация тканеинженерного комплекса на основе МСК жировой ткани и фибрина в рану ГС кроликов непосредственно сразу после выполнения хордэктомии по II типу (согласно классификации Европейского ларингологического общества): через 4 недели

восстановленные ГС были способны поддерживать вибрацию, гистологически фиброзные и воспалительные изменения были незначительны [206; 80].

Таким образом, в целом ряде работ показана эффективность клеток из различных источников и их комплексов со скаффолдами в уменьшении воспаления, размеров рубца ГС, а также восстановлении компонентов межклеточного матрикса при острых травмах и рубцовых дефектах ГС. Однако сравнительный анализ изученных данных осложняется чрезвычайно широким спектром дизайнов исследований; остаются открытыми многие вопросы механизмов регенерации ГС, подбора эффективных скаффолдов и источников клеток.

1.8.5. Трансляция результатов экспериментальных работ в клиническую практику

На данный момент на основании некоторых экспериментальных исследований проведены первые клинические. В литературе представлены результаты нескольких клинических исследований, в которых использовались факторы роста для восстановления голосовых складок при атрофии, рубцах и бороздах. В работе Hirano S. и соавт. (2018) 18 пациентам с рубцами и бороздами ГС с периодичностью в 7 дней под местной анестезией выполнены 4 инъекции рекомбинантного фактора роста гепатоцитов в количестве 3–10 мкг в повреждённую область ГС, на протяжении 6 месяцев результаты не выявили серьезных побочных эффектов, связанных с лекарственным препаратом – ни при системном, ни при местном обследовании. Показатели VHI-10, амплитуда колебаний ГС были значительно улучшены через 6 месяцев, тогда как максимальное время фонации и дрожание голоса варьировались [110]. В ряде работ лечение пациентов с атрофией, рубцами и бороздами ГС проводилось с помощью основного фактора роста фибробластов, под местной анестезией вводилось от 10 мкг (Hirano S. et al., 2020; Van M. J. et al., 2020) до 100 мкг (Okui

A. et al., 2020) препарата, через 3–12 месяцев наблюдалось значительное улучшение объективных и субъективных параметров голоса, по данным стандартных протоколов (Dejonckere P. H., Bradley P., Clemente P. et al., 2001), при отсутствии каких-либо серьезных побочных эффектов. В работе Hirano S. и соавт. (2020) положительная динамика по VHI-10 была более выражена в группе атрофии, чем в группах рубцов или борозд; по мнению авторов, лечение тяжелых рубцов и борозд ГС требует дальнейшего повышения эффективности [60; 32; 114; 170].

Опубликованы результаты пилотного клинического исследования по лечению рубцов голосовых складок с помощью аутологичных костномозговых МСК (Hertegård S., 2020), в данное исследование были включены 16 пациентов с одно- или двусторонними рубцами ГС различной этиологии в т.ч. после хирургического лечения рака голосового отдела гортани, у 5 пациентов несмыкание ГС при фонации достигало 1,5–2 мм. В условиях опорной микроларингоскопии в дефект ГС после подслизистой резекции рубца были имплантированы 0,5–2 млн МСК в солевом растворе, либо геле ГК. На протяжении 1 года после операции каких-либо побочных эффектов отмечено не было; у 62–75% пациентов наблюдалось значительное улучшение вибраций ГС по данным высокочастотной видеоларингоскопии и порогового давления фонации, показатели VHI были значительно улучшены у 8 пациентов, при этом остальные не испытывали существенных изменений [100].

В исследовании Mattei A. и соавт. (2020) 6 пациентам с рубцами и 2 пациентам с бороздами ГС была выполнена инъекция 1 мл стромальной васкулярной жировой фракции в область рубцового дефекта: иссечение рубцовой ткани не проводилось. Через 12 месяцев показатель VHI был улучшен у всех пациентов, у 7 пациентов улучшение составило 18 и более баллов [154].

Также Mattei A. и соавт. (2020) опубликовали комментарий к пилотному клиническому исследованию (Hertegård S., 2020), в котором поднимается ряд вопросов, в том числе касающихся необходимости резекции рубца перед введением МСК и включения в исследование пациентов после хордэктомии по

поводу рака ГС. В ответном комментарии Hertegård S. и соавт. (2020) ссылаются на положительные результаты собственных экспериментальных исследований, в которых резекция рубца проводилась, а также указывают на высокий профиль безопасности МСК, что оправдывает возможность лечения пациентов после онкологического заболевания; в тоже время авторы подчёркивают, что результаты при обширных дефектах оказывались хуже. Обе группы учёных отмечают необходимость дальнейших исследований в этом направлении [101; 153].

1.9. Заключение

За последние несколько лет в большом количестве экспериментальных исследований продемонстрированы перспективы использования методов регенеративной медицины, в том числе клеточной терапии, для восстановления структуры и свойств голосовых складок при рубцовых повреждениях. В то же время, несмотря на обширную доказательную базу, количество проводимых клинических испытаний остается сравнительно небольшим. С одной стороны это может свидетельствовать о несовершенстве нормативно-правового регулирования в области регенеративной медицины, с другой – о несоответствии качества доклинических исследований требованиям клиники. Тем не менее, на сегодняшний день экспериментальные разработки методов лечения остаются востребованным и важным элементом развития и совершенствования медицинских технологий.

По результатам Отечественной и зарубежной литературы определяются основные тенденции экспериментальных исследований, однако детальный, сравнительный анализ данных осложняется чрезвычайно широким спектром дизайнов работ: использование разных источников клеток и носителей, вариабельность сроков наблюдения и других особенностей. Открытыми остаются вопросы о влиянии клеточной терапии на восстановление микроархитектоники коллагеновых волокон, играющей важную роль в формировании

биомеханических свойств голосовых складок, отсутствуют исследования с изучением локальных механических свойств рубцовой ткани и соотношения коллагенов I и III типов после клеточной терапии. Единичными остаются работы, в которых используется фибриновые скаффолды, несмотря на описанные их потенциальные преимущества. Крайне важными параметрами, которые могут влиять на безопасность и эффективность терапии является оценка интенсивности кровотечения и дыхательных нарушений вследствие отёка голосовых складок во время и после операции, тем не менее данные аспекты в большинстве работ также не отражены. Описанное выше побудило нас к проведению собственного экспериментального исследования по применению мезенхимных стромальных клеток в лечении рубцовых повреждений голосового отдела гортани.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн и структура исследования

В данной работе приведены результаты экспериментального исследования, в котором были использованы лабораторные животные – самцы кроликов породы Советская шиншилла в количестве 48 особей, а также лабораторные крысы породы Вистар в количестве 8 животных, источник последних – центральный виварий Сеченовского Университета. В рамках работы на экспериментальной модели проведено обоснование возможностей применения клеточной терапии на основе мезенхимных стромальных клеток при рубцовых повреждениях голосового отдела гортани, а также исследование влияния клеточных продуктов, содержащих мезенхимные стромальные клетки на восстановление морфологических и биомеханических характеристик голосовых складок при таких повреждениях. Подробная характеристика материалов, методов и дизайна работы представлена ниже. В рамках настоящего исследования мы использовали следующие определения.

Под рубцовыми повреждениями голосового отдела гортани в работе подразумевались рубцы, возникающие в области гортани, соответствующей голосовым складкам в исходе репаративных процессов после воздействия травмирующего фактора (Benninger, M. S., 1996, Friedrich G., 2013 Hantzakos, A., 2019) [36; 75; 93]. К мезенхимным стромальным клеткам относили класс мультипотентных клеток из костного мозга человека и млекопитающих, которые могут быть выделены и расширены в культуре, сохраняя при этом свою способность дифференцироваться в различные мезодермальные клеточные фенотипы и отвечающие минимальным критериям Dominici M. (2006) [62; 122].

Данная работа являлась контролируемым экспериментальным исследованием с параллельными группами. Первая часть была посвящена усовершенствованию и отработке воспроизводимости экспериментальной модели

рубцового процесса голосовых складок на лабораторных животных. Лабораторные кролики в количестве 12 особей были разделены на две равные группы. В каждой группе животным создавался хирургический дефект голосовых складок, между собой группы различались размером формируемого дефекта, оценка результатов формирования рубца проводилась через 3 месяца.

Основной блок экспериментов работы был разделен на основании источника МСК на две независимые части: эксперименты, в которых использовались аутологичные МСК костного мозга (кроликов) и эксперименты, в которых применялись МСК костного мозга человека. Всем животным хирургическим путём создавался односторонний дефект голосовой складки; через 3 месяца проводилась вторая операция, в ходе которой рубец иссекался и во вторичную рану осуществлялась имплантация клеточного продукта. Экспериментальные группы в обеих частях исследования формировались на основании типа вводимого в голосовую складку продукта.

В исследовании с аутологичными МСК животные были разделены на две равные экспериментальные группы по 6 кроликов. 1-я группа являлась контрольной: во вторичную рану голосовой складки после удаления рубца вводился физиологический раствор (лечения не проводилось). Животным 2-й экспериментальной группы в аналогичный дефект вводилась суспензия предварительно полученных аутологичных МСК. Через 3 месяца все животные выводились из эксперимента, голосовой отдел гортани иссекался; подготавливались образцы голосовых складок, которые направлялись на оценку морфологических и биомеханических свойств. В качестве группы чистого контроля (интактные голосовые складки), были использованы 6 голосовых складок кролика из биобанка. Исследования проводились параллельно на препаратах из одних и тех же образцов. Схема этапа и распределение образцов на группы и методы их оценки представлены на Рисунке 3 и в Таблице 1.



Рисунок – 3. Схема последовательности этапов экспериментов с аутологичными МСК

Таблица 1 - Распределение образцов голосовых складок на группы и методы их оценки в исследовании с аутологичными МСК

Группы	Группа чистого контроля	Экспериментальные группы	
		1	2
Объект изучения	Нативные ГС кроликов	Рубцы ГС без имплантации	Рубцы ГС, после имплантации аутологических МСК
Количество образцов в группе	Каждая группа включала 6 образцов		
1) Метод оценки	1) Классическое морфологическое исследование, балльная оценка морфологических признаков 2) 6		
2) Количество исследованных образцов каждой группы	1) Исследование толщины собственной пластинки слизистой оболочки 2) 6		
	1) Иммуногистохимическое исследование коллагенов I и III типов 2) 6		
	1) Атомно-силовая микроскопия 2) 3		

В исследовании с МСК костного мозга человека помимо МСК в суспензии для введения в дефект голосовых складок применялся еще один клеточный

продукт - комплекс ПЭГ-фибринового геля с МСК, соответственно были сформированы следующие 4 экспериментальные группы по 6 животных в каждой: группа 1 - МСК костного мозга человека в суспензии; группа 2 - комплекс МСК с ПЭГ-фибриновым гелем; группа 3 - ПЭГ-фибриновый гель без клеток; группа 4 - физиологический раствор.

Дополнительно для исследования распределения и сохранения МСК человека в голосовых складках кролика в ранние сроки после имплантации 3-м животным была имплантирована суспензия МСК человека, трансдуцированных лентивирусным вектором, экспрессирующим зелёный флюоресцирующий белок (GFP) и 3-м животным - комплекс МСК и ПЭГ-фибринового геля, содержащим аналогичные клетки. Через 3 дня эти 6 животных были выведены из эксперимента, препараты голосовых складок направлены на конфокальную микроскопию.

В экспериментальных группах 1-4 при проведении операций имплантации и в раннем послеоперационном периоде проводилась оценка интенсивности интраоперационного кровотечения, длительности операций, оценка дыхательных нарушений и восстановления активности и питания животных. Оценка морфологических и биомеханических свойств голосовых складок проводилась через 3 месяца после 2-й операции. Для оценки биомеханических свойств в этой части работы применялось наноидентифицирование в жидкой среде и использовались препараты голосовых складок непосредственно сразу после вывода животного из эксперимента, соответственно данный тип оценки выполнялся первым, затем препараты голосовых складок направлялись для морфологического исследования. В качестве группы чистого контроля (интактные голосовые складки), были также использованы 6 голосовых складок кролика из биобанка. Схема этапа, распределение образцов на группы и методы их оценки представлены Рисунке 4 и в Таблице 2.

До начала экспериментов с МСК человека для исследования биологических характеристик ПЭГ-фибринового геля *in vivo* на ранних сроках была выполнена его подкожная имплантация 8 лабораторным крысам. Через 3 и 7 дней животные по 4 крысы для каждого срока выводились из эксперимента и препараты импланта с окружающими тканями направлялись на морфологическое исследование.

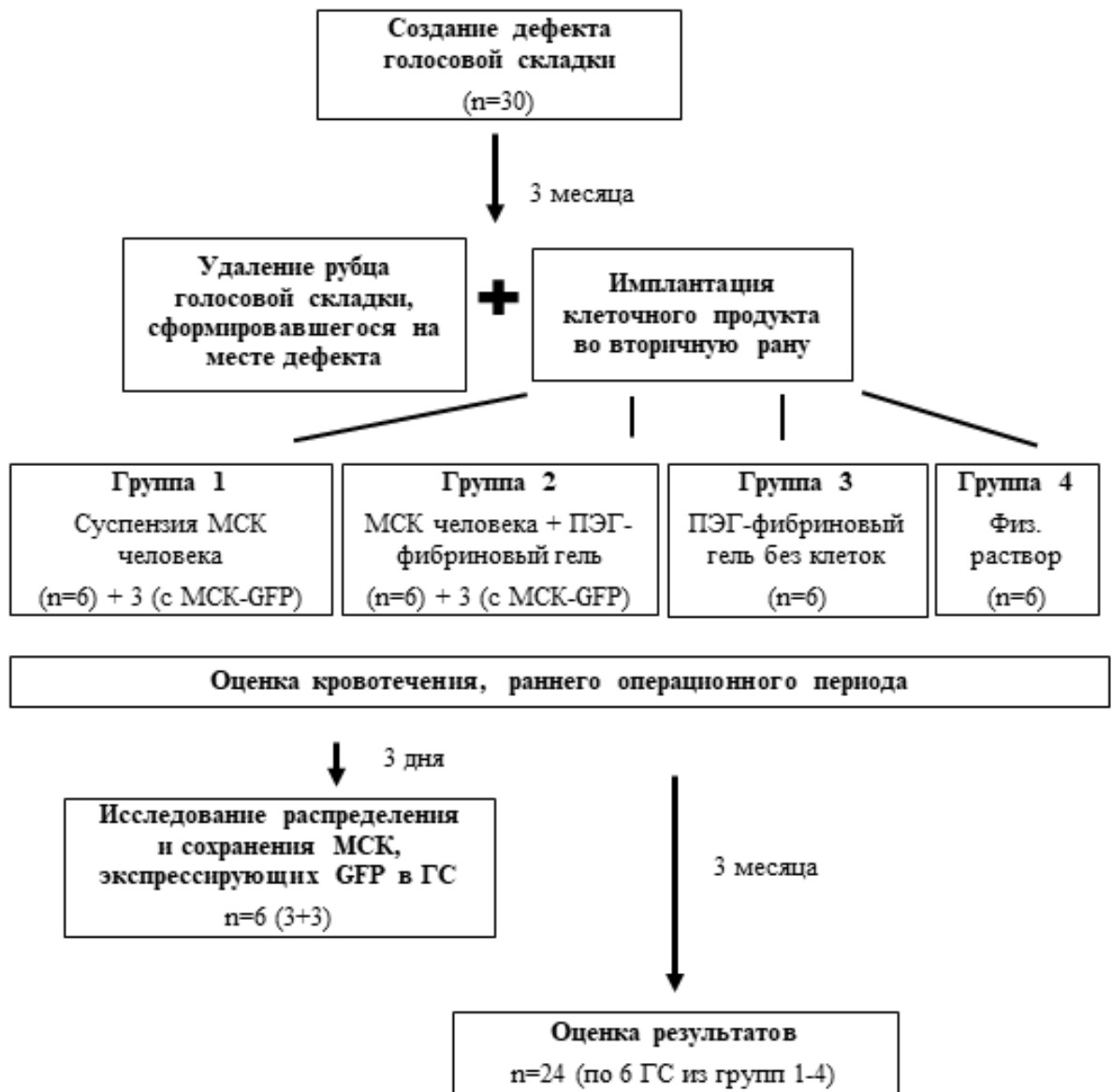


Рисунок – 4. Схема последовательности этапов экспериментов с МСК человека

Таблица – 2. Распределение образцов голосовых складок на группы и методы их оценки в исследовании с МСК человека

Группы	Группа чистого контроля	Экспериментальные группы			
		1	2	3	4
Объект изучения	Нативные ГС кроликов	Рубцы ГС, после имплантации МСК человека	Рубцы ГС, после имплантации комплекса ПЭГ-фибринового геля и МСК человека	Рубцы ГС, после имплантации ПЭГ-фибринового геля	Рубцы ГС без имплантации
Количество образцов в группе	Каждая группа включала 6 образцов				
1) Метод оценки 2) Количество исследованных образцов каждой группы	1) Наноидентирование механических свойств в жидкой среде 2) 4-6				
	1) Исследование толщины собственной пластинки слизистой оболочки 2) 6				
	1) Классическое морфологическое исследование, балльная оценка морфологических признаков 2) 6				
	1) Исследование вибрационной динамики тканей голосовых складок 2) по 2 образца в группах 2 и 4				

Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) (протокол № 02-20 от 21.02.2020).

2.2. Хирургические и клеточные методы, использованные в экспериментах

2.2.1. Усовершенствование и отработка воспроизводимости экспериментальной модели рубцового процесса голосовых складок кролика

Во всех исследованиях на голосовых складках данной работы использовалась экспериментальная модель рубцового процесса голосового отдела гортани – рубец, развившийся на месте резецированного участка голосовой складки. В качестве лабораторных животных нами были использованы

лабораторные кролики весом 2,5-4 кг. Хирургические вмешательства проводили в условиях операционной виварного комплекса. Для обеспечения безболезненности манипуляций, снижения уровня стресса и миорелаксации использовалась медикаментозная анальгезия путём внутримышечного введения двух компонентного препарата, содержащего тилетамин и золазепам (Золетил 100) из расчёта 10-15 мг/кг препарата и раствора ксилазина (Рометар) 1-2 мг/кг. После достижения необходимого уровня седации и снижения мышечного тонуса, животное фиксировалось на операционном столе в положении на спине с помощью бинтов (Рисунок 5). При интраоперационном появлении признаков повышения активности животного проводилась дополнительная анестезия в половинных дозах от первоначальной теми же препаратами. Отработка эндоларингеального доступа, а именно прямой ларингоскопии включала несколько способов: использование неонатологического клинка для подскладкового пространства (KarlStorz 8574RA Benjamin Neonate Subglottiscope 4.7mm x 11cm), использование модифицированного трахеоскопа и применение неонатологического клинка для оротрахеальной интубации по Miller C № 1 (Рисунок 6). Для отработки визуализации гортани использовался ригидный эндоскоп 0° диаметром 4.0 мм, длиной 18 см ригидный эндоскоп 0° диаметром 2.7 мм, длиной 11 см, стандартный эндоскопический источник света, эндоскопическая камера и монитор, микроскоп ZEISS OPMI pico.

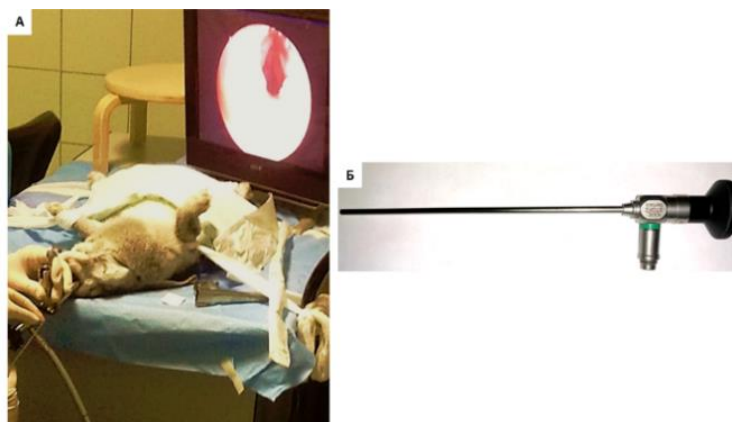


Рисунок – 5. Положение животного на операционном столе при проведении оперативного вмешательства (А): на заднем плане - монитор с эндоскопической

картиной голосового отдела гортани; Б - ригидный эндоскоп 0° $d = 4.0$ мм, использовавшийся для визуализации гортани

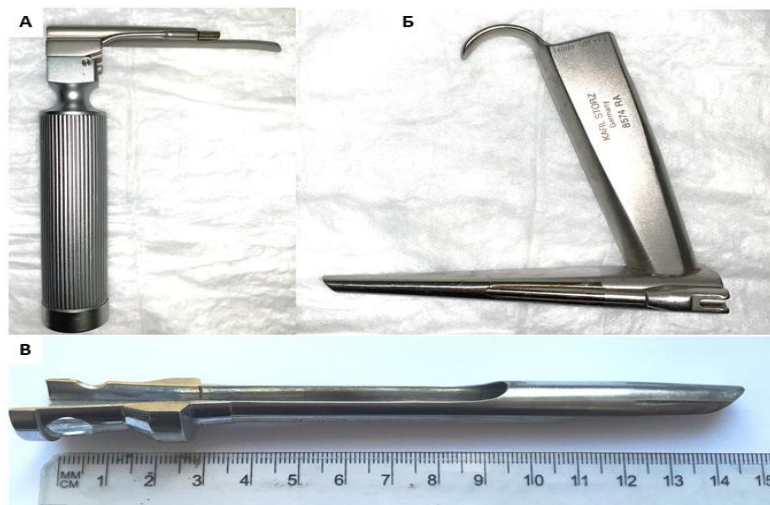


Рисунок – 6. Набор инструментов, использовавшихся для обработки прямой ларингоскопии у лабораторных кроликов: А - неонатологический клинок для оротрахеальной интубации по Miller С № 1; Б – неонатологический ларингоскопический клинок для подскладкового пространства по Benjamin 4.7мм x 11см; В - модифицированный трахеоскоп

После достижения адекватного обзора голосового отдела гортани проводилось создание одностороннего дефекта голосовой складки по типу «минус ткань», для этого голосовая складка захватывалась и зажималась в области средней трети с помощью чашеобразных щипцов, проводилась тракция в краниальном направлении до отрыва захваченного участка. При подборе хирургического инструментария для проведения вмешательства была исследована возможность применения нескольких видов распространенных видов чашеобразных щипцов для микрохирургии гортани: прямые щипцы длиной 27 см с диаметром захватывающей поверхности 2 мм; загнутые влево щипцы длиной 27 см с диаметром захватывающей поверхности 2 мм; загнутые на 45° вверх, щипцы длиной 18 см с диаметром захватывающей поверхности 2 мм, загнутые влево щипцы длиной 18 см с диаметром захватывающей поверхности 2 мм (Рисунок 7).

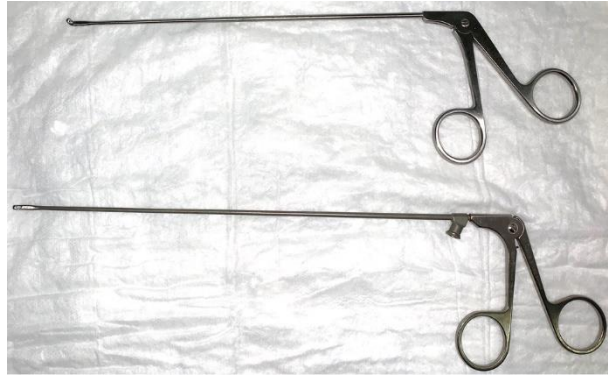


Рисунок – 7. Чашеобразные щипцы, использованные при создании дефекта голосовых складок: сверху - с углом захвата 45° вверх; снизу - с захватом налево

Для определения характеристик дефекта ГС, приводящего к формированию хорошо заметного рубца после завершения репаративных процессов создавалось два типа дефекта голосовых складок, различающиеся размерами: 1-й предполагал однократное выкусывание участка правой голосовой складки в области средней трети, размер дефекта при этом соответствовал объему рабочей поверхности инструмента; 2-й включал более расширенную резекцию, а именно удаление слизистой оболочки и II-III слоёв собственной пластинки ГС до поверхностных слоёв щито-черпаловидной мышцы на протяжении $1/3$ голосовой складки с отступом 3 мм от передней комиссуры. Левые голосовые складки оставляли интактными, для снижения риска выраженного послеоперационного отека окружающих тканей и риска асфиксии (Рисунок 8, 9).

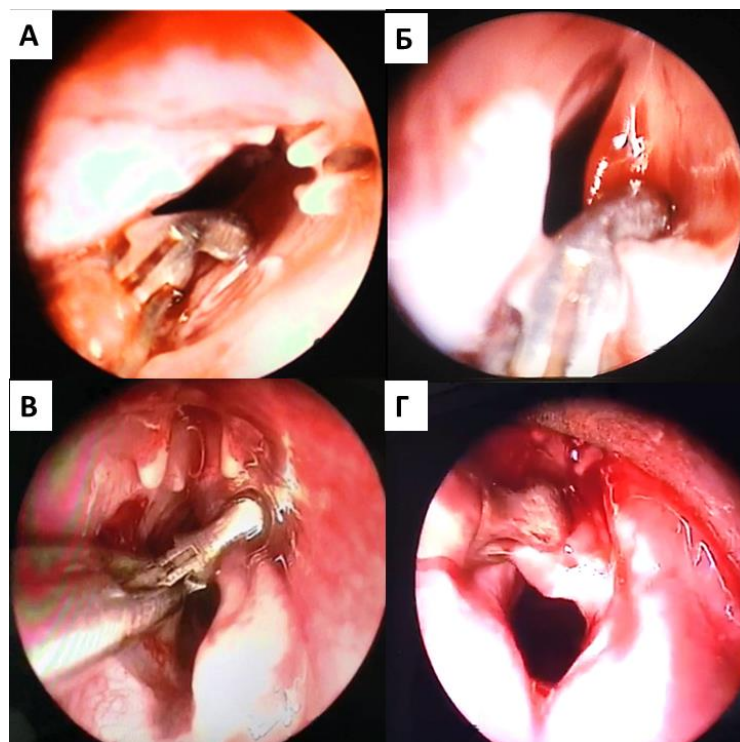


Рисунок – 8. Типичная эндоларингоскопическая картина кролика при создании дефекта голосовой складки: А – подведение щипцов на правую сторону к средней 1/3 правой ГС ; Б – захват тканей ГС; В – аналогичный этап с использованием щипцов с углом 45° кверху; Г – тракция захваченного участка. Эндоскоп 0°

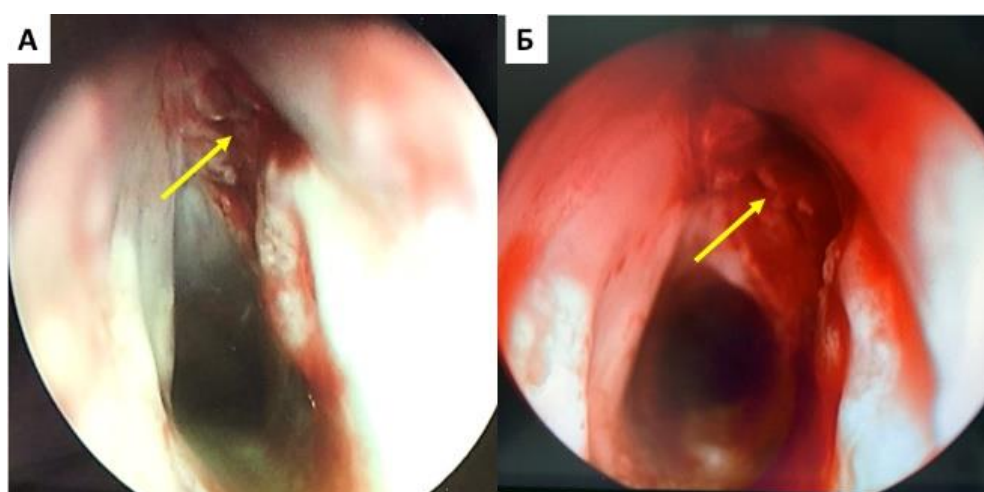


Рисунок – 9. Типичная эндоларингоскопическая картина модельного дефекта голосовой складки кролика: А – дефект 1-го типа - однократное

выкусывание. Б - дефект 2-го типа - удаление слизистой оболочки и II-III слоёв собственной пластинки на протяжении 1/3 голосовой складки (дефекты указаны стрелками); эндоскоп 0⁰

При необходимости осуществлялась санация кровяных сгустков и гемостаз путем прижатия ватного тупфера на зонде с навивкой, смоченного раствором адреналина (Рисунок 10).

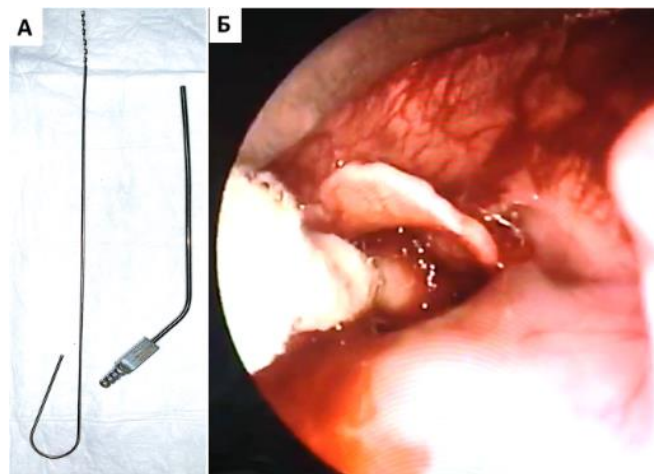


Рисунок – 10. Горланный зонд с навивкой и наконечник аспиратора, используемые при операциях (А); Б – эндофото при остановке кровотечения путем прижатия ватного тупфера на зонде с резьбой; эндоскоп 0⁰

После операции животных помещали в отдельные клетки, где осуществлялось динамическое наблюдение за их состоянием до следующего этапа исследования. Каждая клетка подписывалась с животным в соответствии с применением Таблицы 3. В послеоперационном периоде проводилась антибактериальная терапия: цефотаксим внутримышечно из расчёта 75мг/кг х 1 раз в сутки, в течение 5 дней.

Таблица – 3. Протокол для идентификации животного и фиксации данных исследования

Номер клетки			
Вид животного			
Проект			
ФИО экспериментатора			
Часть	№		
Номер животного в группе			
Дата операции 1			
Дата операции 2			
Дата окончания эксперимента			

Всего на данном этапе было прооперировано 12 животных, разделённых на 2 равные группы: 6-ти животным был создан дефект голосовой складки путём однократного выкусывания в области средней трети голосовой складки чашеобразными щипцами диаметром 2 мм, 6-ти животным – резекция 1/3 голосовой складки. Срок созревания рубцовых изменений голосовых складок составлял 3 месяца. Через 3 месяца производилась оценка результатов в аспекте идентификации рубца. Для этого выполнялась прямая ларингоскопия (аналгоседация и визуализация аналогичным способом, как и при создании дефекта). Критерием оценки служила возможность чётко визуально и тактильно определить границы рубцового дефекта, либо отсутствие таковой.

2.2.2. Создание модельного дефекта рубцового повреждения голосовых складок у животных экспериментальных групп

Создание модельных дефектов у животных, включённых в экспериментальные группы, проводилось после завершения этапа оптимизации, отработки и оценки экспериментальной модели. Аналгоседация осуществлялась способом аналогичным, описанному в разделе 2.2.1. Для прямой ларингоскопии гортани использовался неонатологический клинок для оротрахеальной интубации

по Miller C № 1. Для визуализации гортани использовался ригидный эндоскоп KarlStorz-Hopkins 0° 4.0 мм. Всем животным создавался односторонний дефект голосовой складки, а именно удаление слизистой оболочки и II-III слоёв собственной пластинки ГС, т.е. голосовой связки на протяжении 1/3 голосовой складки с отступом 3-4 мм от передней комиссуры (дефект 2-го типа). В эксперименте, посвященному аутологичным МСК создавался дефект правых голосовых складок, а в эксперименте с ксеногенными МСК человека – левых, что было обусловлено доступностью используемого хирургического инструментария, в первом случае использовались чашеобразные щипцы, загнутые кверху, во втором - загнутые налево, в обоих случаях рабочая длина была 18см, а диаметр захватывающей поверхности - 2 мм.

Далее следует описание распределения количества животных, которым создавался дефект голосовой складки, все части работы выполнялись по времени последовательно в приведённом порядке. Всего было прооперировано 6 животных в исследовании с аутологичными МСК, для экспериментальных групп 1 и 2, в эти же группы 6 кроликов включены из этапа отработки воспроизводимости экспериментальной модели (с созданным дефектом 2-го типа), таким образом по 6 кроликов для каждой группы. Шесть животных было прооперировано для исследования распределения и сохранения МСК человека, в голосовых складках в ранние сроки после имплантации, по 3 животных для каждой группы. В исследовании с человеческими МСК и ПЭГ-фибриновым гелем – 26 животных: по 6 кроликов для экспериментальных групп 1-4, 2-е животных погибло через 2 и 2,5 месяца после проведения 2-й операции, по заключению ветеринара - в связи с острой инфекционной патологией ЖКТ. Ведение кроликов в послеоперационном периоде не отличалось от описанного в разделе 2.2.1.

2.2.3. Получение аспирата костного мозга кроликов

Для всех животных в исследовании с аутологичными МСК между первым и вторым хирургическим вмешательством на гортани была проведена пункция бедренной кости для забора костного мозга, который служил источником для культивирования аутологичных МСК. Обезболивание осуществлялось способом аналогичным, использованному при создании дефекта голосовых складок и проведении имплантации. Первым этапом в проекции проксимального эпифиза бедренной кости выбривался участок шерсти 4 x 4 см. Кожа обрабатывалась раствором антисептика, затем проводился разрез кожи и подкожной жировой клетчатки длиной 1 см, на 2 мм медиальнее выступа большого вертела. Пальпаторно определялся участок эпифиза между большим вертелом и латеральной частью шейки бедренной кости. Затем в этом месте проводилась пункция бедренной кости с помощью стерильных игл (GTA NAXI 14-16G x 10-71 мм или Bloodline TBL 14G x 50 мм) на глубину 3-4 см по направлению диафиза. Правильное положение иглы контролировалось по характерному тактильному ощущению провала после прохождения кортикального слоя кости и попадания в канал диафиза. Костный мозг аспирировали с помощью шприцов (20 мл) с предварительно набранным 1мл раствора гепарина (5000ЕД/мл); (Рисунок 11). Полученный аспират в объеме 2-4 мл транспортировался в лабораторию костного мозга. На место разреза накладывали 2-3 узловых шва (викрил 4,0) и обрабатывали место разреза раствором бриллиантового зелёного. С противоположной стороны проводили аналогичную манипуляцию. В послеоперационном периоде системная антибактериальная терапия не проводилась



Рисунок – 11. Процедура пункции бедренной кости и получения аспирата костного мозга кролика

2.2.4. Подготовка клеточных продуктов для имплантации

Выделение и культивирование аутологичных МСК кролика. Полученный аспират костного мозга (КМ) в объеме 2-3 мл в стерильной пробирке в термоконтейнере с соблюдением температурного режима (+4-8°C) транспортировался в лабораторию. Центрифугирование клеточной суспензии проводили при 1500 об/мин (350g) в течение 5 минут, затем удаляли отсасыванием супернатант (надосадочную жидкость) и осадок ресуспендировали в лизирующем эритроциты буферном растворе (114 мМ NH₄Cl, 7,5 мМ KНСО₃, 100 мкМ ЭДТА). После 3-5 минут перемешивания клеток в растворе суспензию центрифугировали повторно. Далее снова удаляли гемолизованный супернатант, и осадок клеток ресуспендировали в ростовой среде следующего состава: DMEM/F-12 (1:1, ПанЭко, Россия), телячья эмбриональная сыворотка (10%, NuClone, США), инсулин (0,4 мкМ), основной фактор роста фибробластов (FGFb, 20 нг/мл), дексаметазон или метилпреднизолон (1 нМ), гентамицин (0,25 мг/л). Полученная таким образом первичная культура представляет собой в

основном мононуклеарные клетки КМ. Для культивирования эти клетки сажали в количестве 2,0-2,5 млн. кл/мл в культуральные флаконы.

Далее, культуральные флаконы помещали в CO₂-инкубатор (5% CO₂ и 95% атмосферного воздуха) с повышенной влажностью. После 2-3 суток от момента выделения первичной культуры фракцию клеток, не прикрепившихся к субстрату, удаляли. Оставшимся на поверхности культурального пластика фибробластоподобным клеткам заменяли культуральную среду раз в 3-4 суток. По достижении субконфлюэнтного монослоя клетки пассировали, для этого флаконы промывали раствором Версена или Хэнкса, и далее добавляли 0,25% трипсин в растворе Версена для открепления клеток. Полученную суспензию клеток ресуспендировали в свежей культуральной среде и переносили в новый флакон в соотношении 1:3. Криоконсервацию клеток осуществляли в среде, содержащей 30% DMEM/F-12, 10% диметилсульфоксида (ДМСО), и 60% телячьей эмбриональной сыворотки.

Клетки в концентрации не более 5 млн клеток/мл помещали в криобирки и замораживали до температуры -70° С со скоростью 1 град/мин, после чего ампулы переносили в дьюар с жидким азотом для длительного хранения. Перед проведением оперативного вмешательства клетки размораживали и культивировали в стандартных условиях в полной ростовой среде (DMEM/F12 (1:1) с добавлением глутамина (2мМ L, Биолот, Россия), гентамицина (50 мкг/мл, ПанЭко, Россия), инсулин-трансферрин-селенит (1:100) (Биолот, Россия), bFGF (20нг/мл, Prospec, Израиль) и эмбриональной телячьей сыворотки FBS (10%, HyClone, США).

Выделение и культивирование МСК костного мозга человека. Первичная культура МСК костного мозга человека была изолирована из биопсийного материала, предоставленного Биобанком Сеченовского университета и забранного у здоровых добровольцев при подписании информированного согласия. Выделение клеток было осуществлено согласно

ранее описанному протоколу в разделе 2.2.4. Иммунофенотипирование проводилось в соответствии со стандартной панелью поверхностных маркеров (CD11b, CD14, CD19, CD29, CD34, CD45, CD90, CD105) на микрофлюидном сортере SH800S (Sony biotechnology, США). Клетки культивировались в стандартных условиях при температуре 37°C и 5% CO₂ в полной ростовой среде следующего состава: DMEM/F12 (1:1) с добавлением глутамина (2мМ L, Биолот, Россия), гентамицина (50 мкг/мл, ПанЭко, Россия), инсулин-трансферрин-селенит (1:100) (Биолот, Россия), bFGF (20нг/мл, Prospec, Израиль) и эмбриональной телячьей сыворотки FBS (10%, HyClone, США). Смена среды осуществлялась каждые 2-3 дня. В работе использовали клетки не старше 4 пассажа.

Формирование полиэтиленгликоль (ПЭГ)-фибриновой гидрогелевой системы. Для формирования гидрогелевой системы использовали модификацию фибриногена с помощью О,О'-бис[2-(N-сукцинимидил-сукциниламино)этил]поли(этиленгликоль) (PEG-NHS; Sigma Aldrich, Германия). PEG-NHS растворяли в стерильном фосфатном буфере в концентрации 1,5 мг/мл. К раствору фибриногена (25 мг/мл) добавляли полученный раствор PEG-NHS в молярном соотношении 5:1 (PEG-NHS : фибриноген). Реакция осуществлялась в течение 2 ч при температуре 37 °С. Гель формировался при добавлении к модифицированному фибриногену равного объема тромбина с концентрацией 5 У/мл. Перед проведением хирургического вмешательства модифицированный фибриноген с добавлением или без клеточной суспензии и тромбин находились в стерильных одноразовых пластиковых пробирках объёмом 1,5 мл.

Трансдукция МСК костного мозга человека для экспрессии зеленого флуоресцентного белка (green fluorescent protein, GFP). Для визуализации введенных в голосовые связки клеток МСК трансдуцировали с помощью рекомбинантного лентивируса LVT TagGFP2 (Евроген, Россия) для стабильной экспрессии зеленого флуоресцентного белка (green fluorescent protein, GFP). При достижении 80-90% конфлюэнтности к клеткам добавляли 50 мкл суспензии вирусных частиц ($0,5 \times 10^6$ трансдуцирующих единиц/мл) и 10 мкл Polybrene и

инкубировали в течение 24 часов при 37°C в CO₂-инкубаторе. На следующий день меняли питательную среду (состав указан выше). При достижении 90% конфлюэнтности клетки снимали, промывали и сортировали с использованием клеточного микрофлюидного сортера Sony SH800. Трансдуцированные МСК добавлялись в гидрогелевую систему и вводились согласно протоколу, описанному ранее.

2.2.5. Подкожная имплантация ПЭГ-фибринового геля малым лабораторным животным

Данные манипуляции проводились с целью исследования биологических характеристик ПЭГ-фибринового геля *in vivo* на ранних сроках. В качестве экспериментальной модели использовалось подкожное введение ПЭГ-фибринового геля малым лабораторным животным. Всего в исследовании участвовали 8 крыс породы Вистар весом 300-400г. Хирургические вмешательства проводили в условиях операционной виварного комплекса. Для обеспечения безболезненности манипуляций применялась аналгоседация путем внутримышечного введения раствора тилетамина и золазепам (Золетил 100) из расчета 10-15 мг/кг препарата и раствора ксилазина (Рометар) 1-2 мг/кг непосредственно перед экспериментом. После достижения необходимого уровня седации и снижения мышечного тонуса на холке животного выбривался участок кожи 3 x 3 см. Для приготовления ПЭГ-фибринового геля в операционную из лаборатории доставлялись два компонента: ПЭГ-фибриноген и тромбин в концентрации 0.2 U на 1 мг, которые смешивались в пропорциях 1:1 и через 60-90 сек. после визуальных признаков начала полимеризации в объеме 1,0 мл имплантировались под кожу в область холки каждому животному путем инъекции через иглу диаметром 23G (Рисунок 12).



Рисунок – 12. Вид операционного поля непосредственно сразу после имплантации ПЭГ-фибринового геля

В послеоперационном периоде за животными было установлено динамическое наблюдение, дополнительная терапия не проводилась. Из всех оперированных животных ни в одном случае не отмечена гибель животного в результате развития каких-либо осложнений. Через 3 и 7 дней животные по 4 крысы для каждого срока выводились из эксперимента путём избыточного внутримышечного введения раствора тилетамина- золазепама, имплантат вместе с окружающими тканями вырезался и направлялся на исследование степени биодegradации и патоморфологических изменений.

2.2.6. Техника операций по имплантации клеточных продуктов аутологичных МСК костного мозга и МСК костного мозга человека, комплекса ПЭГ-фибринового геля с МСК костного мозга человека, ПЭГ-фибринового геля в голосовые складки кроликов

Операции данного этапа у каждого животного проводились через 3 месяца после 1-й операции (создания дефекта голосовых складок). Техника обезболивания, положения животного на операционном столе, способы визуализации голосового отдела гортани не отличались от использованных во время 1-й операции и описанных в разделе 2.2.1. Под контролем торцевого

эндоскопа выполнялась идентификация рубца голосовой складки, затем рубец иссекался с помощью чашеобразных щипцов, при этом границы рубца определялись визуально и тактильно (Рисунок 13). При необходимости осуществлялся гемостаз путем прижатия ватного тупфера на зонде с навивкой, смоченного раствором адреналина.

Непосредственно после этого выполнялась имплантация клеточного продукта путём инъекции с помощью эндоларингеальной либо эндоназальной иглы для эндоскопической риносинусхирургии. Клеточный продукт предварительно доставлялся в операционную из клеточной лаборатории в стерильных пробирках с соблюдением температурного режима. Техника имплантации суспензии аутологичных МСК костного мозга и МСК костного мозга человека была одинаковой. В инсулиновый шприц набиралась суспензия клеточного продукта объёмом 1,0 мл, заполнялось «мёртвое пространство» иглы, после этого конец иглы под контролем зрения вводился в край вторичной раны голосовой складки, фактически в окружающие дефект края слизистой оболочки и II-III слой собственной пластинки ГС, затем осуществлялась инъекция клеточного продукта. Правильность глубины и места инъекции оценивалась по характерному образованию инфильтрата, размер которого коррелировал с объемом вводимой суспензии (Рисунок 13). В части исследования с аутологичными МСК объём имплантата составлял 100-150 мкл (1×10^5) МСК, с ксеногенными МСК человека – 500 мкл (5×10^5) МСК.

В экспериментальных группах, где использовался ПЭГ-фибриновый гидрогель и комплекс ПЭГ-фибринового геля с МСК костного мозга человека подготовка импланта проводилась непосредственно в операционной после завершения этапа эксцизии рубцовой ткани. Два компонента геля: фибриноген, содержащий МСК или без них, и тромбин смешивались в шприце 1,0 мл в пропорциях 1:1 (по 0,5 мл) и через 60-90 сек, при визуальных признаках начала полимеризации, гель через эндоларингеальную иглу имплантировался во вторичную рану голосовой складки в объеме 500 мкл (5×10^5) МСК. В экспериментальных группах рубцов без лечения аналогичным образом вводился

соответствующий объём физиологического раствора (0,9% NaCl). Затем осуществлялась санация кровяных сгустков и излишков имплантата из просвета гортани, по необходимости – гемостаз. Ведение в послеоперационном периоде не отличалось от описанного в пункте 2.2.1.

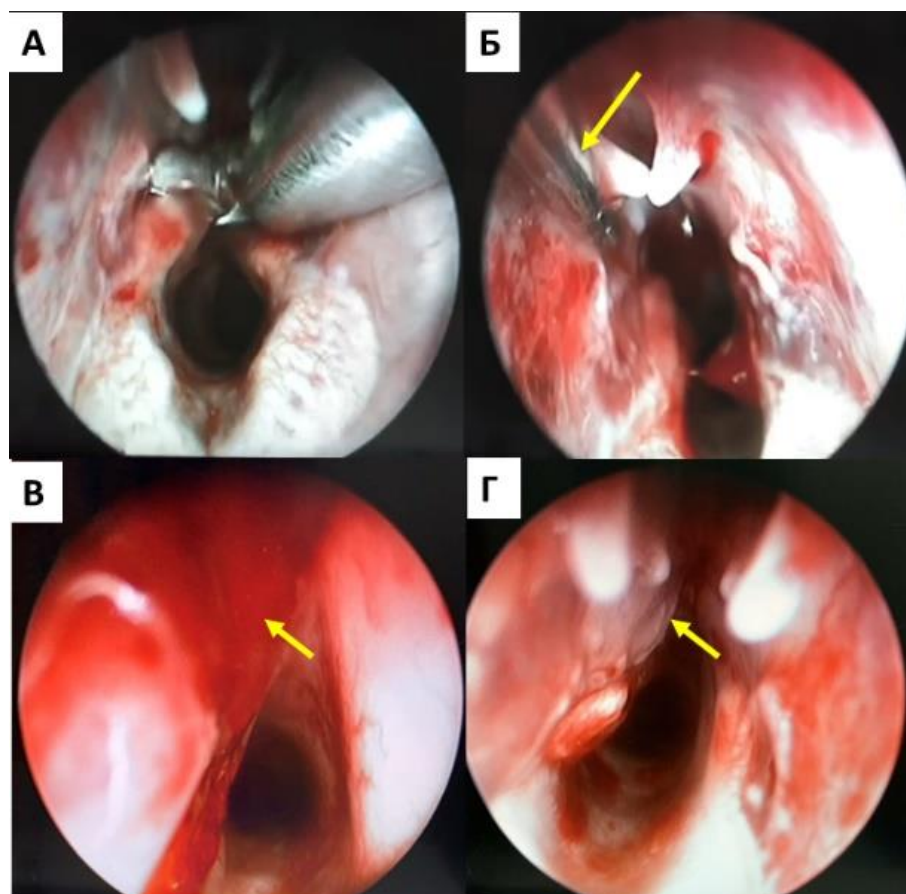


Рисунок – 13. Интраоперационные эндоскопы при имплантации клеточных продуктов в голосовые складки кролика: А – резекция рубцовой ткани левой ГС; Б – погружение острия иглы (стрелка) в край вторичной раны голосовой складки; В – типичная эндоскопическая картина после имплантации суспензии МСК (стрелка); Г – типичная эндоскопическая картина после имплантации комплекс ПЭГ-фибринового геля с МСК костного мозга человека (стрелка); эндоскоп 0⁰

Всего в исследовании с аутологичными МСК приведённым способом клеточная суспензия в фосфатно-солевом буферном растворе была введена 6-ти животным, а шести животным – физиологический раствор.

В исследовании с МСК человека: суспензия МСК в фосфатно-солевом буферном растворе, комплекс МСК и ПЭГ-фибринового геля, ПЭГ-фибриновый гель без клеток и физиологический раствор были имплантированы 24-м кроликам (6 животным каждой из 4-х групп соответственно).

Для исследования распределения и сохранения МСК человека в голосовых складках в ранние сроки после имплантации, 3-м животным была имплантирована суспензия МСК человека, трансдуцированных лентивирусным вектором, экспрессирующим GFP и 3-м животным - комплекс МСК и ПЭГ-фибринового геля, содержащим аналогичные клетки.

После операций животные выводились из эксперимента путем чрезмерной внутримышечной инъекции раствора тилетамина–золазепам в установленные контрольные сроки, 36 из них - через 3 месяца после имплантации (через 6 месяцев после создания дефекта), 6 – через 3 дня после имплантации.

2.3. Методы оценки результатов исследования

2.3.1. Метод оценки интенсивности интраоперационного кровотечения и длительности операций при имплантации клеточных продуктов: суспензии МСК человека в фосфатно-солевом буферном растворе и комплекса МСК человека с ПЭГ – фибриновым гелем

Данное исследование проводилось в части работы, где использовались МСК костного мозга человека, соответственно оценка интенсивности интраоперационного кровотечения и длительности операций проводилась во время вмешательств по имплантации соответствующих продуктов в ГС кроликов экспериментальных групп 1 – 4: МСК костного мозга человека в суспензии ФСБ

(группе 1), комплекса МСК с ПЭГ - фибриновым гелем (группе 2), ПЭГ - фибринового геля без клеток (группе 3) и физиологического раствора (группе 4).

Интенсивность интраоперационной кровоточивости тканей оценивалась по 4-х балльной системе сразу после имплантации продукта: 0 – минимальная кровоточивость (следы крови на раневой поверхности); 1 – слабая кровоточивость (раневая поверхность местами покрыта кровяными сгустками; 2 - умеренная кровоточивость – (раневая поверхность полностью покрыта кровяными сгустками, однако скопления крови в просвете гортани нет, дополнительный гемостаз не требуется; 3 - выраженная кровоточивость (требуется аспирация кровяных сгустков из просвета гортани и прижатие ватного тупфера, смоченного раствором адреналина на зонде с навивкой к раневой поверхности); 4 – максимальная кровоточивость (требуется длительный гемостаз путём прижатия ватного тупфера, смоченного раствором адреналина на зонде с навивкой к раневой поверхности, многократная аспирация кровяных сгустков).

Время операции оценивалось в минутах от момента установки до момента удаления ларингоскопа. Примеры эндофотографий, соответствующих различным степеням интраоперационного кровотечения приведены на Рисунке 14.

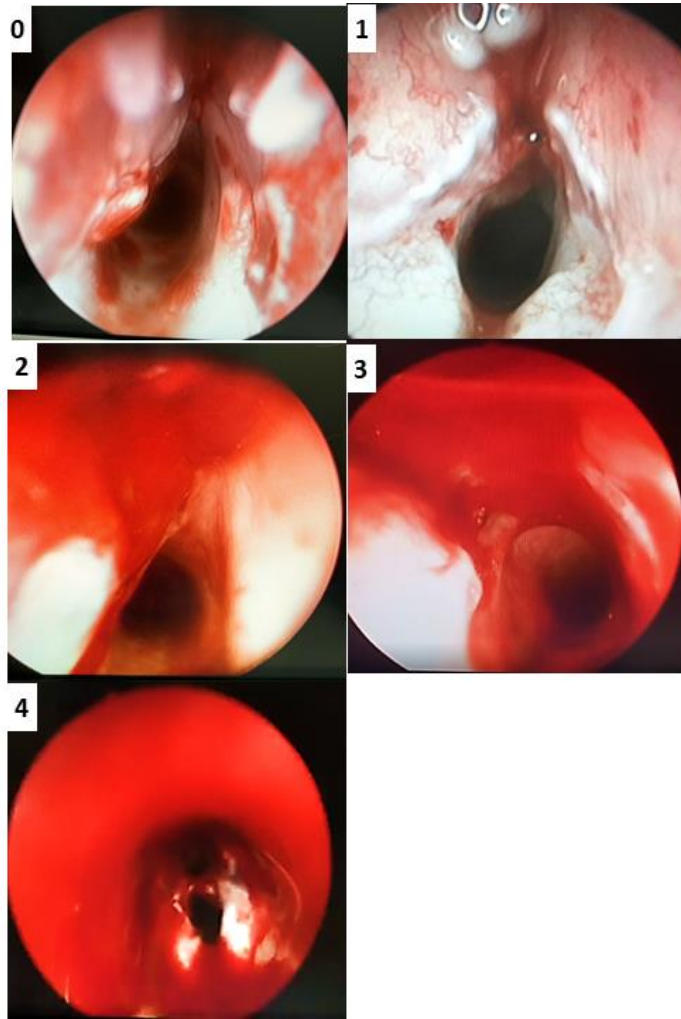


Рисунок – 14. Эндосфото, показывающие степень интенсивности интраоперационного кровотечения, на основании которого устанавливался балл по шкале от 0 до 4-х; эндоскоп 0⁰

2.3.2. Метод оценки дыхательных нарушений в раннем послеоперационном периоде и оценки восстановления активности и питания животных на 1-е сутки после имплантации клеточных продуктов: суспензии МСК человека в фосфатно-солевом буферном растворе и комплекса МСК человека с ПЭГ – фибриновым гелем

Данное исследование также проводилось в части работы, где использовались МСК костного мозга человека, соответственно оценка дыхательных нарушений в раннем послеоперационном периоде и восстановление

активности и питания животного на 1-е сутки после операции проводилась после вмешательств по имплантации соответствующих продуктов кроликам экспериментальных групп 1 – 4: МСК костного мозга человека в суспензии ФСБ (группе 1), комплекса МСК с ПЭГ - фибриновым гелем (группе 2), ПЭГ - фибринового геля без клеток (группе 3) и физиологического раствора (группе 4).

Выраженность дыхательных нарушений в послеоперационном периоде оценивалась по трем параметрам: интенсивность, длительность стридора и частота дыхательных движений (ЧДД). Для оценки интенсивности стридора применялась 3-х балльная система: 0 – свободное дыхание, (аускультативно прохождение воздуха через голосовую щель определялось только при использовании фонендоскопа и прослушивании с передней поверхности шеи). 1 – слабая степень стридора (шум, определяющийся на расстоянии менее 0,5 м). 2 – умеренный стридор (шум, определяющийся на расстоянии 1 м и более) 3 – выраженный стридор (шум, ослабление дыхания). Наличие признаков стридора оценивалось каждый час до полного исчезновения. ЧДД оценивалась по количеству экскурсий грудной клетки за 1 мин через 10 минут после завершения операции. Восстановление привычного объема и рациона питания, нормальной активности животных фиксировалось на 1-е сутки после операции в виде статуса (восстановление «+» или восстановление «-») через 24 часа после оперативного вмешательства.

2.3.3. Морфологические методы исследования

Морфологическое исследование проводилось под руководством д.м.н. профессора Шехтера А.Б. в Институте регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины Сеченовского Университета.

Морфологическое исследование ПЭГ-фибринового геля при подкожном введении малым лабораторным животным. Для определения

биохарактеристик ПЭГ- фибринового геля *in vivo* на ранних сроках использовалось морфологическое исследование его структуры после подкожной имплантации малым лабораторным животным (пункт 2.2.5.). В зависимости от сроков проведения морфологического исследования животные были разделены на 2 равные группы по 4 крысы в каждой: в первой опытной группе исследование проводилось через 3 дня после имплантации геля, во второй – через 7 дней. После вывода животного путём избыточного внутримышечного введения раствора тилетамина и золазепама. Производился широкий разрез кожи над местом имплантации в области холки, затем проводилась визуальная оценка патанатомических изменений в окружающих имплант тканях, после имплант вместе с окружающими тканями резецировался. Макропрепараты ПЭГ-фибринового геля с окружающими тканями фиксировались в 10% нейтральном формалине и заливались в парафин. Микротомные срезы толщиной 4-5мкм после депарафинизации окрашивались гематоксилином/эозином. Препараты изучались в универсальном микроскопе Leica DM 4000 B LED и фотографировались с помощью камеры DFC 7000 T. Кроме стандартной световой микроскопии препараты изучались методом фазово-контрастной микроскопии на том же микроскопе.

Визуализация локализации и распределения трансдуцированных МСК в виде суспензии и в ПЭГ-фибриновом геле через 3 дня после имплантации в голосовые складки. Объектами исследования были препараты голосовых складок, разделенные на две равные группы по 3 голосовые складки: с имплантированными GFP-мечеными МСК костного мозга человека (группа 1) и с имплантированным комплексом ПЭГ-фибринового геля и GFP-меченных МСК костного мозга человека (группа 2). Забор материала осуществлялся на 3-й день после имплантации. Фрагменты ткани фиксировали в 10% растворе формалина в фосфатном солевом буфере в течение 6 часов, затем помещали в 30% раствор сахарозы на 24 часа и переносили в форму с последующей заливкой Tissue-Tek OCT Compound (Sakura Finetek, Нидерланды) и замораживанием. Срезы

толщиной до 20 мкм были выполнены с использованием криотома HM525 NX (Thermo Fisher Scientific, США) и изучены при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 880 с модулем AiryScan и GaAsP детектором (Carl Zeiss, Германия). Ядра клеток были дополнительно окрашены Hoechst 33342.

Морфологическое и морфометрическое исследование препаратов голосовых складок контрольных и экспериментальных групп через 3 месяца после имплантации клеточных продуктов. Для изучения структуры голосовых складок в экспериментах и морфологического обоснования эффективности лечения применялось морфологическое и морфометрическое исследование препаратов ГС. Морфологическое исследование препаратов голосовых складок проводилось при создании рубца через 6 месяцев после начала эксперимента и через 3 месяца после рубцевания вторичной раны. В исследовании с аутологичными МСК было изучено 6 голосовых складок с рубцовыми дефектами без лечения (группа 1) и 6 голосовых складок с введенной во вторичную рану суспензией аутологичных МСК (группа 2), дополнительно 6 интактных ГС, были взяты из биобанка и оценивались в качестве группы чистого контроля.

В исследовании с МСК человека были изучены по 6 оперированных голосовых складок из экспериментальных групп 1-4: рубцы ГС, леченые МСК костного мозга человека в суспензии (группа 1), рубцы ГС леченые комплексом МСК человека с ПЭГ-фибриновым гидрогелем (группа 2), рубцы ГС леченые ПЭГ-фибриновым гидрогелем без клеток (группа 3) и рубцы ГС без лечения (группа 4 – введение физиологического раствора).

Аналогично части работы с аутологичными МСК в качестве группы чистого контроля 6 интактных голосовых складок были взяты из биобанка. Голосовые складки вырезались, из окружающих структур, разрезы проводились выше и ниже голосовой складки в направлении от слизистой оболочки к щитовидному хрящу (Рисунок 15). Затем препараты фиксировались в 10% нейтральном формалине и заливались в парафин (HISTOMIX, BioVitrum, Санкт-Петербург, Россия) в такой

плоскости, чтобы при микротомировании срез проходил от эпителия к щитовидному хрящу по всей длине голосовой складки: фактически препарат устанавливался на «ребро», которым служил щитовидный хрящ. Микротомные срезы толщиной 4-5 мкм после депарафинизации окрашивались гематоксилином/эозином, пикросириусом красным, орсеином на эластик. Препараты изучались в универсальном микроскопе Leica DM 4000 B LED и фотографировались с помощью камеры DFC 7000 T: помимо стандартной световой микроскопии проводилась фазово-контрастная, темнопольная и поляризационная микроскопии. Вместе с классическим гистологическим анализом была проведена морфометрия в виде балльной оценки морфологических признаков рубцовой ткани. Для этого морфологические изменения по сравнению с нормальной структурой голосовой связки были разбиты на 11 морфологических признаков: площадь рубца, гипертрофия эпителия, дистрофия эпителия, атрофия эпителия, эластические волокна, плотность и нерегулярность архитектоники коллагеновых волокон, уменьшение клеточности фибробластов, инфильтрация и фиброзирование мышечной ткани, васкуляризация.

Каждый морфологический признак оценивался по 4-х балльной системе: 0 – отсутствие морфологических изменений по сравнению с нормой; 1 – слабые изменения признаков; 2 – умеренные изменения признаков; 3- выраженные изменения признаков; 4 – максимальные изменения признаков для данного исследования.

Морфометрическое исследование толщины рубцов в обеих частях исследования и толщины собственной пластинки в группах чистого контроля проведено с помощью программного обеспечения Leica application suite version 4.9.0. Толщина рубца и собственной пластинки в случае интактной голосовой складки оценивалась в 5-15 участках, расположенных на расстоянии 400 микрометров друг от друга на протяжении всего изучаемого образца. Измерения проводились параллельно друг другу от глубокого края эпителиального пласта до края мышечной ткани.

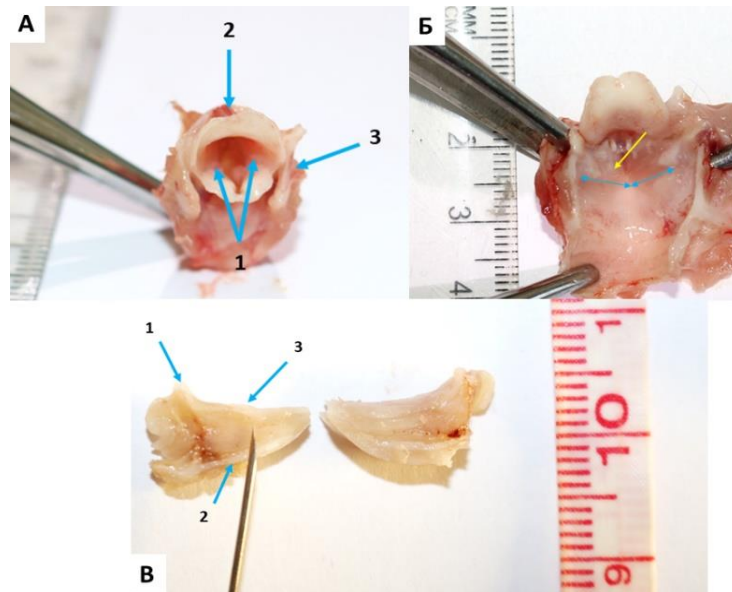


Рисунок – 15. Фотографии макропрепаратов гортани кролика при диссекции: А – вид сверху 1 – голосовые складки; 2 – надгортанник; 3 – щитовидный хрящ; Б – тот же препарат, что на Рисунке А, после рассечения по задней срединной линии (голубыми стрелками показана длина и направление голосовых складок, жёлтой - рубцовые изменения левой голосовой складки); В – выделенные препараты голосовых складок: 1 – черпаловидный хрящ левой голосовой складки; 2 – щитовидный хрящ; 3 – область рубца

Иммуногистохимическое исследование коллагенов I и III типов в препаратах голосовых складок контрольных и экспериментальных групп. Данное исследование проводилось в части работы, где применялись аутологичные МСК костного мозга кроликов. Для иммуногистохимического исследования парафиновые срезы препаратов голосовых складок (см. раздел 2.4.2.) толщиной 4 микрометра депарафинизировали и регидратировали: срезы инкубировали в 3% H_2O_2 в течение 10 минут, и проводилась тепловая демаскировка антигенов. Для предотвращения фонового окрашивания применялся Background Block (Cell Marque, США). В качестве первичных антител использовались моноклональные мышинные антитела к коллагену типа I

(GTX26308, GeneTex, США) и к коллагену типа III (cat 251736, Abbiotec, США). В качестве вторичного антитела применяли поликлональные козы антитела, конъюгированное с пероксидазой хрена (Thermo Fisher Scientific, США). Срезы окрашивались диаминобензидином (ДАБ); (Thermo Fisher Scientific, США) и гематоксилином.

Гистологические препараты изучал патологоанатом. Для количественной оценки содержания коллагена были сняты участки рубца и собственной пластинки на увеличении 400×. Гистоморфометрический анализ проводился в программе CellProfiler версии 3.0.0. на фотографиях оценивались интенсивность окрашивания коллагена типов I и III (функция MeasureImageIntensity) и общая площадь ткани (функция MeasureImageAreaOccupied), определяемая по окраске гематоксилином. Результаты были представлены как отношение интенсивности окрашивания ДАБ к площади окраски гематоксилином, умноженное на 100% (относительное содержание коллагена).

2.3.4. Метод атомно-силовой микроскопии

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) проводилось в части работы, где использовались аутологичные МСК костного мозга кроликов. Исследование голосовых складок на атомно-силовом микроскопе осуществлялось параллельно с морфологическим исследованием. Поперечные сечения толщиной 17-19 мкм были получены из парафиновых блоков. После депарафинизации проводилась маркировка непокрытых препаратов с использованием светодиодного микроскопа Leica DM 4000 В и камеры DFC 7000. Таким образом, 9 гистологических препаратов (3 препарата из каждой группы) были отобраны для исследования методом АСМ.

АСМ-изображения фиксированных срезов тканей на предметных стеклах были получены в воздушной среде в режиме количественного наномеханического картирования PeakForce (PeakForce QNM®) с использованием атомно-силового микроскопа MultiMode 8 с контроллером Nanoscope V и E-сканером (Bruker, США); (Рисунок 16)



Рисунок – 16. Атомно-силовой микроскоп, использованный в исследовании

Области, представляющие интерес для АСМ сканирования, были выбраны на основе гистологического исследования в соответствии с видом образца в оптическом микроскопе, комбинированным с АСМ. Было получено не менее 5 изображений из разных областей каждого среза. Получение изображений АСМ проводилось с помощью зондов RТЕСРА-300 (Bruker) с номинальной жесткостью 40 Н/м, номинальной резонансной частотой 300 кГц и номинальным радиусом острия 8 нм. Инструментальную постоянную кантилевера измеряли по сапфировому стандарту (Bruker). Реальную жесткость кантилевера получали на основе спектра тепловых шумов. Оценка радиуса острия выполнялась относительным методом с использованием полистирольного стандарта (Bruker).

В обычном эксперименте, изображения 7×7 мкм получали при частоте сканирования 1 Гц и разрешении 512×512 пикселей. Одновременно записывались каналы топографии, сигнала ошибки обратной связи (сигнала рассогласования) и модуля Юнга (вычисленного по модели Герца). Топография образцов представлена с использованием канала сигнала ошибки обратной связи (Peak Force Error) для лучшего разрешения деталей. Модули Юнга были усреднены по 5 изображениям для каждого из 9 образцов. Необработанные АСМ-изображения обрабатывали с использованием программного обеспечения Nanoscope Analysis v.1.10 (Bruker).

2.3.5. Метод оценки механических характеристик голосовых складок методом наноиндентирования в жидкой среде

Данный способ определения механических свойств использовался в части работы, посвященной применению МСК костного мозга человека. Для определения локальных механических характеристик (модуль Юнга) образцов ГС кроликов, использовался наноиндентор Chiaro (Optics11, Netherlands); (Рисунок 17). Для проведения индентации был использован зонд с кантилевером прочностью 0,05 Н/м и радиусом скругления наконечника 9,5 мкм. Индентирование проводилось в среде натрий-фосфатного буферного раствора при комнатной температуре, непосредственно сразу после вывода животного из эксперимента и диссекции гортани. Образцы иммобилизовались на дне чашки Петри при помощи зажимов (Рисунок 17).

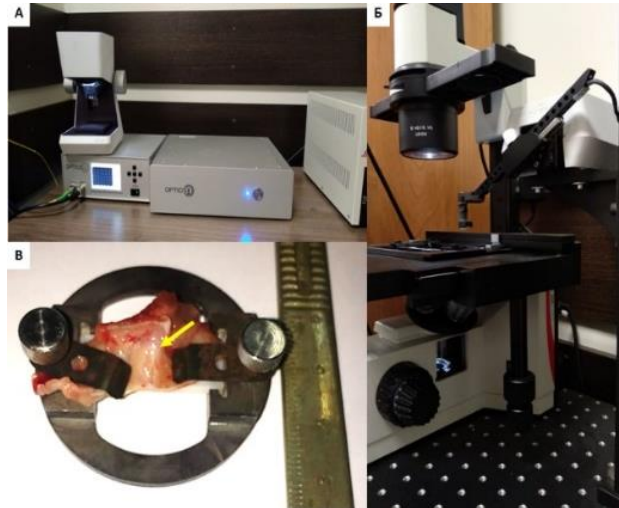


Рисунок – 17. Фотографии оборудования для проведения индентирования (А, Б); В – подготовленный образец для проведения исследования (область индентирования голосовой складки указана стрелкой)

Во время индентаций наконечник, кантелевер и подведённое к нему оптоволокно всегда находились в среде на достаточной глубине для предотвращения ошибок из-за сил поверхностного натяжения на границе раздела воздух-вода. Были исследованы от 4 до 6 образцов ГС из каждой экспериментальной группы (1-4). Дополнительно были измерены 6 образцов интактных ГС, в качестве группы чистого контроля. Площадь, на которой проводилось определение модуля Юнга составляла 1000×1000 мкм с шагом по осям X и Y – 100 мкм.

По полученным кривым "сила-смещение" при помощи программного обеспечения Optics11 Dataviewer, с использованием модели Герца соприкосновения круглого тела с плоской поверхностью, рассчитывали значение модуля Юнга. По полученным данным были определены эффективные модули Юнга (среднее значение \pm стандартное отклонение, кПа) образцов. После завершения исследования образцы разрезались и помещались в формалин для последующего морфологического исследования.

2.3.6. Метод исследования вибрационной динамики тканей голосовых складок

Исследование вибрационной активности ГС проводилось в части работы, посвященной применению МСК костного мозга человека, на специально созданной экспериментальной установке, схема которой показана на Рисунке 18. Установка состоит из макропрепарата гортани и трахеи кролика, установленной в силиконовом коническом держателе – фиксаторе, волоконно-оптического зонда для съёма вибрационных сигналов и электрического микрофона для регистрации звуковых сигналов, производимых ГС, оптоэлектронного лазерного блока с вспомогательным красным лазером для визуализации пятна лазерного зондирования, двухканальной звуковой карты с аналого-цифровым преобразователем (АЦП) для записи сигналов в реальном времени в персональный компьютер со специальным программным обеспечением с функцией быстрого преобразования Фурье для индикации мгновенных амплитудно-частотных характеристик (АЧХ) при записи или в выбранной точке записи при последующей обработке сигналов. Установка представляет собой высокочувствительный виброметр с лазерным волоконно-оптическим зондом на конце одномодового волокна с керамическим ФС-наконечником с плоским торцом. Чувствительным элементом установки является низкодобротный интерферометр Фабри-Перо, образуемый плоским торцом волоконного наконечника с 4% Френелевским отражением и первой границей вибрирующей поверхности ГС, покрытой увлажнённой слизистой оболочкой.

Для исследования вибрационной динамики ГС была организована система нагнетания и выпуска воздуха через выделенный препарат гортани и трахеи кролика. Система включает в себя резервуар воздуха в виде резинового шара объемом до 10 литров, нагнетательного ручного насоса, манометра давления и клапана выпуска воздуха. Измеряли вибрации ГС при пропускании воздуха от максимального давления 50 – 60 мм.рт.ст. до нуля. Режим стравливания воздуха

до малых и нулевых значений давления был методически важен, так как имитировал как прохождение воздуха под напором, так и на выдохе. Особенность работы состояла в одновременной записи вибраций ГС волоконно-оптическим зондом и вспомогательным электрическим микрофоном, установленным вдоль оси трахеи с ГС на некотором удалении (~ 10 см) от них, и сопоставлении полученных сигналов. Положение точки оптического зондирования образца варьировали с помощью трехкоординатного столика x-y-z для механических перемещений.

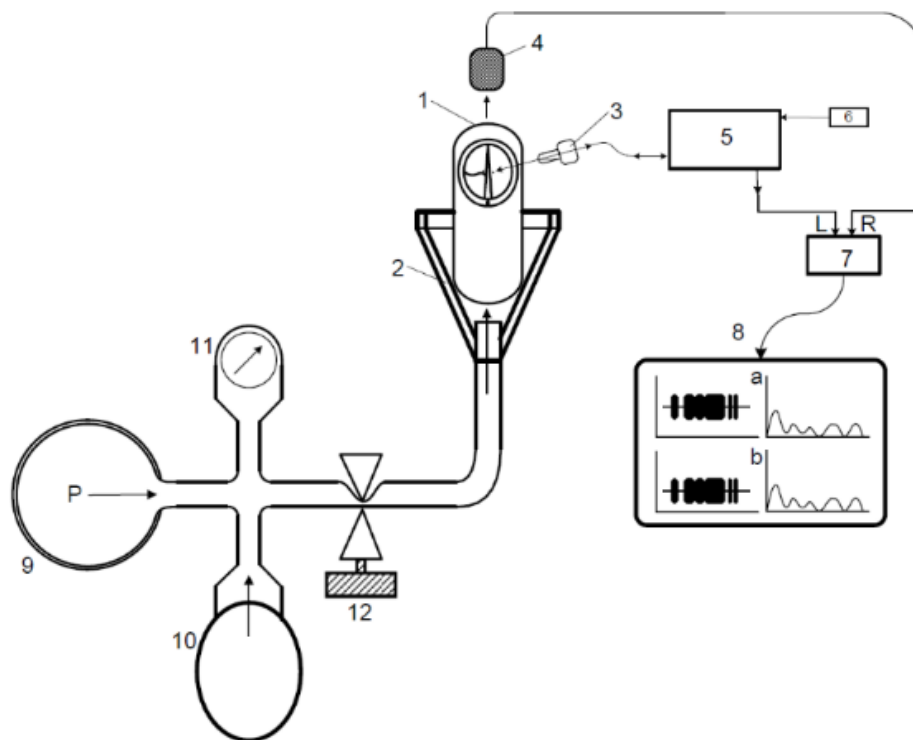


Рисунок – 18. Схема экспериментальной установки для исследования вибрационной активности ГС лазерным волоконно-оптическим зондом и записи сигнала производимого ими звука в персональный компьютер: 1 - препарат гортани и трахеи кролика; 2 – держатель; 3 - волоконно-оптический зонд; 4 – микрофон; 5 - оптоэлектронный лазерный блок; 6 - вспомогательный красный лазер; 7 - двухканальная звуковая карта; 8 – персональный компьютер.

Оптоэлектронный блок установки содержит малошумящий стабилизированный одночастотный полупроводниковый лазер непрерывного режима работы на длине волны 1550 нм с внешним резонатором на волоконной Брэгговской решетке (ВБР) типа BDL-1550-14DL-20 (фирма HOЛАТЕХ, Россия) с шириной спектральной линии генерации $\Delta\nu \leq 0,1$ МГц. Длина когерентности излучения лазера составляет сотни метров и степень когерентности излучения для длин резонатора интерферометра Фабри Перо $x \sim 1$ мм с высокой точностью равняется единице ($\gamma = 1$). Лазер питается стабилизированным током инжекции и корпус лазера стабилизирован по температуре с точностью $\sim 0,001$ °С. В качестве детектора обратно отраженного сигнала с наконечника волоконно-оптического зонда использовали малошумящий фотоприемник (ФП) с регулируемым усилением типа PDA10CS (Thorlabs) с рабочим диапазоном длин волн 700 – 1800 нм и рабочей полосой частот до 500 кГц.

В составе блока 5 в качестве оптического мультиплексора, выполняющего роль устройства ввода/вывода излучения из волоконно-оптического зонда 3, применен направленный разветвитель 1:3 на одномодовых оптических волокнах типа SMF28. На третий волоконный вход мультиплексора может подаваться излучение от вспомогательного полупроводникового лазера 6 на красной рабочей длине волны 0,63 мкм для визуализации места зондирования на ГС одновременно с основным измерительным излучением одночастотного лазера на 1550 нм (не видимое для глаз и безопасное для человека, так как его мощность не превосходила 0,6 мВт.) Диапазон регистрируемых частот вибраций составлял ~ 50 Гц - 20 кГц.

В данную часть исследования включены результаты исследования 4-х образцов гортаней, 2-х из 4-й экспериментальной группы (рубцы без лечения) и 2-х из 2-й экспериментальной группы (рубцы, после имплантации комплекса МСК и ПЭГ-фибринового геля). Вибрационные характеристики ГС с рубцовым дефектом без лечения и после клеточной терапии сравнивались с вибрационными паттернами интактных ГС противоположной стороны для каждой пары.

2.4. Методы статистической обработки

При сравнительной оценке интенсивности интраоперационного кровотечения и длительности операций при имплантации клеточных продуктов: суспензии МСК в фосфатно-солевом буферном (ФСБ) растворе и комплекса МСК с ПЭГ – фибриновым гелем, распределение данных оценивалось с помощью критерия Шапиро-Уилка. Ввиду распределения данных, отличавшегося от нормального, статистический анализ результатов проводился с помощью непараметрического однофакторного критерия Краскела-Уоллиса (для оценки межгрупповых различий в целом) и критерия суммы рангов Уилкоксона (для поиска различий между группами по отдельности). Для расчетов использовалось программное обеспечение R (версия 3.6.1), для визуализации результатов использовалась библиотека ggplot2. Поправка на множественное сравнение проводилась с помощью метода Бенджамини-Хохберга (false discovery rate).

Распределение полученных данных при оценке дыхательных нарушений в раннем послеоперационном периоде и восстановления активности и питания животного на 1-е сутки после операции после имплантации клеточных продуктов: суспензии МСК в фосфатно-солевом буферном (ФСБ) растворе и комплекса МСК с ПЭГ – фибриновым гелем - оценивалось с помощью критерия Шапиро-Уилка. Ввиду распределения данных, отличавшегося от нормального, статистический анализ результатов сравнения интенсивности, длительности стридора и ЧДД проводился с помощью непараметрического однофакторного критерия Краскела-Уоллиса (для оценки межгрупповых различий в целом) и критерия суммы рангов Уилкоксона (для поиска различий между группами по отдельности). Поправка на множественное сравнение проводилась с помощью метода Бенджамини-Хохберга (false discovery rate). Различия восстановления питания и активности животных оценены с помощью точного теста Фишера. Для расчетов также использовалось программное обеспечение R (версия 3.6.1). Для визуализации результатов использовалась библиотека ggplot2.

Для расчёта значимости различий в возможности визуально и тактильно определить рубец голосовой складки в зависимости от параметров наносимого дефекта использовался точный критерий Фишера.

Статистический анализ количественных данных (толщина рубца/собственной пластинки голосовой складки) морфологического исследования препаратов голосовых складок после клеточной терапии в исследованиях как с аутологичными МСК, так и с МСК человека проводился в программе GraphPad Prism версии 7.00 для Windows (GraphPad Software, Inc.). Нормальное распределение данных (толщина ткани) оценивалась при помощи теста Шапиро-Уилка. Межгрупповые различия оценивались при помощи дисперсионного анализа ANOVA и критерия Тьюки. Уровень статистической значимости был принят $p < 0,05$.

В эксперименте с аутологичными МСК полуколичественный анализ (балльная шкала) данных морфологического исследования препаратов голосовых складок после клеточной терапии проводился при помощи языка программирования R версии 3.6.1. в программе R medium studio версии 1.0.153. Для поиска значимых различий морфологических параметров использовался критерий суммы рангов Уилкоксона. С помощью последнего критерия были проанализированы 11 морфологических критериев, а также их сумма, поправка на множественное сравнение проводилась методом Бенджамини-Хохберга (false discovery rate). Уровень статистической значимости был принят при $p < 0,1$.

В эксперименте с МСК человека расчёты значимых различий при балльной оценки морфологических параметров (полуколичественный анализа) проводились в программе GraphPad Prism версии 7.00 для Windows (GraphPad Software, Inc.). Для поиска различий был использован критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна, с помощью этого критерия попарно были проанализированы 11 морфологических критериев между экспериментальными группами 1-4. Уровень статистической значимости был принят $p < 0,05$. Поправка на множественное сравнение проводилась с помощью метода Бенджамини-Хохберга (false discovery rate).

Статистический анализ данных иммуногистохимического исследования коллагена I и III типов препаратов голосовых складок в контрольной и экспериментальных группах исследования с аутологичными МСК проводился в программе GraphPad Prism версии 7.00 для Windows (GraphPad Software, Inc.). Нормальное распределение количественных данных (относительное содержание коллагена типа I, относительное содержание коллагена типа III) проверялось тестом на нормальность Шапиро-Уилка. Межгрупповые различия оценивались при помощи двухфакторного дисперсионного анализа с post-hoc тестом Сидака для межгрупповых различий. Результаты были представлены в виде столбиковых графиков средних значений и стандартных отклонений. Межгрупповое соотношение содержания коллагена I типа к содержанию коллагена III типа были оценены и представлены как отношения средних значений групп со стандартными ошибками. Уровень статистической значимости был принят при $p < 0,05$.

В части исследования, посвященному использованию аутологичных МСК статистическое сравнение толщины фибрилл коллагеновых волокон, по данным атомно-силовой микроскопии между экспериментальными группами 1 и 2 и группой чистого контроля (интактных голосовых складок) проводили с помощью критерия Стьюдента по усредненным данным 5 изображений для каждого из 9 образцов. Также критерий Стьюдента использовался для сравнения значений Модуля Юнга между этими же группами. В обоих исследованиях при оценке статистической значимости результатов применялась поправка на множественное сравнение.

Статистические исследования механических характеристик голосовых складок методом наноидентификации в жидкой среде были проведены с использованием программы Statsoft Statistica 64. Было проведено определение нормальности распределения полученных данных модуля Юнга в группах по критерию Колмогорова-Смирнова и оценка однородности дисперсии с помощью теста Левена. В связи с ненормальностью большей части распределений в группах и неоднородностью дисперсии внутри нормальных групп, для определения

статистической значимости различий между экспериментальными данными использовался критерий Манна-Уитни. Порог статистической значимости принят за $p \leq 0,05$. Данные представлены в виде таблицы, также для наглядной оценки и сравнения были построены box-plot графики.

Глава 3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ:
УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ С
ОЦЕНКОЙ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ
МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА
ЧЕЛОВЕКА И ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЬ-ФИБРИНОВОГО ГЕЛЯ

3.1. Результаты усовершенствования экспериментальной модели
рубцового процесса голосовых складок кролика

Использование лабораторных кроликов в качестве животных для экспериментальной модели рубцового процесса голосового отдела гортани требовало адекватной визуализации голосовых складок. В данной работе был использован эндоларингеальный доступ, а именно прямая ларингоскопия. Было изучено несколько способов визуализации и подвода инструментов к голосовым складкам. Использование неонатологического клинка для подскладкового пространства диаметром 4,7 мм (см. Рисунок 6 в гл. 2.2.1) оказалось невозможным из-за слишком узкого канала для осуществления инструментальных манипуляций на структурах гортани животного при одновременной визуализации с помощью ригидного эндоскопа диаметром как 4,0 мм, так и 2,7 мм, а использование ларингоскопического клинка большего диаметра не подходило из-за несоответствия относительно малым размерам ротоглотки животных (не более 1,5 - 2 см) и наличием выраженных передних резцов, характерных для зайцеобразных. Попытка визуализации с помощью микроскопа ZEISS OPMI pico также не была удовлетворительна из-за сложностей в настройке фокусного расстояния на структуры гортани, а именно ввиду размеров животного, объектив микроскопа располагался слишком далеко, что технически не позволяло проводить точные манипуляции на голосовых складках. Успешным было применение модифицированного трахеоскопа, который был укорочен до 14 см, конец заужен и расположен под углом 45° книзу, таким образом для дистального

края была достигнута форма эллипса диаметром 1,3 x 0,8 см. Верхняя часть канала трахеоскопа была также удалена на половину окружности от начала инструмента на 9,5 см, что облегчало подведение инструментов. (см. Рисунок 6 в гл. 2.2.1). Так же успешным и удобным для манипуляций было использование прямой ларингоскопии с помощью неонатологического клинка для оротрахеальной интубации по Miller C № 1, длиной 10см. Плоская и прямая пластина клинка позволяла сбоку от передних резцов быстро провести инструмент до гортаноглотки с последующим относительно небольшим разгибом шеи и смещением кпереди надгортанника, что открывало хороший обзор голосовых складок, не мешая прохождению эндоскопа и инструментов ниже пластины клинка. Дополнительное подкладывание валика под спину животного требовалось в редких случаях при нехватке угла разгиба шеи с помощью клинка. После визуализации голосового отдела гортани рукоятка ларингоскопа передавалась ассистенту, для возможности бимануальных действий основного экспериментатора. При отработке создания модельного дефекта голосовых складок кролика были изучены возможности использования нескольких видов чашеобразных микрощипцов, различающихся длиной и наклоном захватывающего окончания инструмента: прямые щипцы длиной 27 см, загнутые влево щипцы длиной 27 см, загнутые на 45° вверх щипцы длиной 18 см и загнутые влево щипцы длиной 18 см, во всех инструментах диаметр захватывающей поверхности был 2 мм. Микрощипцы длиной 27 см, как прямые, так и загнутые влево оказались малопригодными для проведения манипуляций ввиду несоответствия длины рабочей части и длины эндоскопа как 18 см, так и 11 см из-за пересечения положения эндоскопической камеры и рукоятки инструмента. Эндоларингеальные микрощипцы длиной 18 см, используемые в педиатрической хирургической практике оказались наиболее удобным и безопасным инструментом, так как рукоятка инструмента находилась ближе к животному чем эндоскопическая камера, что позволяло свободно проводить манипуляции без снижения качества визуализации.

В качестве основного критерия адекватности используемой экспериментальной модели хронической рубцовой патологии голосовых складок на лабораторных животным - была возможность визуально и тактильно определить область рубцового дефекта при прямой ларингоскопии для её последующей эксцизии через 3 месяца создания дефекта. 1-й тип дефекта - однократное выкусывание участка голосовой складки в области средней трети, оказалось недостаточным, при контрольной ларингоскопии через 3 месяца - рубец практически не визуализировался, также было затруднено определение его границ при касании щипцами, соответственно выполнить его локальную резекцию оказывалось невозможным (Рисунок 19,20). Дефект большего размера – 2-го типа (удаление слизистой оболочки и II-III слоёв собственной пластинки на протяжении 1/3 голосовой складки с отступом 3 мм от передней комиссуры) во всех случаях приводил к формированию объёмного рубца, который легко идентифицировался при осмотре как визуально, так и при дотрагивании щипцами за счёт большей плотности по сравнению с окружающими тканями. Это позволяло выполнить его резекцию и тем самым создать вторичную рану голосовой складки для имплантации клеточного продукта (Рисунок 19, 20). Различия в возможности определить границы рубцового дефекта имели статистически значимые различия между группами при оценке с помощью точного критерия Фишера ($p < 0,05$).

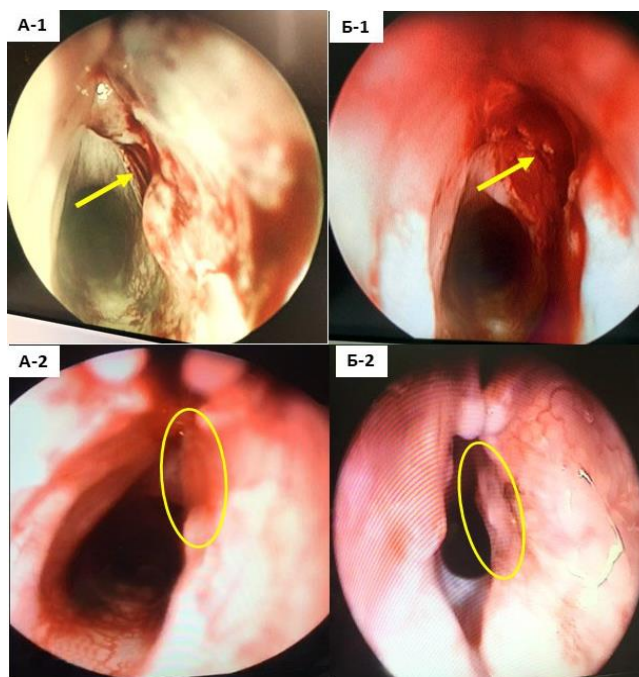


Рисунок – 19. Панель эндофотографий, демонстрирующая модельный дефект(стрелки) голосовых складок кролика и соответствующие ему изменения через 3 месяца (желтые эллипсы): А-1 – дефект 1-го типа (однократное выкусывание) левой голосовой складки; А-2 – отсутствие четких границ рубцовых изменений на том же месте; Б-1 – дефект 2-го типа (удаление слизистой оболочки и поверхностных слоёв щито-черпаловидной мышцы на протяжении 1/3) левой голосовой складки; Б-2 – чётко визуализируются рубцовые изменения левой голосовой складки

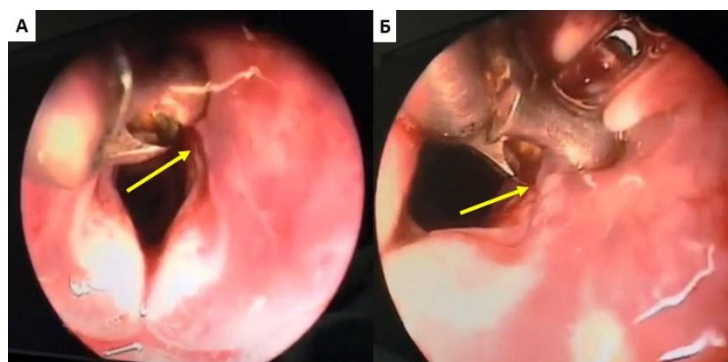


Рисунок – 20. Эндофотографии, демонстрирующие идентификацию рубцовой ткани (показано стрелками), развившуюся на месте послеоперационного дефекта голосовой складки: А - рубец на месте дефекта 1-го типа при

надавливании микрощипцами идентифицировать не удаётся; Б – хорошо идентифицирующийся рубец на месте дефект 2-го типа за счёт большей плотности по отношению к окружающим тканям

Таким способом были выполнены операции у всех животных экспериментальных и контрольных групп исследования (42 кролика). При этом следует отметить, что несмотря на большую кровоточивость операционной раны при таком подходе, в ходе выполнения работы не было ни одного случая гибели животных во время вмешательства вследствие аспирации кровью или в послеоперационном периоде. Также дефект 2-го типа не приводил как к существенному отеку окружающих дефект тканей во время и после операции, так и к формированию рубцовых мембран голосового отдела в отдаленном периоде наблюдения.

3.2. Оценка возможности применения клеточных продуктов на основе МСК человека и ПЭГ-фибринового геля при восстановлении голосовых складок в эксперименте *in vivo*

3.2.1. Результаты морфологического исследования ПЭГ-фибринового геля при подкожном введении малым лабораторным животным на ранних сроках

Через 3 и 7 дней после имплантации ПЭГ-фибриновый гель был обнаружен в месте имплантации (подкожно). Визуально в окружающих тканях отсутствовали реактивные явления, скопление геморрагических сгустков, экссудата или гноя. На обоих сроках имплант представлял собой единый полупрозрачный массив с чёткими контурами мягко-эластической консистенции, в обеих группах его размер существенно не отличался (Рисунок 21).

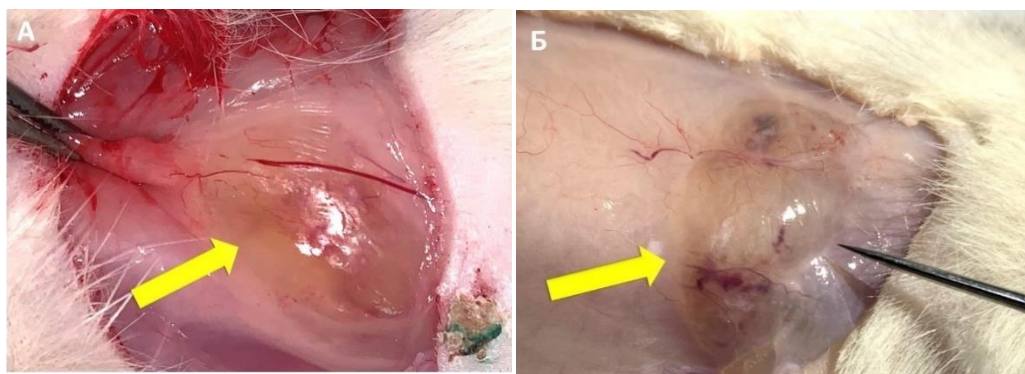


Рисунок – 21. А – макропрепарат ПЭГ-фибринового геля с окружающими тканями через 3 дня после имплантации; Б – макропрепарат ПЭГ-фибринового геля с окружающими тканями через 7 дней после имплантации (жёлтой стрелкой показан имплант)

При гистологическом исследовании препаратов - через 3-е суток: имплантат ПЭГ-фибринового геля после введения окружен жировой клетчаткой, за которой формируется тонкая соединительно-тканная капсула. При окраске гематоксилин-эозином ткань имплантата эозинофильная, плотная, с небольшими щелевидными образованиями, клетки в трансплантате полностью отсутствуют (Рисунок 22). Только на большом увеличении видно, что ткань состоит из нечетко окрашенных волокнистых структур и на поверхности видны очень немногочисленные макрофаги и лимфоциты. Следует отметить, что в тканях имплантата обнаруживаются крупные очаги – скопления эритроцитов (Рисунок 22).

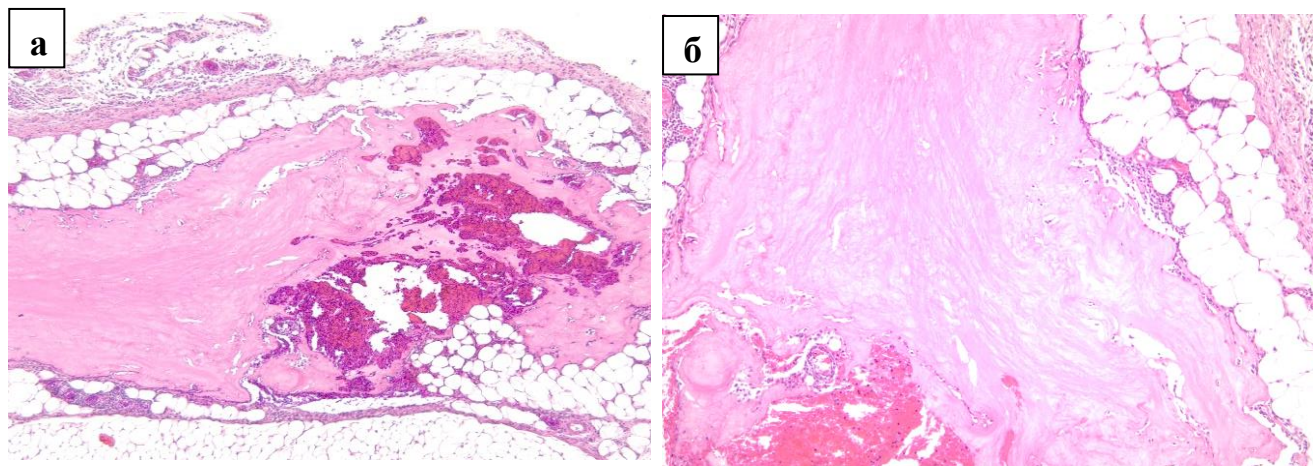


Рисунок – 22. Световая микроскопия гистологического препарата имплантата ПЭГ-фибринового геля через 3-е суток после введения, окраска гематоксилин-эозин; а – увеличение x 50; б – увеличение x 100

При фазово-контрастной микроскопии в ткани обнаруживаются многочисленные плотно расположенные тонкие волокна, соответствующие волокнам фибрина. Местами волокна расположены беспорядочно, в ряде участков имеется определенная упорядоченность: относительно толстые образования, состоящие из плотно-сплетенных волокон, между ними волокна расположены беспорядочно (Рисунок 23). В других препаратах структура имплантата отличается мало, но здесь преобладают продольно вытянутые фибриновые волокна (Рисунок 23).

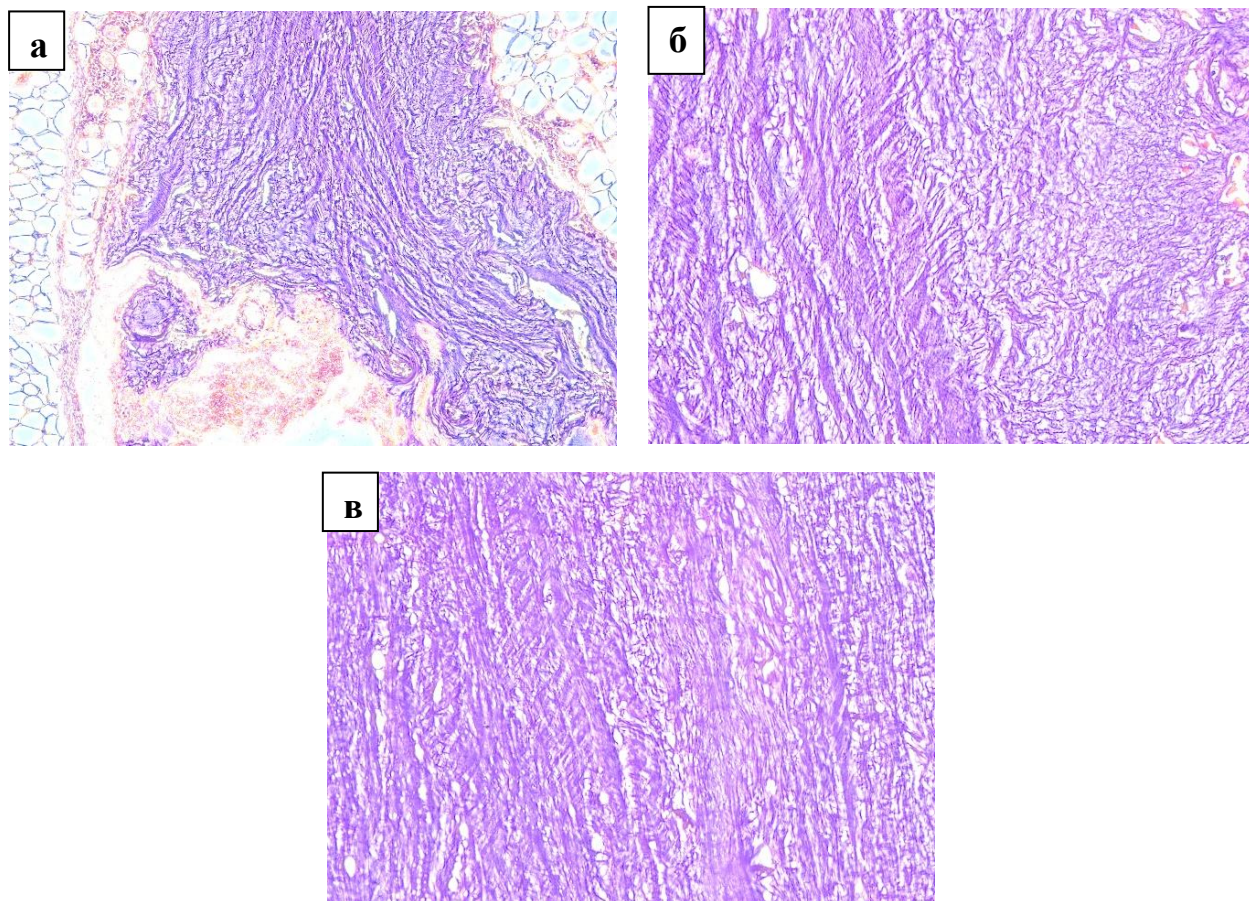


Рисунок - 23. Фазово-контрастная микроскопия гистологического препарата имплантата через 3-е суток после введения ПЭГ-фибринового геля; окраска

гематоксилин-эозин; а – увеличение x 100; б – увеличение x 400; в - увеличение x 400, на данном участке визуализируется преобладание продольно вытянутых фибриновых волокон

На 7-е сутки после операции имплантат ПЭГ-фибринового геля сохраняет, в основном, свою целостную структуру. В одних участках основой является бесклеточная фибриновая масса и только с обеих сторон имплантата отмечаются изменения: они выражаются в том, что в краевых зонах имплантат разделяется на тяжи, которые отделены друг от друга скоплением клеточных элементов: макрофагов, лимфоцитов и фибробластов. На краях этих тяжей идет макрофагальная резорбция, однако степень ее по-прежнему низкая (Рисунок 24).

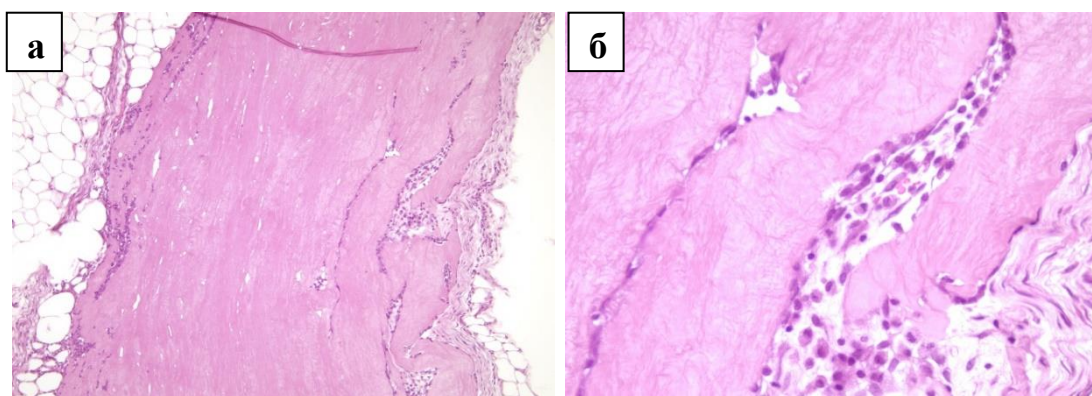


Рисунок – 24. Световая микроскопия гистологического препарата имплантата через 7 суток после введения ПЭГ-фибринового геля; окраска гематоксилин-эозин. а – увеличение x 100; б – увеличение x 400

Следует отметить, что в имплантат врастают тонкостенные капилляры. По-прежнему, внутри имплантата клеточные элементы практически отсутствуют. Коллагеновые волокна в участках врастания в имплантат клеточных тяжей также практически отсутствуют (Рисунок 25).

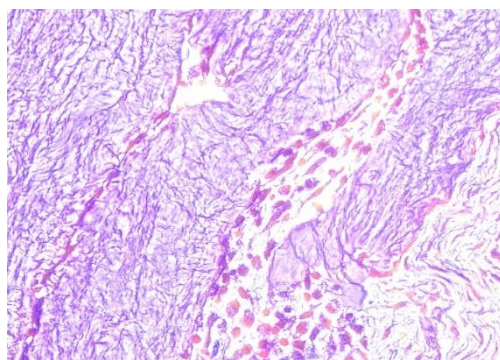


Рисунок – 25. Фазово-контрастная микроскопия гистологического препарата имплантата через 7 суток после введения ПЭГ-фибринового геля, окраска гематоксилин-эозин, увеличение x 400

В других участках отмечаются сравнительно широкие тяжи более зрелой (грануляционной) соединительной ткани, врастающие в имплантат. Они состоят из фибробластов, макрофагов и лимфоцитов с примесью единичных нейтрофилов (Рисунок 26). При фазово-контрастной микроскопии отмечается относительно большое количество тонких коллагеновых волокон, что свидетельствует о созревании ткани (Рисунок 26). В этих участках также отмечается врастание в матрикс сосудов. Кроме того в матриксе видны отдельные клеточные элементы - в основном макрофаги, хотя заметной резорбции еще не отмечается. При фазово-контрастной микроскопии ткань имплантата имеет волокнистую структуру, но она более рыхлая, чем на 3-и сутки после операции (Рисунок 26).

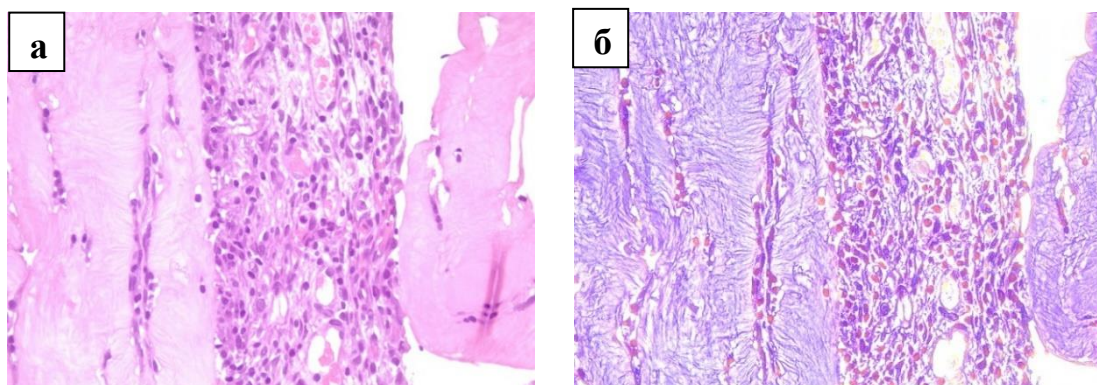


Рисунок – 26. Световая микроскопия гистологического препарата имплантата ПЭГ-фибринового геля через 7 суток после введения, окраска

гематоксилин-эозин, увеличение $\times 400$ (А); определяется сравнительно широкий тяж грануляционной соединительной ткани, врастающий в имплантат; Б – тот же участок при фазово-контрастной микроскопии, увеличение $\times 400$

Таким образом, на 3-и сутки после операции, имплантат сохраняет целостную структуру, окружен жировой тканью и тонкой капсулой, при фазово-контрастной микроскопии отчетливо видно, что ткань имплантата состоит из беспорядочных, но местами организованных тонких волокон, в настоящем случае – фибриновых. Следует отметить, что клетки в ткани имплантата не обнаруживаются, только скопления эритроцитов. Показательно, что на этом сроке практически нет воспалительной реакции вокруг имплантата, только немногочисленные макрофаги и лимфоциты на его краях; практически отсутствует и резорбция (биodeградация) имплантата, что свидетельствует об очень низкой иммунной реакции на имплантацию. Через 7 суток имплантат сохраняет свою целостную структуру, по-прежнему отсутствует воспалительная реакция. Отличием от 3-х суток является врастание в ткань имплантата тонкостенных сосудов, а также тяжелой грануляционной ткани, состоящей из фибробластов, макрофагов, лимфоцитов и многочисленных сосудов. Выявляются в этой ткани и тонкие коллагеновые волокна. Эти соединительно-тканые тяжи, врастая в имплантат разделяют его на отдельные полосы. Однако внутри имплантата клеточные элементы очень немногочисленны, в основном – макрофаги. Заметного лизиса фибрина не обнаруживается. Следует заключить, что до 7-х суток имплантат практически не подвергается биodeградации, а также воспалительной реакции на имплантацию. Все это свидетельствует о том, что материал имплантата в первую неделю практически биоинертен.

3.2.2. Результаты оценки интенсивности интраоперационного кровотечения и длительности операций при имплантации клеточных продуктов суспензии МСК человека в фосфатно-солевом буферном растворе и комплекса МСК с ПЭГ – фибриновым гелем

Сводные данные значений интенсивности интраоперационного кровотечения и времени операции по имплантации для каждого случая в экспериментальных группах 1-4 исследования с МСК человека приведены в Таблице 4.

Группы лечения Параметр		Группа 1 рубцы, леченные МСК в суспензии		Группа 2 рубцы, леченные комплексом ПЭГ-фибринового геля и МСК		Группа 3 рубцы, леченные ПЭГ -фибриновым гидрогелем		Группа 4 рубцы без лечения	
Интенсивность кровотечения (баллы)	Время Операции (мин)	3	15	2	18	1	17	2	16
		1	9	0	17	1	18	4	20
		4	22	2	18	2	21	1	8
		3	14	1	19	0	17	2	10
		2	8	1	18	2	18	3	16
		1	10	2	20	1	16	1	13

Таблица 4. Интенсивность интраоперационного кровотечения и длительность операций по имплантации клеточных продуктов для каждого животного экспериментальных групп 1-4.

При статистической оценке длительности операций при учете всех групп его распределение отличалось от нормального (критерий Шапиро-Уилка, $p=0,035$). При сравнении различий в длительности операций между группами в целом, получены статистически значимые различия $p=0,041$. Между отдельными группами наблюдаются близкие к статистически-значимым различия: при сравнении 1-й группы с группами 2 и 3 по отдельности, в обоих случаях $p=0,097$, а также 4-й группы с группами 2 и 3 по отдельности, в обоих сравнениях $p=0,097$. Графическое изображение распределения времени операций представлено на Рисунке 27.

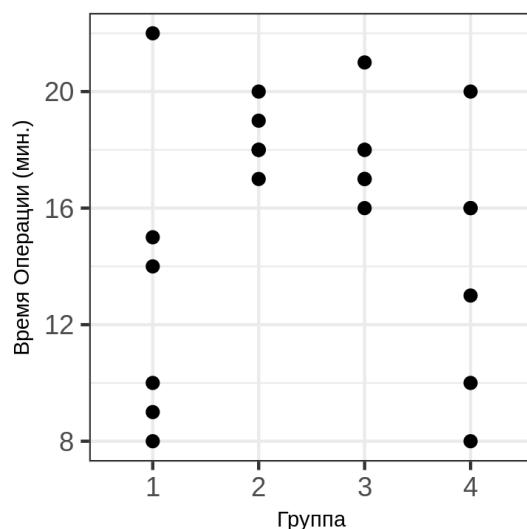


Рисунок – 27. Время операций в экспериментальных группах 1-4: по вертикали приведена временная шкала в минутах, черными точками отражена длительность операции для каждого случая

При сравнении различий интенсивности кровотечения между группами в целом не были найдены статистически-значимые различия, $p=0,2075$. Статистически значимые различия отсутствовали и между отдельными группами, p -value составило от 0,37 до 0,87, графическое распределение параметра интенсивности кровотечения для каждой группы изображено на Рисунке 28. Однако при сравнении значений интенсивности кровотечения объединенной группы 1 и 4 с объединенной группой 2 и 3 (разделение осуществлено исходя из того, что в группах 2 и 3 использовался ПЭГ-фибриновый гидрогель) выявлены статистически значимые различия, $p=0,03945$ при меньшей интенсивности кровотечения в группах имплантации ПЭГ-фибринового геля (группы 2 и 3), заметный тренд в уменьшении интенсивности в этих группах также хорошо определяется визуально на Рисунке 29.

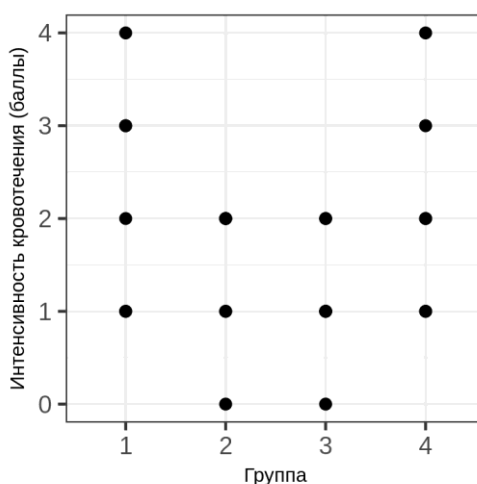


Рисунок – 28. Интенсивность кровотечения в экспериментальных группах 1-4: по вертикали - интенсивность в баллах, черными точками отражена интенсивность кровотечения для каждого случая

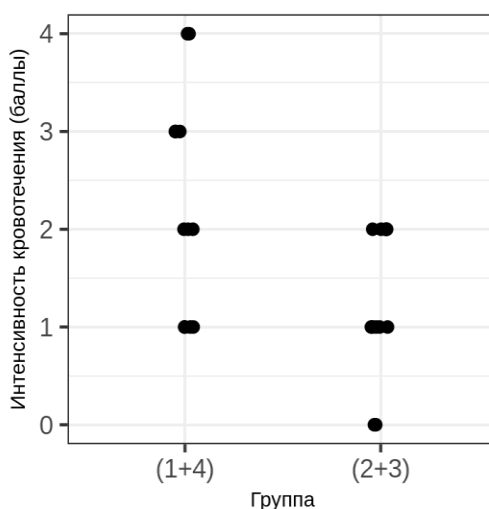


Рисунок – 29. Интенсивность кровотечения в объединенных группах 1 и 4 и группах 2 и 3: по вертикали - интенсивность в баллах, чёрными точками отражена интенсивность кровотечения для каждого случая

Эти результаты говорят о возможном незначительном увеличении длительности в группах 2 и 3, в которых во время операций требовалась подготовка двухкомпонентного препарата, хотя различия не достигали значимого уровня для принятого критерия, в тоже время использование ПЭГ-фибринового геля статистически значимо снижало интенсивность кровотечения во время операции.

3.2.3. Результаты оценки дыхательных нарушений и восстановления активности животных в раннем послеоперационном периоде после имплантации клеточных продуктов суспензии МСК в фосфатно-солевом буферном растворе и комплекса МСК с ПЭГ – фибриновым гелем

Сводные данные интенсивности, длительности стридорозного дыхания и частоты дыхательных движений (ЧДД) у животных экспериментальных групп 1-4 исследования с МСК человека в раннем послеоперационном периоде после проведения имплантаций приведены в Таблице 5.

Таблица – 5 Показатели интенсивности, длительности стридорозного дыхания и частоты дыхательных движений в послеоперационном периоде (после имплантации клеточных продуктов) для каждого животного экспериментальных групп 1-4.

Группы лечения			Группа 1			Группа 2			Группа 3			Группа 4		
			рубцы, леченные МСК в суспензии			рубцы, леченные комплексом ПЭГ-фибринового геля и МСК			рубцы, леченные ПЭГ-фибриновым гидрогелем			рубцы без лечения		
Интенсивность стридорозного дыхания (баллы)	Длительность стридорозного дыхания (часы)	ЧДД (в мин)	1	6	78	1	9	76	1	7	84	1	7	90
			0	-	64	1	6	84	1	8	78	3	10	136
			3	11	146	0	-	68	1	8	78	0	-	58
			2	8	98	0	-	62	0	-	68	1	7	76
			1	7	90	2	8	102	1	7	88	2	7	96
			0	-	54	1	7	78	2	7	70	0	-	54

При учете всех групп длительность стридорозного дыхания и ЧДД распределены ненормально по тесту Шапиро-Уилка ($p=0,0002$ для длительности и $p=0,0057$ для ЧДД). При сравнении интенсивности стридора между группами в целом и между группами по отдельности различия не были статистически значимыми $p = 0,96$ и $p = 1$ соответственно, графическое распределение параметра интенсивности стридора для каждой группы изображено на Рисунке 30. Также нет значимых различий между группами по длительности стридора в целом $p = 0,9497$ и нет значимых различий между отдельными группами $p = 1$

(Рисунок 30). Сравнение ЧДД между группами в целом не выявило значимых различий $p = 0.9593$, они также отсутствовали и при сравнении групп по отдельности, значение p от 0.97 до 1 (Рисунок 30). Следует отметить, что при этом наблюдались явные и статистически значимые различия в длительности стридора и ЧДД при разной интенсивности стридора: $p=0,00038$ и $p=0,00049$ соответственно. Графически хорошо прослеживается тенденция к увеличению длительности стридора и ЧДД при большей интенсивности стридора, что подтверждает валидность используемых подходов (Рисунок 31, 32).

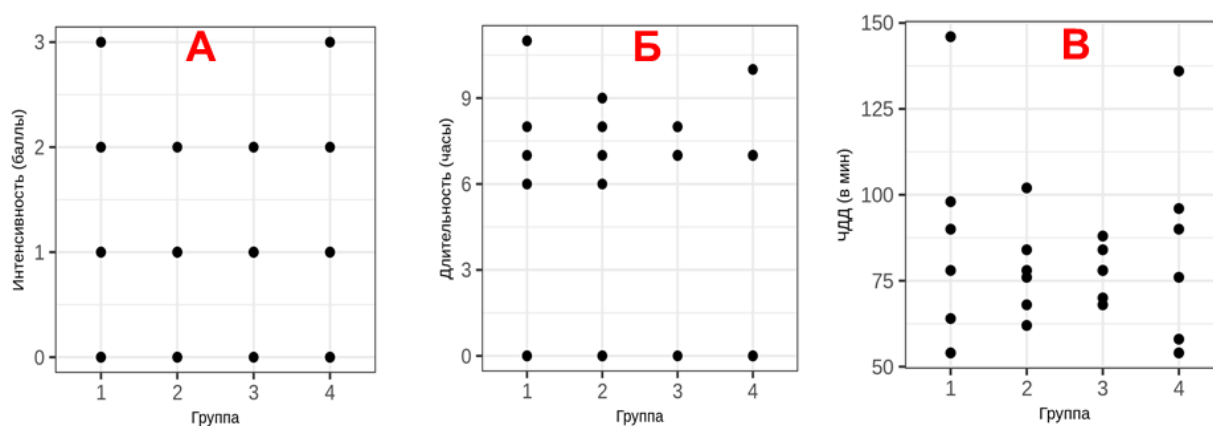


Рисунок - 30. Распределение показателей интенсивности, длительности стридора и частоты дыхательных движений в экспериментальных группах 1-4. А - интенсивность стридора: по вертикали - интенсивность в баллах, черными точками показана интенсивность для каждого случая; Б - длительность стридора: по вертикали - длительность в часах, черными точками отражена длительность стридора для каждого случая; В - показатели частоты дыхательных движений в экспериментальных группах 1-4: по вертикали - частота за 1 минуту, черными точками отражена частота дыхательных движений для каждого случая

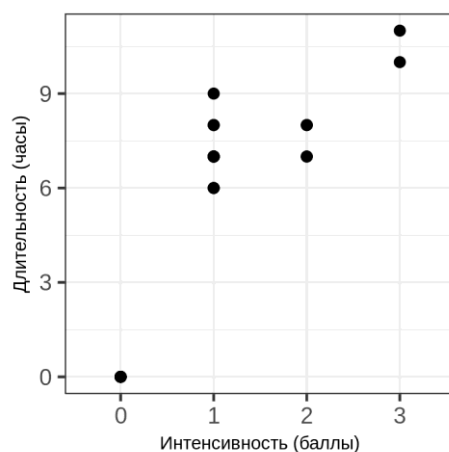


Рисунок – 31. Зависимость длительности стридора от его интенсивности: черными точками показана интенсивность для каждого случая

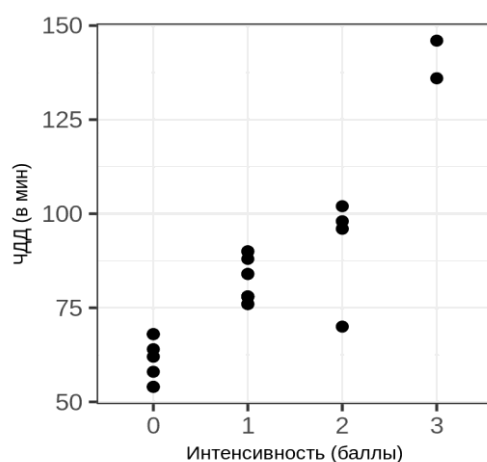


Рисунок – 32. Зависимость частоты дыхательных движений от интенсивности стридора: черными точками отражена интенсивность для каждого случая

Сводные данные восстановления физиологического объема и рациона питания и нормальной активности животного на 1-е сутки после операции имплантации у кроликов экспериментальных групп 1-4 исследования с МСК человека приведены в Таблице 6.

Таблица - 6. Восстановление привычного объема и рациона питания, нормальной активности каждого животного экспериментальных групп 1-4 на 1-е сутки после имплантации клеточных продуктов: «+» -восстановление есть, «-» восстановления нет.

Группы	Группа 1 кролики после имплантации МСК в суспензии	Группа 2 кролики после имплантации комплекса ПЭГ- фибринового геля и МСК	Группа 3 кролики после имплантации ПЭГ-фибринового геля	Группа 4 кролики после введения физиологического раствора
	+	-	+	+
	+	+	+	+
	+	+	+	+
	-	-	+	+
	-	+	-	-
	+	+	+	+

Сравнение параметра точным тестом Фишера не выявило значимых различий между группами, $p = 0.5671$.

Таким образом, по данным исследованных параметров не выявлено зависимости показателей интенсивности, длительности стридорозного дыхания и ЧДД от типа имплантируемого продукта. Также использование ПЭГ-фибринового геля с и без МСК, суспензии МСК, либо физиологического раствора не влияло на восстановление питания и активности животных на 1-е сутки после операции.

3.2.4. Локализация и распределение МСК костного мозга человека, введенных в голосовые складки в виде суспензии и комплексе с ПЭГ-фибриновым гелем

При анализе микропрепаратов с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа выявлено, что через 3 дня клетки присутствовали в месте имплантации. Клетки обнаружены только в тканях, непосредственно окружающих дефект голосовой складки. Однако при использовании МСК в

составе с ПЭГ-фибриновом гидрогелем отмечалась более высокая концентрация клеток (интенсивная зеленая флуоресценция) в месте введения (при изучении до 10 полей зрения) и их миграция в щито-черпаловидную мышцу (Рисунок 33, справа).

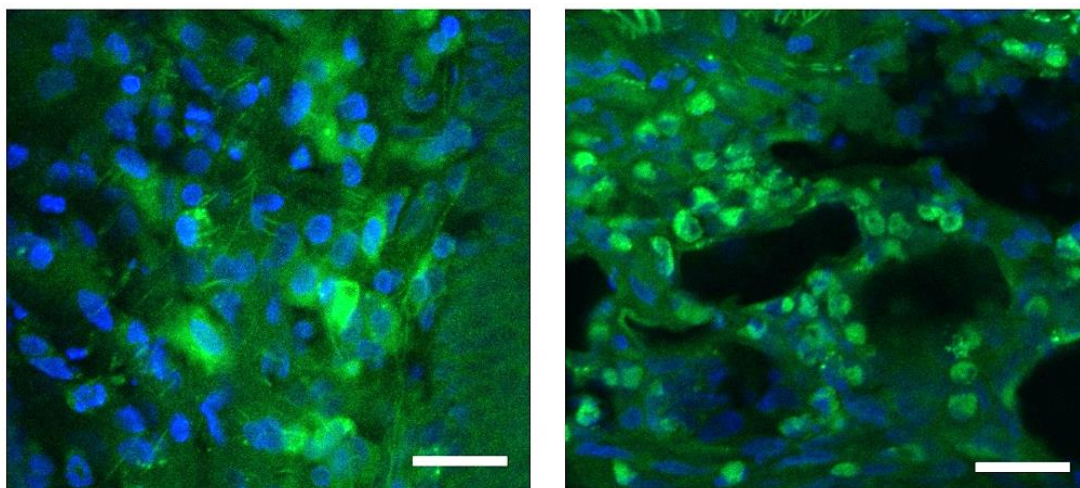


Рисунок – 33. МСК костного мозга человека, экспрессирующие green fluorescent protein, при введении в дефект голосовых складок кролика: слева – в виде суспензии, справа – в составе с ПЭГ-фибриновом гидрогелем. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, 3-й день (синяя флуоресценция – ядра клеток; зеленая – autofлуоресценция ткани; интенсивная зеленая флуоресценция – green fluorescent protein). Масштабный отрезок – 25 мкм

Таким образом, на ранних сроках (3-й день) МСК человека сохраняются в месте имплантации в голосовых складках кролика. В эти сроки МСК человека локализуются в тканях, непосредственно окружающих дефект голосовой складки кролика, и не распространяются в другие отделы голосового отдела гортани. Введение МСК костного мозга человека, иммобилизованных в ПЭГ-фибриновом гидрогеле, обеспечивает более высокую концентрацию клеток в месте повреждения.

Глава 4. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ: ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И БИОМЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ГОЛОСОВОГО ОТДЕЛА ГОРТАНИ ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

4.1. Результаты морфологического и морфометрического исследования препаратов голосовых складок

При исследовании методом световой микроскопии интактных голосовых складок кроликов (группа чистого контроля) не обнаружено принципиальных гистологических отличий от голосовых складок человека. Большая часть голосовой складки выстлана неорговевающим многослойным плоским эпителием (НМПЭ), который имеет обычное строение: базальный слой с несколько вытянутыми клетками, округлым базофильным ядром и несколько внешних слоёв клеток со слабоокрашенными ядрами (Рисунок 34). Под эпителием располагается собственный слой слизистой оболочки, который содержит сосуды разного калибра, коллагеновые волокна и клеточные элементы: фибробласты, лимфоциты, макрофаги, плазматические клетки, с единичные нейтрофильные лейкоциты, в целом лимфо-макрофагальная инфильтрация выражена слабо.

При микроскопии с увеличением $\times 200$, определяется, что соединительная ткань слизистой оболочки состоит из сравнительно тонких коллагеновых волокон, расположенных продольно и взаимно параллельно (Рисунок 34 А). В основном сеть коллагеновых волокон имеет рыхлую структуру, однако местами они формируют относительно плотные пучки коллагеновых волокон, сохраняющие при этом продольную ориентацию. Следует отметить, что в собственной пластинке слизистой оболочки выделяются два слоя на основании плотности в архитектонике коллагеновых волокон, внутренний (ближайший к эпителию слой) имеет более рыхлую структуру, чем наружный, близкий к

мышечной ткани слой соединительной ткани (Рисунок 34 А, Б). При окраске пикросириусом коллагеновые волокна слизистой оболочки окрашиваются в красный цвет (Рисунок 34 Б). При микроскопии в темном поле четко видна сеть коллагеновых волокон в слизистой оболочке и в матриксе хряща (Рисунок 34 В). Архитектоника коллагеновых волокон слизистой оболочки также хорошо визуализируется при фазово-контрастной микроскопии (Рисунок 34 Г). При поляризационной микроскопии эти волокна дают двойное лучепреломление (анизотропия); (Рисунок 34 Д). При окраске орсеином на эластик в слизистой оболочке четко видны тонкие эластические волокна, часть из которых ориентирована также как и коллагеновые волокна, а другие поперечно к ним (Рисунок 34 Е).

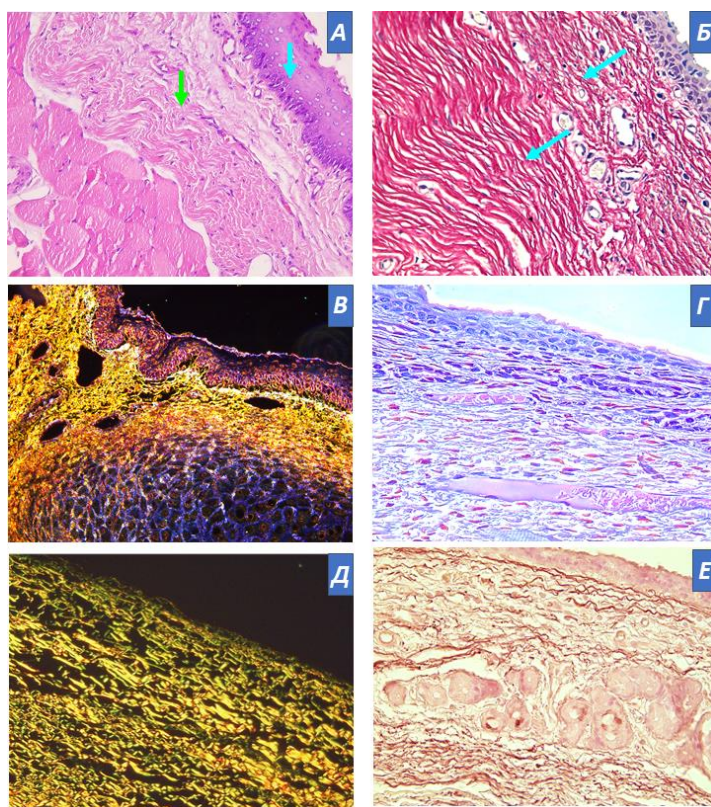


Рисунок - 34. Световая микроскопия гистологических препаратов центральной части голосовых складок кролика в норме: А - интактная голосовая складка, слизистая оболочка с продольными коллагеновыми волокнами (зелёная стрелка), выстлана НМПЭ (голубая стрелка), глубже видна мышечная ткань;

окраска гематоксилин-эозин, увеличение $\times 200$; **Б** - коллагеновые волокна собственной пластинки голосовой складки, образующие два слоя: глубокий - плотный и наружный - рыхлый (слои указаны стрелками); окраска пикросириусом красным, увеличение $\times 200$; **В** - сеть коллагеновых волокон слизистой оболочки (желтый цвет); темнопольная микроскопия, окраска гематоксилин-эозин, увеличение $\times 200$; **Г** - сравнительно рыхлая сеть продольно-ориентированных коллагеновых волокон; фазово-контрастная микроскопия, увеличение $\times 400$; **Д** - анизотропия коллагеновых волокон наружного слоя собственной пластинки; поляризационная микроскопия, окраска пикросириусом красным, увеличение $\times 200$; **Е** - Большое количество тонких эластических волокон; окраска орсеином на эластик, увеличение $\times 200$.

В задних отделах ГС в группе чистого контроля происходит переход НМПЭ в реснитчатый цилиндрический многорядный эпителий (Рисунок 35 А). Слизистая оболочка более рыхлая, чем в центральной части, содержит железы, сосуды, коллагеновые пучки, которые сохраняют продольную ориентацию, но слои четко не определяются. Так же следует отметить, что в периферических участках ГС, выявляются дополнительные микрохрящи. От щитовидного и черпаловидных хрящей они отличаются округлой формой, крупными хондроцитами с хорошо сохраняющимся ядром и цитоплазмой, равномерно окрашенным матриксом без амиантоидных волокон, которые встречаются в крупных хрящах, а также четко сформированным перихондрием (Рисунок 35 Б).

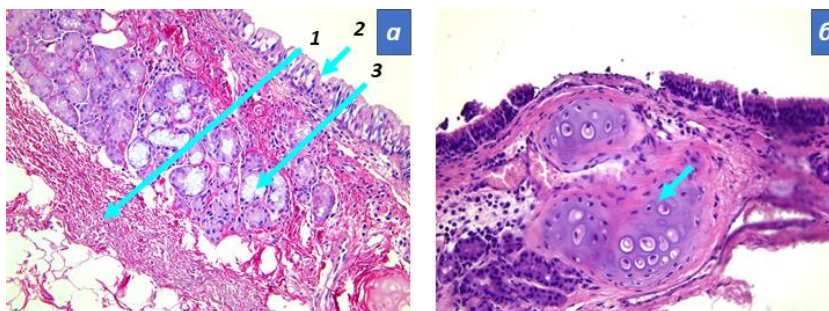


Рисунок – 35. Световая микроскопия гистологических препаратов периферической части голосовых складок кролика в группе контроля: а - 1 -

коллагеновые волокна, расположенные в глубоком слое слизистой оболочки; 2 – реснитчатый цилиндрический многоядный эпителий; 3 – железы; окраска гематоксилин-эозин, увеличение $\times 100$; б - дополнительные микрохрящи (стрелка); окраска гематоксилин-эозин, увеличение $\times 200$

В обеих опытных группах (1-я - во вторичную рану ГС после удаления рубца вводился физиологический раствор; 2-я - в аналогичный дефект вводилась суспензия аутологичных МСК) у всех животных гистологическое исследование выявило рубцы слизистой оболочки, развившиеся на месте операционного дефекта в центральной части голосовой складки. Через 3 месяца рубцы выстланы зрелым НМПЭ и состоят из плотной фиброзной соединительной ткани, представленной пучками коллагеновых волокон (Рисунок 36 А, Б). Площадь рубца во 2-й опытной группе уменьшается по сравнению с 1-й опытной группой, однако различия по данным балльной оценки после поправки на множественное сравнение находятся на пороге статистической значимости ($p=0,114$); (Рисунок 36 А, Б, 37). Характеристики эпителия (критерии - гипертрофия, атрофия) не принципиально различаются в 1-й и 2-й опытных группах, статистически значимых отличий также не обнаружено. Важным показателем является плотность рубцовой ткани, состоящей из коллагеновых волокон. Во 2-й опытной группе ткань рубца более рыхлая по сравнению с 1-й группой, различия в балльной оценке по критерию плотности рубцовой ткани были статистически значимы ($p=0.086$). Важно отметить отличия и в архитектонике рубцовой ткани: коллагеновые волокна во 2-й опытной группе, образование рубцов в которой происходило на фоне имплантированных МСК тоньше и кроме того, в 1-й опытной группе (без имплантации МСК) они нерегулярно переплетаются в большинстве случаев, а во 2-й группе имеют продольное и взаимно параллельное строение. В этом отношении рубцовая ткань после лечения значительно ближе стоит к нормальной структуре слизистой оболочки, чем к рубцовой ткани без лечения. Нерегулярность структуры коллагеновых волокон статистически значимо выше в 1-й группе, чем во 2-й ($p=0.086$); (Рисунок 36 Б, 37). Изучение

срезов ткани предварительно окрашенных пикросириусом в режиме поляризационной микроскопии выявило, что во всех случаях имеется анизотропия коллагеновых волокон. Интенсивность анизотропии в рубцовой ткани выше, чем в нормальной слизистой оболочке. При этом отмечается различная окрашиваемость объектов поляризации (желтый, зеленый и красный цвета). Это объясняется прежде всего углом отражения поляризованного света, цвет разный в зависимости от преобладания в срезе продольных либо поперечных волокон. В рубцах без имплантации МСК количество поперечно-срезанных волокон визуальное было выше (Рисунок 36 В). Содержание эластических волокон в рубцовой ткани без терапии уменьшается по сравнению с нормальной тканью, тогда как в рубцах, леченых аутологичными МСК, количество эластических волокон выше, чем в группе 1, однако по принятому критерию различия оказались статистически не значимы ($p=0,679$); (Рисунок 36 Г, 37). Содержание фибробластов в рубцовой ткани в 1-й опытной группе статистически значимо ниже, чем во 2-й группе ($p=0,086$). По этому признаку рубцы с имплантированными МСК также стоят ближе к норме, чем рубцы без лечения. Кроме того, экспериментальные группы существенно различались по интенсивности инфильтрации, в 1-й группе этот показатель выше ($p=0,086$); (Рисунок 36, 37). Васкуляризация рубцовой ткани в обеих группах была выражена слабее, чем в интактной слизистой оболочке, а во 2-й группе-несколько лучше, чем в 1-й, однако по данным балльной оценки эти различия не достигли статистически значимого уровня ($p=0,9610$); (Рисунок 36, 37). Следует отметить, что при формировании рубца в обеих опытных группах фиброз мышечной ткани происходит в тех слоях, которые находятся близко к рубцу. Во 2-й группе наблюдается тенденция к уменьшению фиброза мышечной ткани, по сравнению с 1-й опытной группой ($p=0,1144$); (Рисунок 36 А, 37). Ниже, на Рисунке 37 приводятся данные световой микроскопии препаратов голосовых складок экспериментальных и контрольной групп: контроль – интактные ГС; Гр.1 - 1-я опытная группа (рубцы ГС без имплантации МСК); Гр.2 - 2-я опытная группа (рубцы после имплантации аутологичных МСК костного мозга).

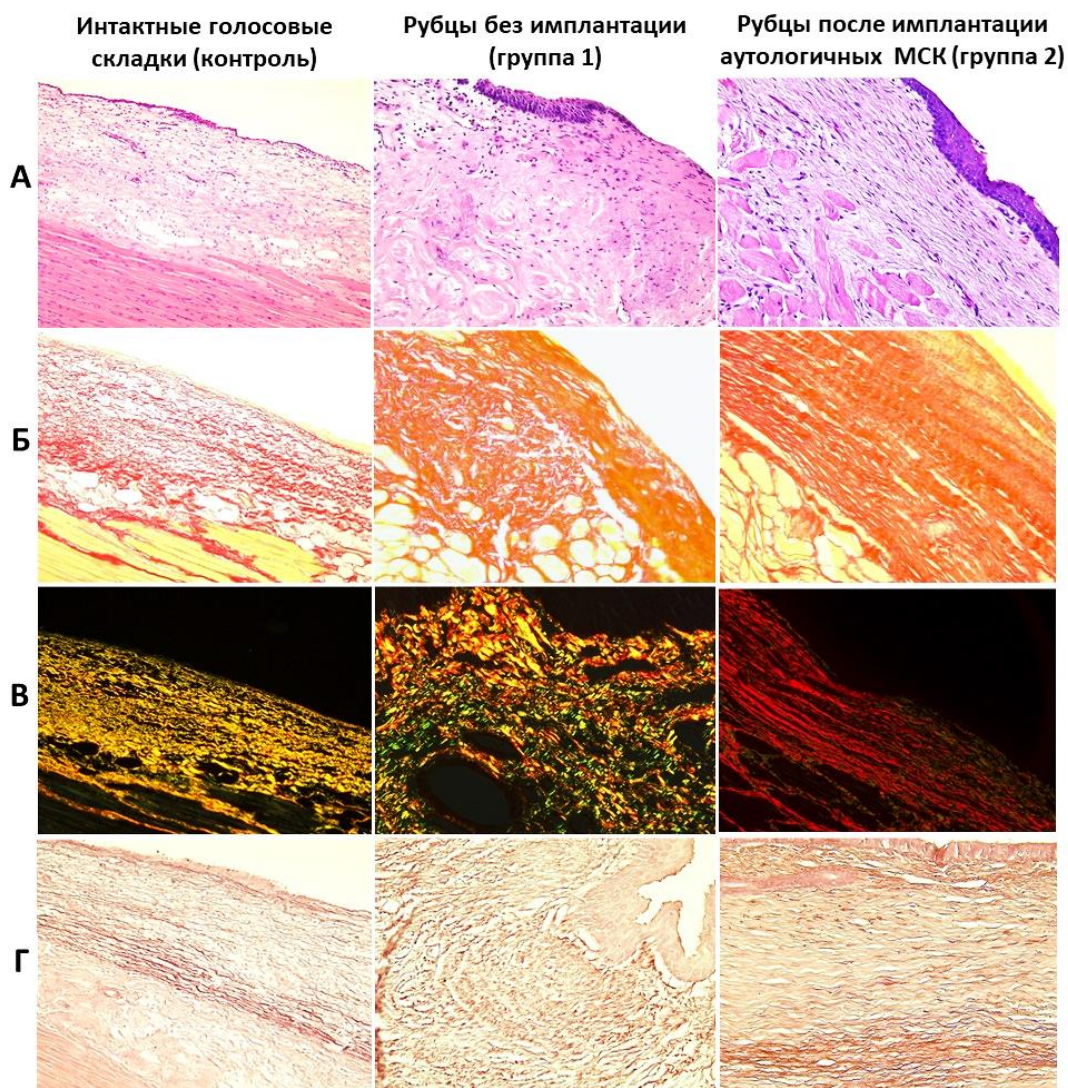


Рисунок – 36. Световая микроскопия гистологических препаратов голосовых складок экспериментальных и контрольной групп. **А** – Контроль - слизистая оболочка с продольными коллагеновыми волокнами. Гр.1 – плотная рубцовая ткань. Гр.2 - рубцовая ткань, состоящая из продольно ориентированных тонких волокон; окраска гематоксилин-эозин, увеличение $\times 100$. **Б** - Контроль - в глубоком слое слизистой оболочки параллельно расположенные коллагеновые. Гр.1 - участок рубцовой ткани в слизистой оболочке, плотная упаковка разнонаправленных коллагеновых волокон. Гр.2 - рубец на месте дефекта, параллельные коллагеновые волокна; окраска пикросириусом красным, увеличение $\times 200$. **В** - Контроль – анизотропия коллагеновых волокон рыхлой слизистой оболочки, Гр.1 - чёткая анизотропия коллагеновых волокон рубца с

преимущественно поперечно срезанными пучками волокон, Гр.2 – анизотропия параллельно расположенных коллагеновых волокон, срезанных продольно; поляризационная микроскопия, окраска пикросириусом красным, увеличение $\times 200$. Г - Контроль - слизистая оболочка с большим количеством эластичных волокон. Гр.1 – тонкие, частично фрагментированные эластичные волокна. Гр.2 - в верхнем рубцовом слое - немного эластичных волокон, но больше, чем в группе 1. В глубоком рубцовом слое - увеличено количество эластических волокон; - окраска орсеином, увеличение $\times 200$

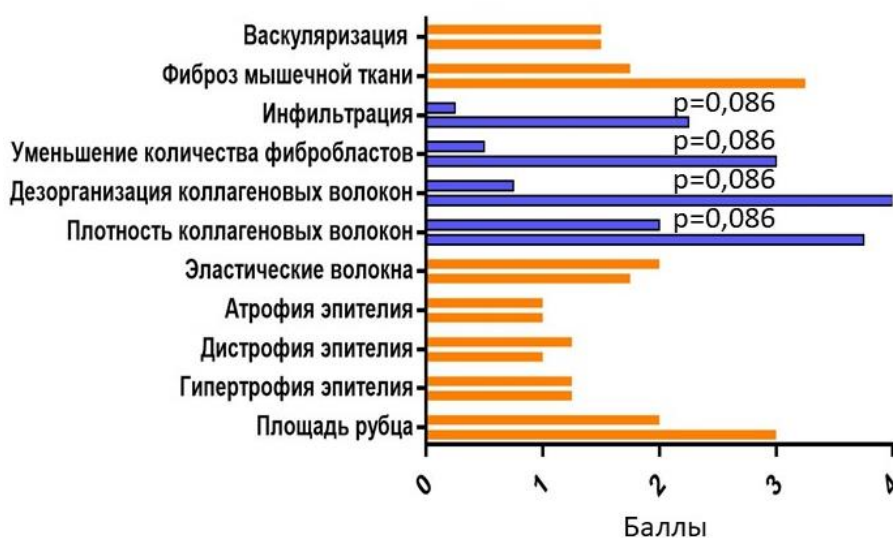


Рисунок - 37. Медианные значения морфологических параметров в экспериментальных группах по данным балльной оценки. Синим цветом выделены критерии, по которым получены статистически значимые различия между группами ($p < 0,1$). Полоски в каждом индексе соответствуют группе 1 (нижняя) и группе 2 (верхняя)

Таким образом, рубцы ГС, образование которых происходило без введения клеток (опытная группа 1) по сравнению с рубцами, формировавшимися в присутствии МСК (опытная группа 2) имели статистически значимые различия ($p < 0,1$) по критериям инфильтрации, уменьшения количества фибробластов, дезорганизации и плотности коллагеновых волокон.

4.2. Анализ толщины собственной пластинки голосовых складок

При морфометрическом анализе толщины рубцовой ткани (собственной пластинки) в опытных группах и в группе чистого контроля, данные всех групп имели нормальное распределение. Сравнительный анализ представлен на Рисунке 38.

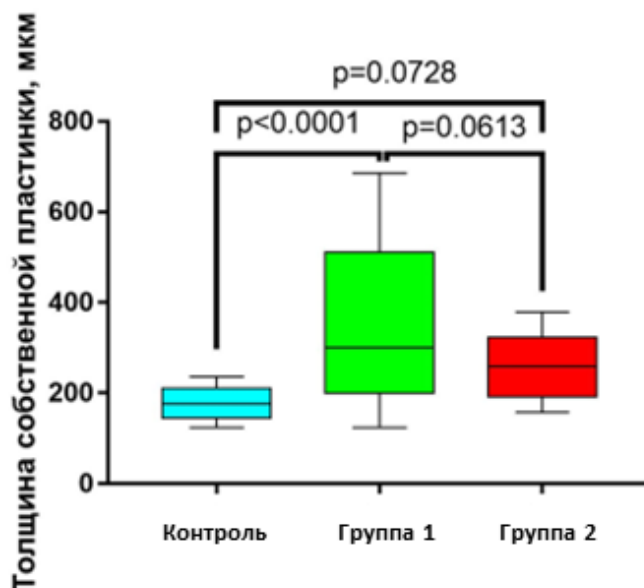


Рисунок - 38. Результаты морфометрического исследования толщины рубцовой ткани в экспериментальных группах 1 и 2, толщины собственной пластинки в группе чистого контроля

В 1-й опытной группе средняя ширина рубца была составляла 344,6 мкм, ($\sigma = 62,5$ мкм), во 2-й группе - 259.5 мкм, ($\sigma = 32,4$ мкм). Средняя ширина собственной пластинки слизистой оболочки интактных голосовых складок в группе чистого контроля была 177,3 мкм, ($\sigma = 14,7$ мкм), что статистически значимо ниже, чем в 1-й группе ($p < 0,0001$). Разница была вызвана образованием рубцовой ткани. Также наблюдалась заметная тенденция к уменьшению ширины рубцово-измененной собственной пластинки от группы 1 к группе 2 ($p = 0,0613$).

4.3. Результаты иммуногистохимического определения и анализа содержания коллагена I и III типов в препаратах голосовых складок

В группе чистого контроля (интактные ГС) выявлено умеренное окрашивание обоих исследуемых типов коллагена (I и III); (Рисунок 39). Они были представлены в виде толстых структурированных волокон. Наблюдалась неразличимая разница в интенсивности и распространенности окрашивания коллагенов I и III типов. Эти данные были подтверждены статистическим анализом, который показал отсутствие достоверных различий в этой группе (Рисунок 40). В экспериментальной группе 1 (рубцы без имплантации МСК) картина была визуально иной. Интенсивность окрашивания антителами к коллагену I типа превышала соответствующее окрашивание в контрольной группе. В то же время содержание коллагена III типа было резко снижено (Рисунок 39). Эти результаты были подтверждены статистическим анализом. Содержание коллагена III типа было на 45,5% ниже, чем коллагена I типа в этой группе ($p < 0,0001$); (Рисунок 40).

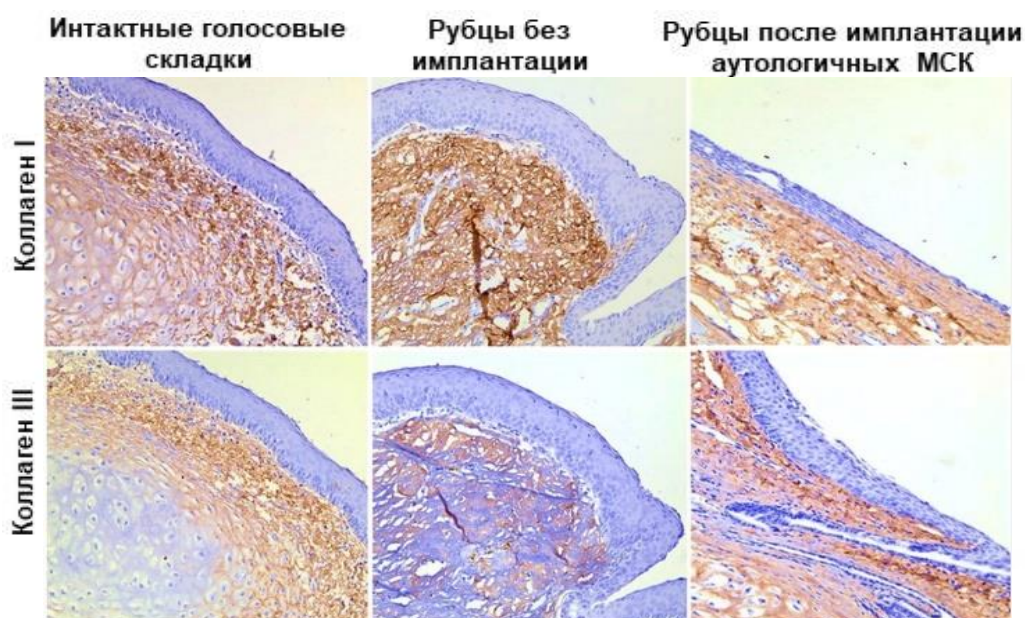


Рисунок – 39. Иммуногистохимия, окрашивание (коричневый цвет) антителами к коллагену I типа (верхний ряд изображений) и антителами к коллагену III типа

(нижний ряд изображений) препаратов голосовых складок экспериментальных и контрольной групп, увеличение $\times 200$.

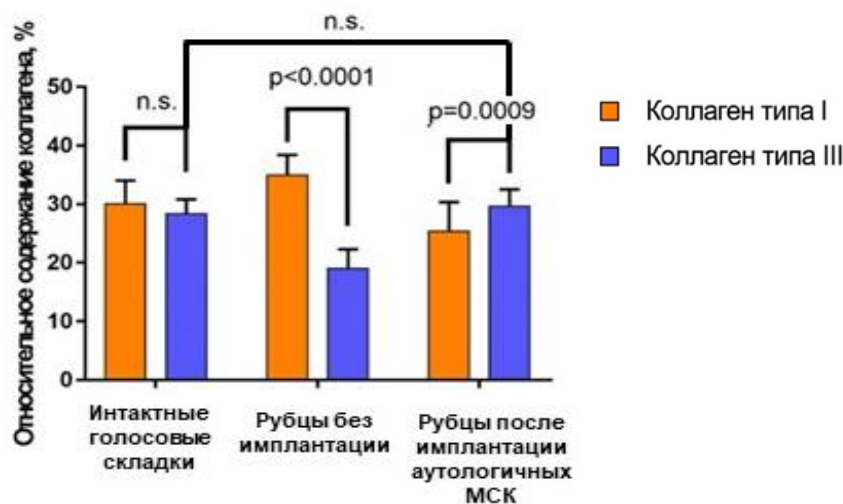


Рисунок - 40. Относительное содержание коллагена I типа и коллагена III типа в собственной пластинке слизистой оболочки при иммуногистохимическом исследовании ГС экспериментальных и контрольной групп

Содержание коллагена III типа не имело достоверной разницы между группой чистого контроля и группой 2 (рубцы, после имплантации аутологичных МСК). Также в экспериментальной группе 2 содержание коллагена III типа было выше на 16,8%, чем содержание коллагена I типа ($p=0,0009$); (Рисунок 39, 40). Эти данные свидетельствуют о восстановлении соотношения коллагена I и III типов в рубцах, формирующихся в присутствии МСК.

4.4. Результаты атомно-силовой микроскопии препаратов голосовых складок в экспериментальных и контрольной группах

Как показала АСМ-визуализация, в структуре интактного внеклеточного матрикса (ВКМ) голосовой складки кролика преобладают коллагеновые волокна

диаметром 0.5-1.5 мкм, состоящие из плотно упакованных коллагеновых фибрилл (Рисунок 41). Пространство между волокнами заполнено отдельными коллагеновыми фибриллами (демонстрирующими характерный D-период коллагена) и неволокнистым веществом матрикса. Полученные АСМ-изображения соответствуют описанным ранее в литературе [96]. На рисунках 42 и 43 представлены полученные одновременно в режиме Peak Force QNM топографические и соответствующие им изображения распределения модуля Юнга на поверхности образцов. Как показывает детальное изображение структуры ВКМ на Рисунке 42, коллагеновые волокна составлены из фибрилл, уложенных чрезвычайно плотно и однородно. Механические свойства как фибрилл, так и составленных из них волокон практически однородны по поверхности образцов, и отличаются исключительно на наномасштабах, связанных с D-периодом самих коллагеновых фибрилл. Усредненный модуль Юнга интактных образцов на воздухе составлял $2,6 \pm 1,2$ ГПа, без наличия участков с существенно различающейся жесткостью внутри коллагеновых волокон. Эластические волокна в интактных образцах встречаются крайне редко на АСМ-изображениях.

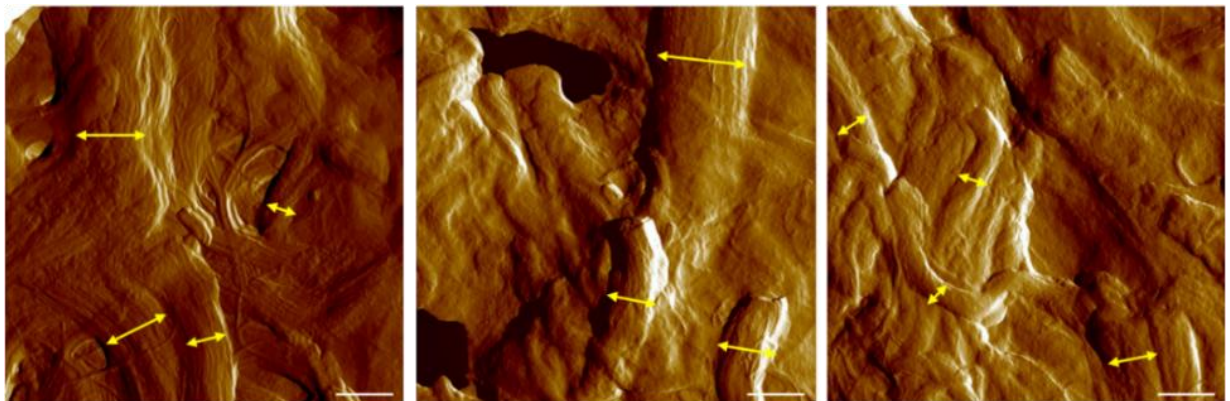


Рисунок – 41. АСМ-визуализация внеклеточного матрикса интактной голосовой связки (галерея изображений). Стрелками обозначены коллагеновые волокна разной толщины. Указатель масштаба=1 мкм. Топография показана в виде канала Peak Force Error для наглядности.

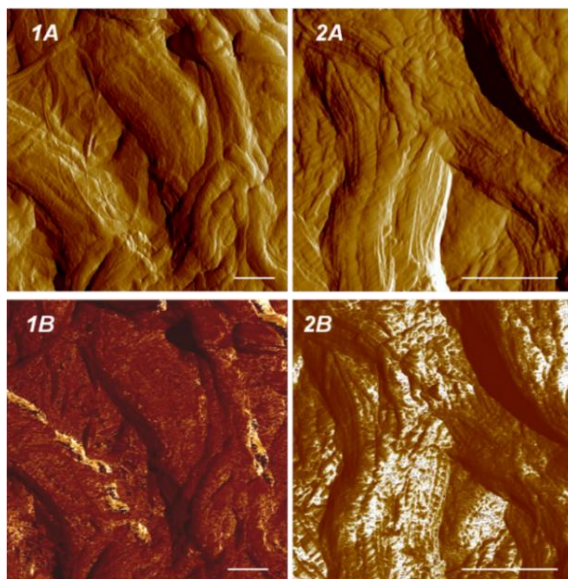


Рисунок - 42. Типичные АСМ-изображения топографии (1А,2А) и соответствующие изображения распределения модуля Юнга (1В,2В) ВКМ интактных голосовых связок на разных масштабах. Указатель масштаба=1 мкм. Топография показана в виде канала Peak Force Error для наглядности.

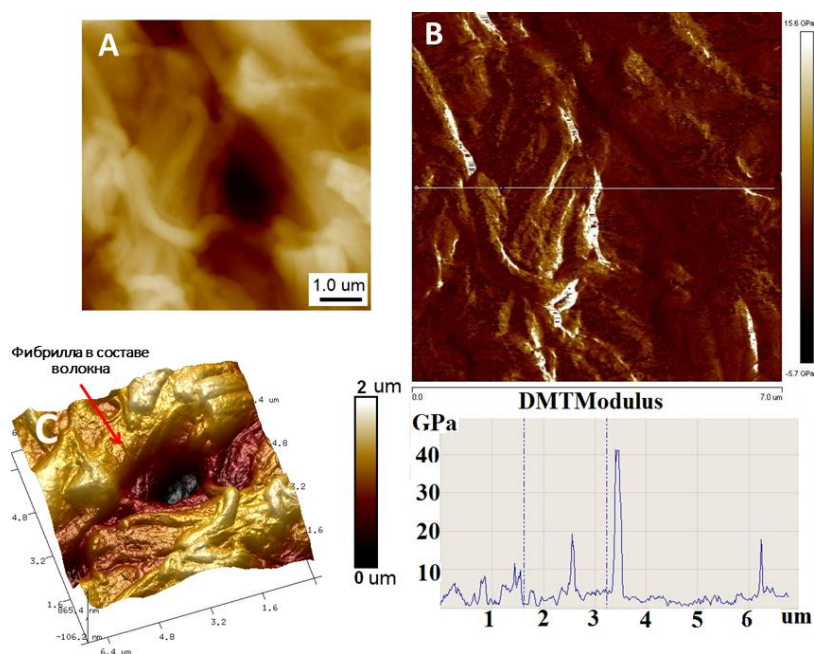


Рисунок – 43. АСМ изображения препарата интактной голосовой складки: А – топографическое изображение; В - изображение распределения и отдельный

профиль значения модуля Юнга ВКМ матрикса; С - квази- 3D представление АСМ изображения топографии ВКМ интактной голосовой складки, визуализируются фибриллы в составе коллагеновых волокон.

ВКМ послеоперационной голосовой складки в экспериментальной группе 1 характеризуется наличием толстых (толщиной несколько микрон) коллагеновых волокон с плотной укладкой фибрилл и даже целых областей, образованных параллельно уложенными фибриллами, ориентированными в одном направлении (Рисунок 44). При этом толстые коллагеновые волокна часто переплетаются между собой, фибриллы, составляющие волокна, также спиралевидно закручены и на них отчетливо виден D-период, приблизительно равный 64нм (Рисунок 45). Картирование наномеханических свойств показывает, что значения модуля Юнга равномерно распределены по поверхности образца, то есть укладка коллагеновых структур ВКМ является однородной внутри коллагеновых волокон, что указывает на компактность упаковки фибрилл. Усредненный модуль Юнга рубцовых образцов составил 7 ± 3 ГПа (Рисунок 45,46).

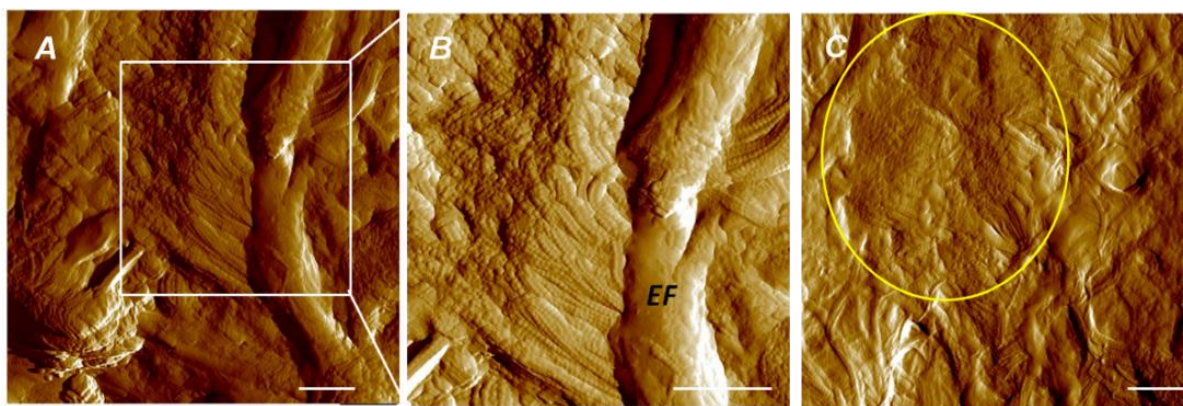


Рисунок – 44. Типичные АСМ-изображения микроструктуры ВКМ рубца голосовой складки опытной группы 1. А,С – 7х7 мкм, В – изображение с высоким разрешением выделенного участка изображения А. На изображении С - желтый эллипс указывает на область непрерывной плотной упаковки параллельных фибрилл. *EF* – эластическое волокно (не имеет внутренней структуры, в отличие

от коллагеновых волокон). Указатель масштаба=1 мкм. Топография показана в виде канала Peak Force Error для наглядности

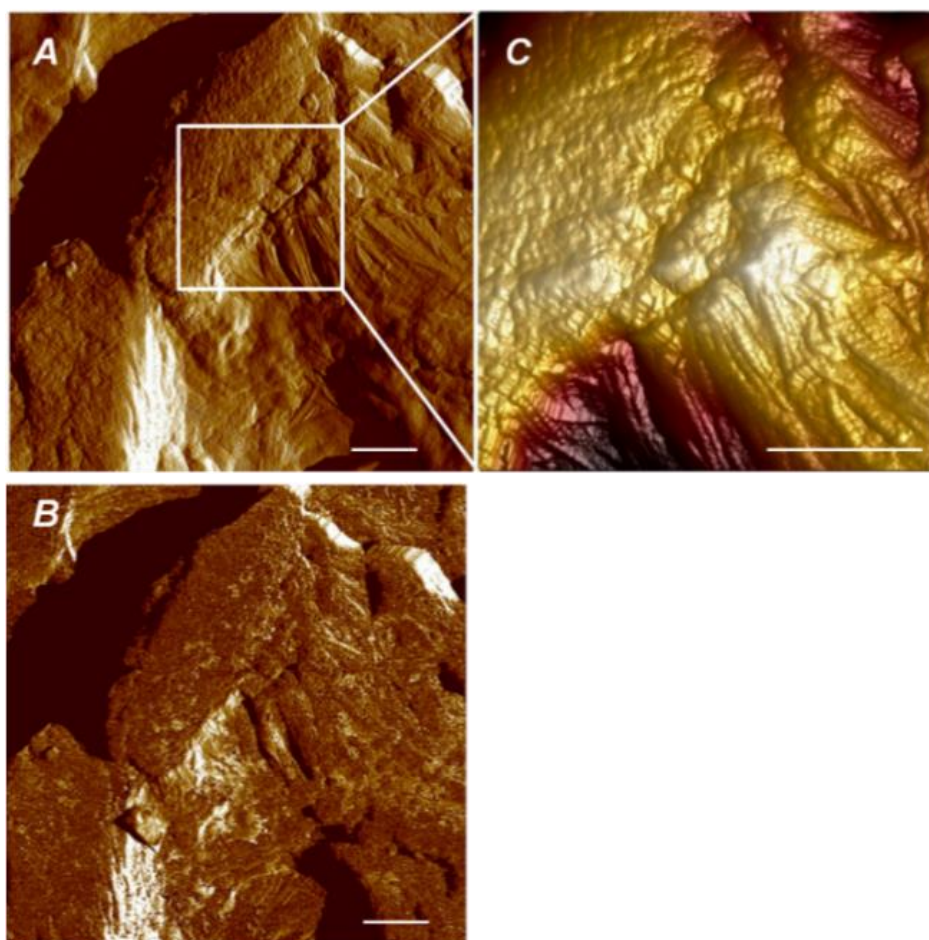


Рисунок – 45. Типичное АСМ изображение топографии (А) и соответствующего распределения модуля Юнга (В) ВКМ голосовых складок в опытной группе 1: увеличенное изображение фрагмента изображения А в квази-3D представлении (С) демонстрирует высокую компактность и ориентацию фибрилл в толстом коллагеновом волокне, хорошо заметны также закрученные пучки фибрилл внутри волокна. Указатель масштаба=1 мкм. Топография показана в виде канала Peak Force Error для наглядности

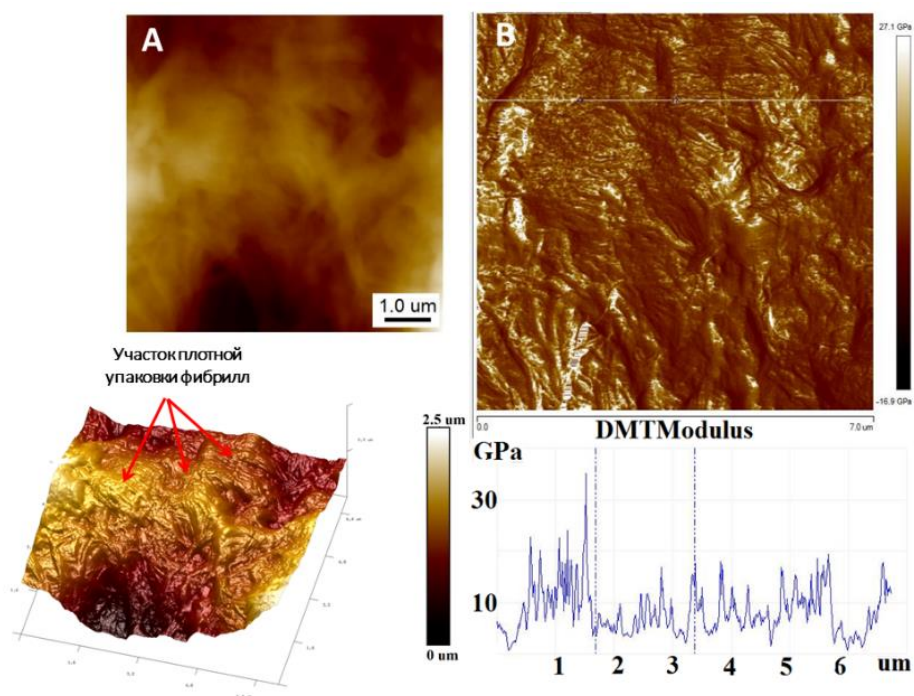


Рисунок – 46. АСМ изображения препарата рубца голосовой складки 1-й опытной группы: А – топографическое изображение; В - изображение распределения и отдельный профиль значения модуля Юнга ВКМ матрикса; С - квази- 3D представление АСМ изображения топографии ВКМ рубца, визуализируется плотная упаковка фибрилл

АСМ рубцов слизистой оболочки голосовой складки с введенными аутологичными МСК (опытная группа 2), показала, что толстые коллагеновые волокна и широкие области с плотной укладкой коллагеновых фибрилл, наблюдаемые для ВКМ группы 1, не характерны для послеоперационной голосовой складки в этой группе. В целом морфология ВКМ для этой группы, визуализируемая АСМ, напоминает морфологию ВКМ интактной голосовой складки (Рисунок 47), однако укладка фибрилл в волокнах выглядит более рыхлой и неоднородной, а сами волокна не имеют таких четких границ, как волокна интактных образцов (Рисунок 48, 49). Следует отметить, что не только фибриллы внутри волокон, но и сами волокна имеют преимущественно продольное расположение. Неравномерная упаковка коллагеновых структур

проявлялась также в неоднородном распределении упругих свойств, визуализируемых в виде чередующихся более ярких (повышенная жесткость) и более темных (пониженная жесткость) пятен внутри пучков коллагеновых фибрилл на картах распределения упругих свойств, придающих им пятнистый вид (Рисунок 48, 49). Усредненный модуль Юнга образцов опытной группы 2 составил $1,9 \pm 0,6$ ГПа.

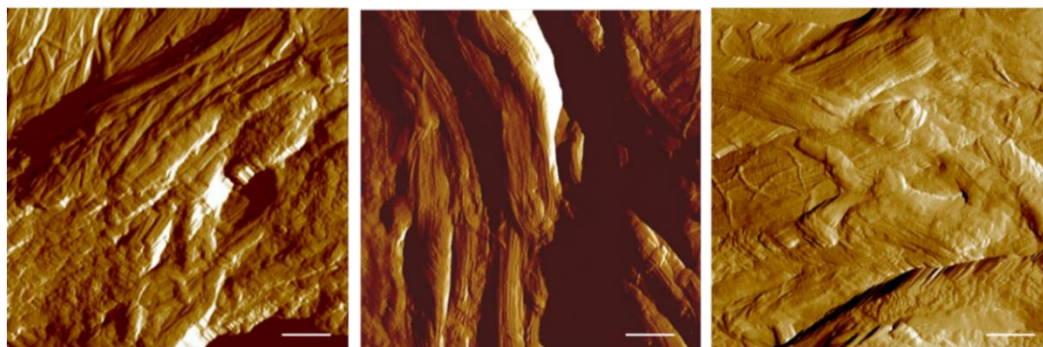


Рисунок – 47. Типичные АСМ-изображения микроструктуры ВКМ рубца голосовой связки после имплантации МСК (Группа 2). Указатель масштаба=1 мкм. Топография показана в виде канала Peak Force Error для наглядности

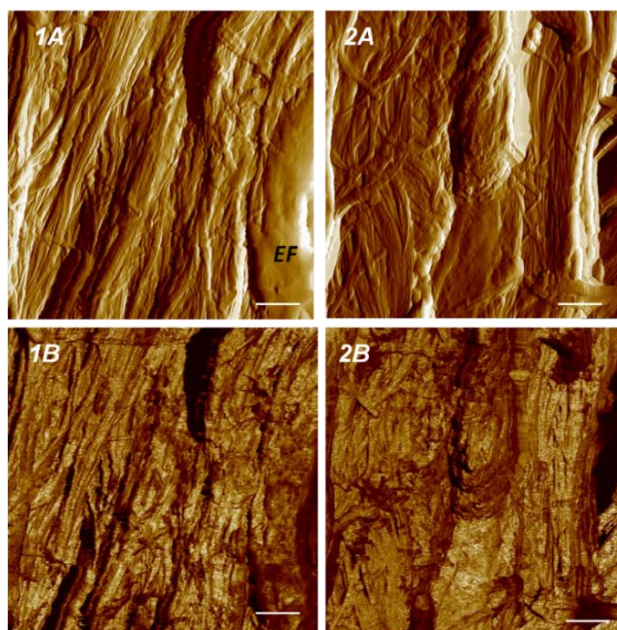


Рисунок – 48. Типичные АСМ-изображения изображения топографии (1А,2А) и соответствующие изображения распределения модуля Юнга (1В,2В) ВКМ

голосовых складок в опытной группе 2. *EF* – эластическое волокно. Указатель масштаба=1 мкм. Топография показана в виде канала Peak Force Error для наглядности.

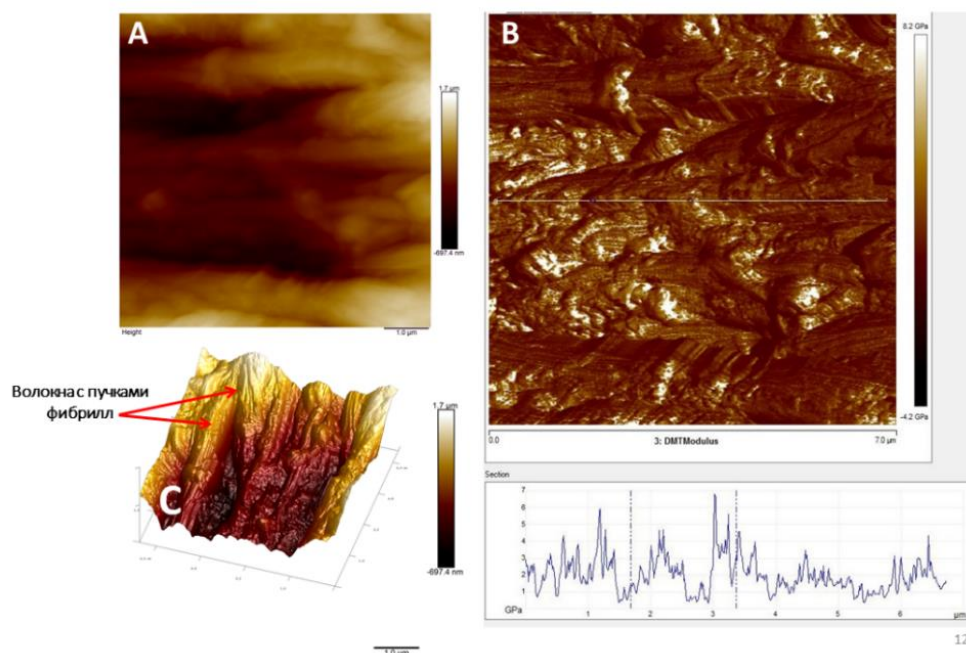


Рисунок – 49. АСМ изображение препарата рубца голосовой складки 2-й опытной группы: А – топографическое изображение; В - изображение распределения и отдельный профиль значения модуля Юнга ВКМ матрикса; С - квази- 3D представление АСМ изображения топографии ВКМ рубца, визуализируются продольно расположенные волокна, состоящие из пучков фибрилл

Мы сравнили толщины фибрилл, а также усредненные модули Юнга в контрольной группе и в экспериментальных группах 1 и 2 (Рисунок 50). Как следует из полученных данных, коллагеновые фибриллы ВКМ голосовых складок представлены двумя видами, с толщинами, отличающимися почти в два раза. В ВКМ рубцовой ткани экспериментальной группы 1 толщины обоих видов фибрилл несколько уменьшаются, а в ткани после лечения МСК возвращаются к

прежним значениям, однако наблюдаемые различия не являются статистически значимыми. Следует отметить, что в группе 2 мы практически не наблюдали популяции более толстых фибрилл, в отличие от группы 1 и группы чистого контроля. Усредненные значения модуля Юнга статистически значимо повышались ($p=0.013$) в группе 1 по сравнению с контрольной группой и возвращались к исходным значениям в группе 2 после лечения, ($p=0,59$), (Рисунок 50). Это, очевидно, непосредственно связано с наблюдаемыми изменениями упаковки фибрилл, с обширными областями сверхплотной параллельной упаковки фибрилл в группе 1 и переплетениями коллагеновых волокон между собой и возвращению к структуре, напоминающей исходную, в группе 2.

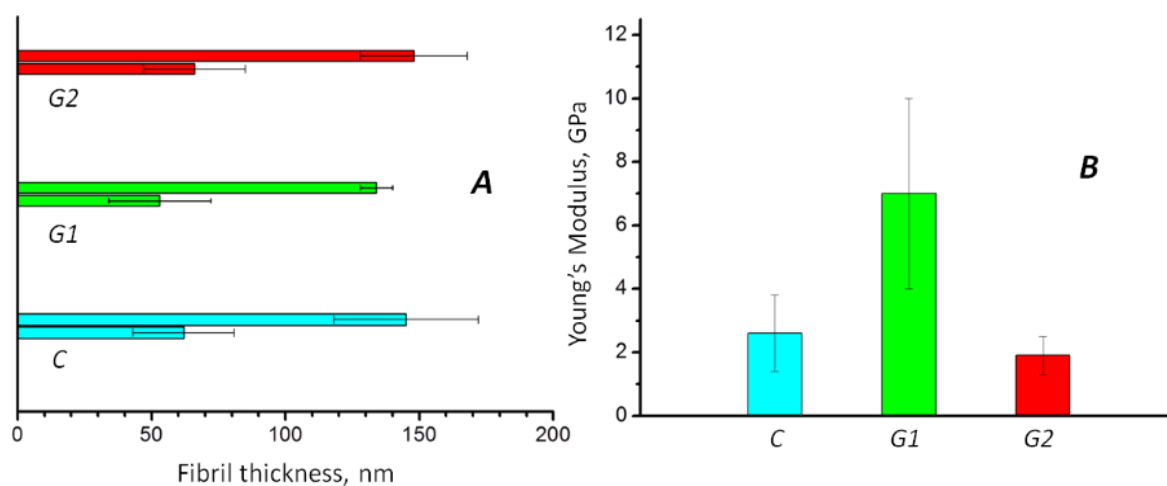


Рисунок – 50. Толщина фибрилл (A) и усредненный модуль Юнга (B) в коллагеновых структурах ВКМ слизистой оболочки интактных голосовых (C), складок в группе 1 (G1) и складок в группе 2 (G2).

Таким образом, аутологичные МСК костного мозга, введенные в рану голосовой складки сразу после иссечения зрелого рубца, способствуют заживлению слизистой оболочки. Дефект не регенерирует полностью, однако в замещенной ткани рубцовые процессы выражены слабее и морфологически она стоит ближе к нативной структуре голосовой складки по сравнению с дефектами,

репарация которых проходила без введения клеток. По данным световой и атомно-силовой микроскопии, рубцы после клеточной терапии отличаются меньшей толщиной собственной пластинки ГС, снижением плотности упаковки коллагеновых структур на микро - и ультраструктурном уровнях, более тонкими фибриллами, волокнами и пучками волокон, их продольной ориентацией в межклеточном матриксе собственной пластинки голосовой складки. Жёсткость ткани препаратов рубцов ГС после клеточной терапии восстанавливалась до значений интактных ГС, и была значимо выше в группе рубцов без имплантации клеток. По данным иммуногистохимического исследования в рубцах после имплантации МСК наблюдалась нормализация количественного соотношения коллагена III и I типов.

Глава 5. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ: ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И БИОМЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ГОЛОСОВОГО ОТДЕЛА ГОРТАНИ ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

5.1. Морфологическое исследование, полуколичественная оценка морфологических признаков в экспериментальных и контрольной группах

Морфологическое строение интактных голосовых складок в группе чистого контроля было описано в главе 4.1., значимых различий с аналогичной группой в I части исследования, посвященной аутологичным МСК, обнаружено не было. Приводим краткое описание с целью сравнения с рубцами. В центральной части складки она выстлана неороговевающим многослойным плоским эпителием (НМПЭ) (Рисунок 51). Периферическая часть складки выстлана мерцательным цилиндрическим эпителием, а слизистая оболочка имеет более рыхлую структуру, чем центральная часть. В слизистой оболочке местами видна слабая лимфомакрофагальная инфильтрация. Соединительная ткань слизистой оболочки в центральной части голосовой складки состоит в основном из сравнительно тонких коллагеновых волокон, расположенных продольно и взаимно параллельно, более рыхло в наружном слое и более плотно во внутреннем, прилежащем к пучкам щито-черпаловидной мышцы, что особенно хорошо определяется при окраске пикросириусом красным и фазово-контрастной микроскопии. В режиме поляризационной микроскопии выявляется анизотропия коллагеновых волокон (Рисунок 51). Эластические волокна, образуют тонкие пучки, и расположены как параллельно, так и в поперечном направлении относительно коллагеновых структур (Рисунок 52).

В группе рубцов голосовых складок без лечения (экспериментальная группа 4), гистологическое изучение выявляет у животных рубцы слизистой оболочки,

развившиеся на месте операционного дефекта. В большинстве случаев рубец выстлан многослойный плоским эпителием с дистрофическими изменениями. Площадь рубца достаточно обширна, он разделен на 3 слоя (Рисунок 51). Поверхностный (внутренний) слой имеет многочисленные фибробласты веретеновидной формы, расположенные, как и коллагеновые волокна беспорядочно. Там же имеется умеренная диффузная инфильтрация макрофагами и лимфоцитами. Средний слой состоит из коллагеновых волокон, расположенных более продольно, там уменьшено количество фибробластов и отсутствует воспалительная инфильтрация. В наружном слое снижено количество фибробластов, которые по форме являются фиброцитами. Коллагеновые волокна расположены параллельно друг другу, особым отличием их от других слоев является формирование кримпов (волнообразной структуры волокон). В большинстве случаев выражено прорастание фиброзно-рубцовой ткани в мышечный слой (Рисунок 51). При окраске пикросириусом красным, коллагеновые волокна окрашены в красный цвет и располагаются плотно (Рисунок 51). При поляризационной микроскопии окрашенных пикросириусом красным срезах, анизотропия выявляется во всех слоях, но во внутреннем слое она несколько слабее. Цвет поляризации в основном желтый и частично красный (Рисунок 51). Фазово-контрастная микроскопия четко выявляет структуру и расположение коллагеновых волокон, составляющих коллагеновые пучки (Рисунок 52). В самой рубцовой ткани эластические волокна отсутствуют, но в прорастающих в мышцы соединительно-тканых прослойках имеется относительно небольшое количество эластических волокон (Рисунок 52).

Рубцы после терапии МСК костного мозга человека в суспензии (экспериментальная группа 1), замещающие дефект слизистой оболочки по размерам несколько меньше, чем в группе без лечения и составляющая их ткань более рыхлая. У одних животных рубцовая ткань выстлана эпителием, в котором резко выражена атрофия и десквамация, местами эпителий отсутствует. У других животных эпителий многослойный плоский имеет небольшие дистрофические

изменения. Рубцовая ткань делится на 2 слоя. Внутренний, сравнительно узкий, образован фибробластами, которые, как и коллагеновые волокна располагаются продольно. Наружный слой – широкий, образован фиброзной тканью, которая проросла в мышцы и изолировала отдельно оставшиеся мышечные волокна (Рисунок 51). При окраске пикросириусом красным коллагеновые структуры окрашиваются в ярко-красный цвет (Рисунок 51). При поляризационной микроскопии выражена анизотропия коллагеновых пучков, окрашивающихся в красный цвет (Рисунок 51). А при фазово-контрастной микроскопии четко видна структура коллагеновых волокон рубцовой ткани и включенные в рубец отдельные мышечные волокна. (Рисунок 52). Эластические волокна в рубце отсутствуют, в небольшом количестве определяются в прослойках соединительной ткани, проросших в мышечные волокна (Рисунок 52).

В группе рубцов, леченных комплексом ПЭГ-фибринового гидрогеля и МСК костного мозга человека (экспериментальная группа 2), на месте послеоперационного дефекта выявляются рубцовые изменения слизистой оболочки, однако по сравнению с контрольными группами рубцы относительно узкие, не шире, чем интактная слизистая оболочка. У одних животных в рубце остаются вкрапления отдельных мышечных волокон. Коллагеновые волокна и фибробласты в основном имеют продольную ориентацию (Рисунок 51). У других животных рубцовая ткань рыхлая, коллагеновые волокна переплетены между собой, фибробласты расположены беспорядочно (Рисунок 53). В обоих случаях рубец покрыт многослойным плоским эпителием с четким расположением слоев. Он практически не отличается от эпителия слизистой оболочки в норме. Коллагеновые волокна при окраске пикросириусом красным окрашиваются в красный цвет такой же интенсивностью как в интактной слизистой оболочке (Рисунок 51). При поляризационной микроскопии того же участка определяется анизотропия коллагеновых волокон красного цвета с большими включениям желтого цвета (Рисунок 51). При фазово-контрастной микроскопии четко видны тонкие коллагеновые волокна в рыхлой рубцовой ткани. (Рисунок 52). В

рубцовой ткани эластические волокна появляются на границе рубца и мышечной оболочки (Рисунок 52).

В экспериментальной группе 3 (рубцы после терапии ПЭГ-фибриновым гидрогелем) на месте бывшего дефекта формируется рубцовая ткань, выстланная многослойным плоским эпителием, заметные дистрофические изменения эпителия отсутствуют. Фибриновый гель через 3 месяца не обнаруживается. По толщине и общей площади рубец практически не отличается от рубцов в контрольной группе. Рубцовая ткань состоит из веретеновидных фибробластов, расположенных в основном вдоль поверхности рубца. Коллагеновые волокна располагаются плотно и также ориентируются вдоль рубца. Отмечается также прорастание соединительной ткани в мышечную ткань (Рисунок 51). Отмечается слабая диффузная инфильтрация макрофагами и лимфоцитами. В отдельных участках располагаются резко расширенные сосуды, просвет которых занят эритроцитами в состоянии сладжа. Плотность фиброзной ткани хорошо определяется при окраске пикросириусом красным. (Рисунок 51). Поляризационная микроскопия дает выраженную анизотропию рубцовой ткани. Красный цвет волокон при поляризационной микроскопии с желтыми включениями свидетельствует о зрелости коллагеновых волокон в рубце. (Рисунок 51). При фазово-контрастной микроскопии четко видны продольно-расположенные коллагеновые волокна. (Рисунок 52). Эластические волокна в рубце также не определяются (Рисунок 52).

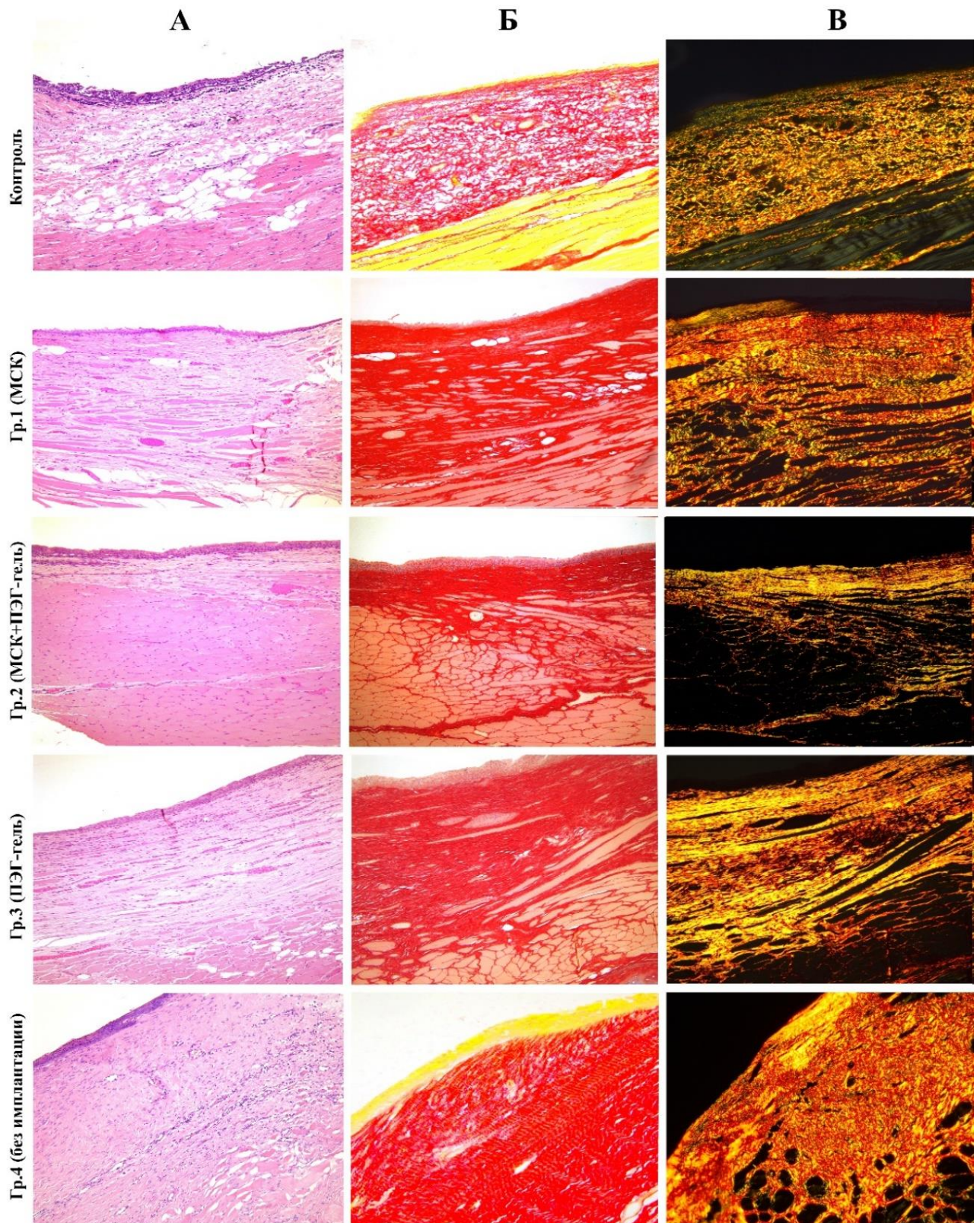


Рисунок - 51. Световая микроскопия гистологических препаратов голосовых складок экспериментальных и контрольной групп. Строки – экспериментальные группы: контроль – интактная ГС; Гр.1 – 1-я экспериментальная группа (МСК костного мозга человека); Гр.2 – 2-я экспериментальная группа (ПЭГ-фибриновый гидрогель + МСК костного мозга

человека); Гр.3 – экспериментальная группа (ПЭГ-фибриновый гидрогель); Гр.4 – 4-я экспериментальная группа (рубцы ГС без имплантации). Столбцы – различные окраски и режимы микроскопии.

А – Контроль - слизистая оболочка голосовой складки, хорошо видна сеть продольно-ориентированных коллагеновых волокон, во внутреннем слое они более рыхлые и тонкие, чем в наружном слое. Гр.1 – рубец, выстланный многослойным плоским эпителием, в его ткани сохраняются отдельные мышечные волокна. Гр.2 - тонкий рубец, выстланный многослойным плоским эпителием. Видны небольшие включения отдельных мышечных волокон. Гр.3 - Толстый рубец, выстланный многослойным плоским эпителием. Внутри рубца - остаточные мышечные волокна. Гр.4 - обширный рубец, выстланный многослойным плоским эпителием, имеет 3-х слойную структуру. Окраска гематоксилин-эозин, увеличение x 100.

Б – Контроль - коллагеновые волокна собственной пластинки слизистой оболочки, окрашивающиеся пикросириусом в красный цвет. Видны плотные ярко-красные коллагеновые пучки. Гр.1 – сравнительно толстый слой рубцовой ткани с ярко-красным окрашиванием коллагеновых пучков. Гр.2 - ярко-красные коллагеновые волокна рубцовой ткани, покрытые эпителием. Гр.3 – рубец, состоящий из плотно упакованных коллагеновых волокон. Гр.4 – выраженные фиброзно-рубцовые изменения слизистой оболочки голосовой складки. Окраска пикросириусом красным, увеличение x 100.

В – Контроль - коллагеновые волокна имеют четкую анизотропию в основном желтого цвета. Гр.1 – выраженная анизотропия коллагеновых волокон. Проращение соединительной ткани в мышцы. Гр.2 - видна анизотропия коллагеновых волокон красного и желтого цветов. Гр.3 – коллагеновые волокна дают анизотропию красного и желтого цвета. Мышечная ткань проращена многочисленными прослойками соединительной ткани. Гр.4 – выраженная анизотропия плотно упакованных коллагеновых волокон. Поляризационная микроскопия, окраска пикросириусом красным, увеличение x 100.

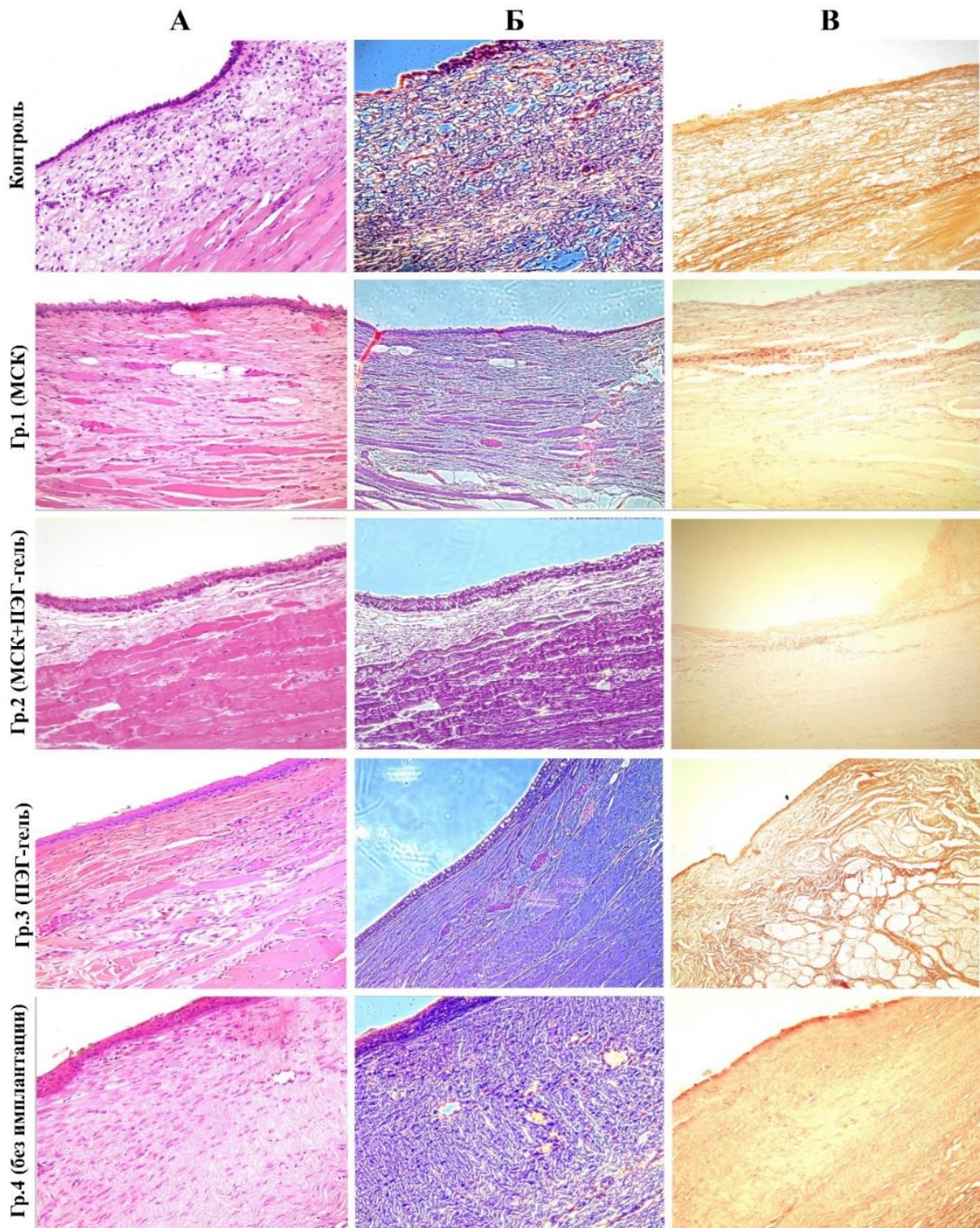


Рисунок - 52. Световая микроскопия гистологических препаратов голосовых складок экспериментальных и контрольной групп. Строки – экспериментальные группы: контроль – интактная ГС; Гр.1 – 1-я экспериментальная группа (МСК костного мозга человека); Гр.2 – 2-я экспериментальная группа (ПЭГ-фибриновый гидрогель + МСК костного мозга человека); Гр.3 – экспериментальная группа (ПЭГ-фибриновый гидрогель); Гр.4 –

4-я экспериментальная группа (рубцы ГС без имплантации). Столбцы – различные окраски и режимы микроскопии.

А - Контроль - слизистая оболочка голосовой складки выстлана МНПЭ, состоит из сети коллагеновых волокон и фибробластов. Гр.1 - Выраженное прорастание мышечной ткани фиброзно-рубцовой тканью, многочисленные прослойки фиброзной ткани изолируют мышечные волокна. Гр.2 - тонкий рубец с рыхлым и беспорядочным расположением коллагеновых волокон. Гр.3 - относительно толстый рубец с продольно-вытянутыми фибробластами и коллагеновыми волокнами. Гр.4 – кримпы - волнообразные структуры в наружном слое рубца. Окраска гематоксилин-эозин, увеличение x 200.

Б - Контроль - чётко визуализируется сравнительно рыхлая сеть продольно-ориентированных коллагеновых волокон. Гр.1 –сравнительно широкий слой рубцовой ткани при фазовом контрастировании. Гр.2 - тонкие коллагеновые волокна рыхлого рубца при фазовом контрастировании. Гр.3 – рубец, состоящий из плотно упакованных коллагеновых волокон, мышечная ткань прорастена многочисленными прослойками соединительной ткани. Гр.4 – плотная рубцовая ткань. Хорошо видна структура коллагеновых волокон, составляющих коллагеновые пучки, кримпы. Фазово-контрастная микроскопия, окраска пикросириусом красным, увеличение x 200.

В - Контроль - в слизистой оболочке хорошо видна сеть эластических волокон. Гр.1 – эластические волокна в рубце отсутствуют, в прорастающих в мышцы соединительно-тканых прослойках имеется относительно небольшое количество эластических волокон. Гр.2 - эластические волокна на границе рубца и мышечной оболочки. Гр.3 – Эластические волокна в рубце отсутствуют. Гр.4 – полное отсутствие эластических волокон в рубцовой ткани. Окраска орсеином на эластик, увеличение x 200.

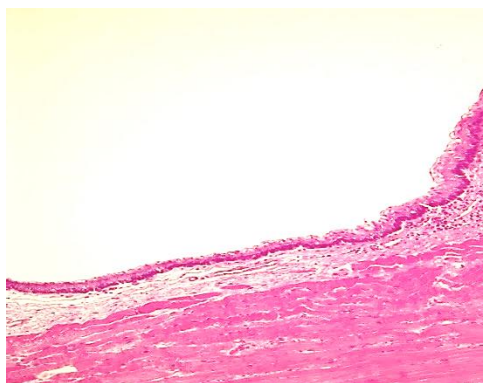


Рисунок – 53. Световая микроскопия препарата рубца голосовой складки после терапии комплексом полиэтиленгликоль-фибринового гидрогеля и МСК

костного мозга человека: визуализируется рыхлая тонкая рубцовая ткань. Окраска гематоксилин-эозин, увеличение $\times 200$.

В рубцах голосовых складок, развившихся на месте послеоперационной травмы, во всех опытных группах толщина эпителия не имела существенных различий, эти наблюдения подтверждаются полуколичественной оценкой морфологических признаков (критерии атрофия и гипертрофия), сравнение по которым пар групп не выявило значимых различий. Дистрофические изменения эпителия в группах также значимо не различались. Площадь рубцов была наименьшей во 2-й экспериментальной группе (МСК костного мозга человека + ПЭГ-фибриновый гидрогель), балльная оценка выявила значимое уменьшение площади рубца в этой группе, по сравнению с группой 4 (рубцы без имплантации), ($p = 0,011$). По этому же параметру наблюдалась тенденция в уменьшении площади рубцов группы 1 (МСК костного мозга человека), однако в сравнении с рубцами без лечения, различия не достигали статистической значимости ($p = 0,07$). Так же наблюдались различия в архитектонике рубцовой ткани между экспериментальными группами, наиболее заметные между группой 2 и группой 4 (рубцы без имплантации). Во 2-й группе коллагеновые волокна рубца располагались более рыхло, при этом чаще взаимно параллельно, что характерно для строения нормальной слизистой оболочки, в 4-й группе преобладали участки с хаотичным переплетением волокон, а также наблюдалось формирование кримпов - областей с волнистым, плотным и параллельным расположением коллагена, свойственных сухожилиям. Данные изменения отражаются в статистически значимых различиях между группами по критериям нерегулярности архитектоники и плотности коллагеновых волокон, $p = 0,018$ и $p = 0,048$, соответственно. Следует отметить тенденцию к уменьшению выраженности изменений по этим критериям и в экспериментальной группе 1, но различия с рубцами без имплантации статистической значимости не достигли, для критерия нерегулярности коллагеновых волокон $p = 0,228$, для плотности $p=0,06$.

Во всех опытных группах наблюдалось прорастание фиброзной ткани в подлежащую снаружи мышечную ткань, однако в группе рубцов после имплантации комплекса МСК и ПЭГ-фибринового гидрогеля (2-я группа) фиброз мышечной ткани был значимо менее выражен, чем в группе рубцов без имплантации ($p = 0,008$). Больше всего клеточность фибробластов прослеживалась во 2-й группе (медиана выраженности признака «уменьшение клеточности фибробластов» была наименьшей), при этом различия с 4-й группой после поправки на множественное сравнение были близки к порогу значимости для выбранного критерия, ($p = 0,07$). По критериям инфильтрации, васкуляризации и содержанию эластических волокон в рубцах - значимых различий между группами обнаружено не было. Данные анализа критериев, по которым были найдены статистически значимые различия, отображены на Рисунке 54.

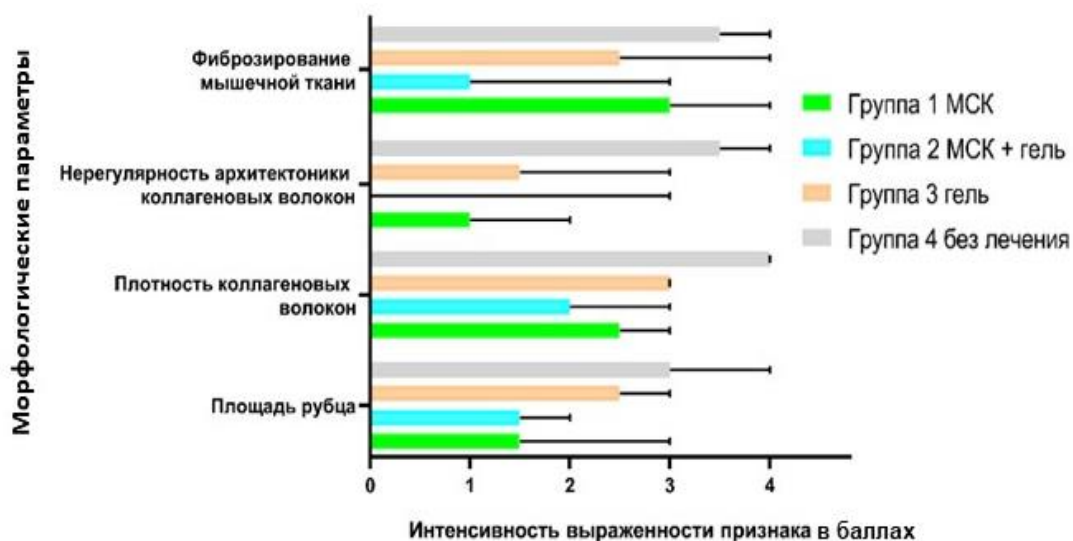


Рисунок – 54. Медианные значения морфологических параметров со статистически значимыми различиями в экспериментальных группах 1-4 по данным балльной оценки.

5.2. Анализ толщины собственной пластинки голосовых складок

При морфометрическом анализе толщины рубцовой ткани (собственной пластинки голосовой складки) в экспериментальных группах и в группе чистого контроля, данные всех групп имели нормальное распределение, наибольшая толщина была выявлена в опытной группе рубцов без имплантации (4-я группа), среднее значение - 564.3 мкм ($\sigma = 191,6$ мкм). В экспериментальных группах 1,2,3 средние значения толщины рубцов были меньше - 290.5 мкм ($\sigma = 46,63$ мкм); 165.2 мкм ($\sigma = 46,19$ мкм); 311.1 мкм ($\sigma = 62,66$ мкм) соответственно. Средняя толщина собственной пластинки в интактных ГС в группе чистого контроля - 184.7 мкм ($\sigma = 55,25$ мкм). Разница была вызвана образованием рубцовой ткани в экспериментальных группах. Статистический анализ показал значимые различия в толщине рубца между экспериментальными группами 1,2,3 при их попарном сравнении с рубцами без имплантации, при этом наибольшие различия наблюдались со 2-й опытной группы, для этой пары $p < 0,0001$. Значимые различия между толщиной собственной пластинки в группе чистого контроля и толщиной рубца во 2-й группе отсутствовали, ($p = 0.995$), а с группами 1 и 3 были близки к порогу статистической значимости $p = 0.2851$ и $p = 0.1179$, соответственно. Визуально данные представлены на Рисунке 55.

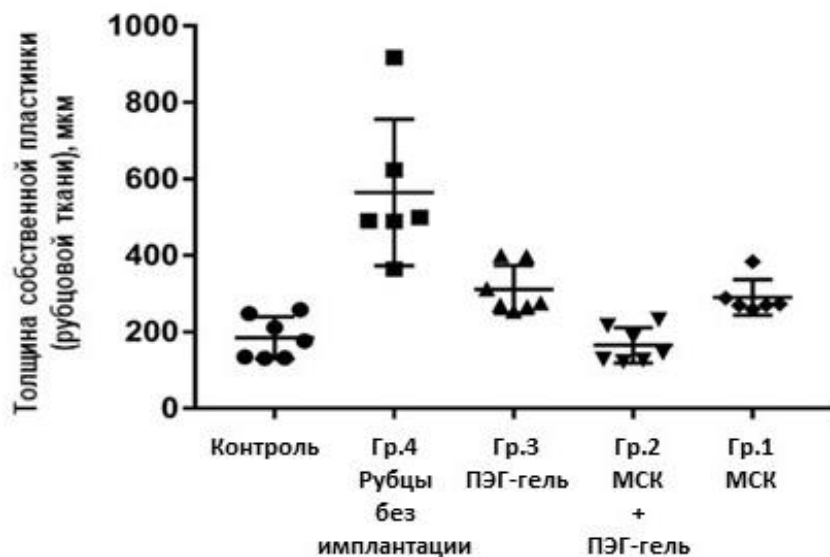


Рисунок – 55. Результаты морфометрического исследования толщины рубцовой ткани в экспериментальных группах 1-4, толщины собственной пластинки в группе чистого контроля. Чёрными фигурами обозначены средние значения измерений каждого образца ГС в группах: кружки - интактных ГС; квадраты - 1-й экспериментальной группы; треугольники с основанием книзу - 2-й экспериментальной группы; треугольники с основанием вверх - 3-й экспериментальной группы; ромбы - 4-й экспериментальной группы. Значения вертикальной шкалы - мкм

Таким образом рубцовая ткань, которая образуется при комбинированной имплантации МСК + ПЭГ-фибринового гидрогеля по своему строению и особенно архитектонике коллагеновых волокон - приближается к строению слизистой оболочке интактных голосовых складок.

5.3. Результаты исследования механических характеристик голосовых складок методом наноидентификации в жидкой среде

Полученные данные показывают, что модуль Юнга интактных голосовых складок составил 1.17 ± 0.45 кПа, что в 2.4-2.6 раз меньше, чем модуль Юнга рубцов ГС без имплантации (экспериментальная группа 4), который был равен 2.97 ± 1.22 кПа, различия являются статистически значимыми ($p \leq 0,05$). В группе, где в качестве метода лечения использовалась суспензия мезенхимных стромальных клеток человека в фосфатно-солевом буфере (экспериментальная группа 1), средний модуль Юнга составил 1.97 ± 0.55 кПа, что статистически значимо выше значений интактных голосовых складок ($p \leq 0,05$), но при этом значимо ниже по сравнению с рубцами без лечения ($p \leq 0,05$). Исследование ГС в группе, где применялся комплекс мезенхимных стромальных клеток человека и полиэтиленгликоль (ПЭГ)-фибринового геля, не выявило статистически значимых различий модуля Юнга, среднее значения которого составили 1.15 ± 0.25 кПа, по сравнению с интактными голосовыми складками ($p=0,898$), в тоже время по сравнению со всеми остальными экспериментальными группами: 1,3,4 - параметры были статистически значимо ниже ($p \leq 0,05$). Значения модуля Юнга в 3-й экспериментальной группе (использование ПЭГ-фибринового геля) находятся в диапазоне 2.06 ± 0.81 кПа, что статистически значимо выше значений интактных ГС и голосовых складок экспериментальной группы 2 ($p \leq 0,05$) и ниже значений экспериментальной группы 4 ($p \leq 0,05$). Также, при сравнении с результатами экспериментальной группы 1 статистически значимых различий выявлено не было. Результаты представлены на Рисунке 56 и в Таблице 7.

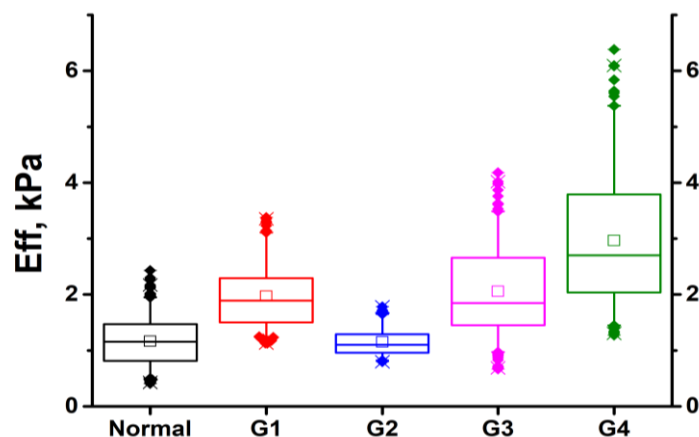


Рисунок – 56. Box-plot график на основе значений модуля Юнга голосовых складок, определенных методом наноиндентирования. Normal – интактные голосовые складки. G1 – группа 1 (суспензия МСК человека). G2 – группа 2 (комплекс МСК человека и ПЭГ-фибринового гидрогеля. G3 – группа 3 (ПЭГ-фибриновый гидрогель). G4 – группа 4 (рубцы голосовых складок без лечения). Шкала – кПа.

Таблица - 7. Статистическая значимость различий модуля Юнга голосовых складок, определенных методом наноиндентирования в жидкой среде.

	Норма	Гр 1	Гр 2	Гр 3	Гр 4
N		-	Не значимы	-	-
Гр 1	+		+	Не значимы	-
Гр 2	Не значимы	-		-	-
Гр 3	+	Не значимы	+		-
Гр 4	+	+	+	+	

Первая строка и первый столбец – экспериментальные группы. Норма – интактные голосовые складки. Гр.1 – группа 1 (суспензия МСК человека). Гр.2 – группа 2 (комплекс МСК человека и ПЭГ-фибринового гидрогеля. Гр.3 – группа 3 (ПЭГ-фибриновый гидрогель). Гр.4 – группа 4 (рубцы голосовых складок без лечения). Зеленым выделены ячейки, в которых модуль Юнга группы в строке

имеет статистически значимое различие с группой столбца; «+» обозначает, что значение группы строки выше значения группы столбца, «-» обозначает, что значение группы строки ниже значения группы столбца. Красным цветом с надписью «Не значимы» показаны пары сравнения, в которых значимые различия модуля Юнга не выявлены.

Результаты данного анализа показывают, что рубцы, формирующиеся на месте дефекта ГС при имплантации МСК в суспензии буферного раствора, в комплексе с ПЭГ-фибриновым гелем и ПЭГ-фибринового геля без клеток имеют меньшую плотность, по сравнению с рубцами без имплантации. В тоже время только во 2-й экспериментальной группе (введение комплекса МСК человека и ПЭГ-фибринового гидрогеля) значения жёсткости ГС в области зажившего дефекта не имели значимых различий с интактными голосовыми складками

5.4. Результаты исследования вибрационной динамики тканей голосовых складок

На разработанной экспериментальной установке с лазерным волоконно-оптическим зондом и исследована вибрационная динамика голосовых складок кроликов, которые возбуждались потоком воздуха с изменяемым давлением. Обнаружено, что при давлении вытекающего воздуха 50 – 60 мм рт.ст. голосовые складки генерируют белый вибрационный шум в интервале частот от 100 Гц до 10 кГц. При уменьшении давления вытекающего воздуха до 10 – 20 мм рт.ст. спектр возбуждаемых вибрационных частот сужается и обнаруживаются три дискретные низшие частоты собственных механических вибраций ГС около 360, 730 и 1100 Гц и одновременно узкие пики в высокочастотной области около 3, 6 и 8 кГц. Лучше всего характерные дискретные частоты колебаний ГС возбуждаются на исходе вытекания воздуха под давлением 1 – 5 мм рт.ст.

При исследовании 2-х образцов гортаней 4-й экспериментальной группы (рубцы без имплантации), обнаружено различие собственных частот возбуждаемых вибраций на низких частотах у интактных (правых) ГС и левых ГС, имеющих дефект в виде рубца. Частоты низших собственных возбуждаемых вибраций у ГС с рубцами были выше по сравнению с интактными ГС (494, 779, 1118 Гц и 540, 770, 1099 Гц) и (360, 750, 1100 Гц и 210, 680, 1064 Гц) соответственно. Повышение частот вибрационных колебаний ГС с дефектом объясняется ростом ее жёсткости, связанной с образованием рубцовой ткани.

Исследование гортаней из 2-й экспериментальной группы (рубцы, после имплантации МСК + ПЭГ-фибринового геля) показало, что нет прямых корреляций в характеристиках определяемых виброчастот во всех исследуемых частотных диапазонах (от ~ 100 Гц до ~ 10 кГц) между левыми ГС (после имплантации) и правыми, интактными ГС, равно как и не обнаружено корреляций при сравнении спектров вибраций между двумя ГС после имплантации МСК + ПЭГ-фибринового геля. Разброс наблюдаемых собственных частот вибраций по всей видимости связан с индивидуальными особенностями вибрационных свойств ГС у разных кроликов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Существенное клиническое значение среди всех доброкачественных заболеваний гортани, приводящих к стойкой потере голоса, имеют рубцовые поражения голосовых складок. Рубцы в гортани, как исход неспецифической воспалительной реакции, могут возникать в результате широкого спектра патологических процессов, в том числе при ятрогенной интубационной и хирургической травме. В тоже время лечение пациентов с рубцовыми повреждениями гортани является одной из самых сложных проблем в ларингологии. В настоящее время не существует метода, позволяющего полноценно восстановить морфологические и вибрационные характеристики голосовых складок и соответственно голосовую функцию при рубцовых повреждениях. Однако в последнее время в мировой оториноларингологии возрос интерес к достижениям регенеративной медицины, в том числе к возможности применения клеточных технологий для восстановления таких дефектов.

Целью данного исследования являлось изучение потенциала мезенхимных стромальных клеток МСК в восстановлении морфологических и механических характеристик поврежденных голосовых складок *in vivo*.

В основе использованной экспериментальной модели хронического рубцового повреждения голосовых складок мы использовали зрелый рубец голосовых складок кролика. Кролики в качестве лабораторных животных использовались в связи с адекватным размером гортани для проведения стандартизованных манипуляций, сравнительной лёгкостью анестезиологического пособия и содержания животных, сходством строения голосовых складок данных животных и человека: строение, качественное и количественное содержание клеток и компонентов межклеточного матрикса не имеет принципиальных различий по сравнению с человеческими ГС [222; 46; 140]. Экспериментальная модель включала два этапа: на первом формировался дефект голосовой складки в виде резекции средней 1/3 голосовой складки,

вторым этапом – через 3 месяца – выполнялась имплантация клеточного продукта путём инъекции во вторичную рану голосовой складки после эксцизии рубца. Следует отметить, что такой подход по данным обзора литературы использовался в небольшом количестве исследований, наиболее частым вариантом является введение клеток в область дефекта после травмы интактной ГС (глава 1.8.1.), тем не менее, несмотря на большую трудоёмкость в связи с двумя операциями, такой дизайн исследования обеспечивает большую релевантность условиям клинической практики, где специалисты сталкиваются с хронической рубцовой патологией и рекомендуют проводить хирургическое лечение не ранее, чем через 6 месяцев после травмы (Mattei A. et al., 2017); [152].

Дискутабельной остается практика введения клеточного продукта непосредственно в рубцовую ткань, либо во вторичную рану ГС после предварительной резекции рубца. С одной стороны, иссечение фиброзной ткани является самостоятельным вариантом лечения рубцов гортани и необходимо в случае их стенозирующих форм, с другой стороны это может вносить риск систематической ошибки при оценке результатов, а в ряде случаев ухудшать конечный эффект терапии за счёт дополнительного увеличения тканевого дефекта [101; 153]. В нашем исследовании перед имплантацией клеточных продуктов мы проводили иссечение рубца, руководствуясь данными, что несмотря на то, что через 2–3 месяца в ГС может продолжаться ремоделирование рубца, репарационные процессы (синтез коллагена и других компонентов межклеточного матрикса, повышение экспрессии про-воспалительных клеточных медиаторов, ферментов, участвующих в реорганизации структуры ткани), являющиеся точкой приложения эффектов МСК (глава 1.3. и 1.8.2) наиболее активно происходят в острый период травмы. Ограничением данной работы является то, что с целью уменьшения продолжительности операции мы выполняли удаление рубцовой ткани вместе с эпителием, в то время, как в клинической практике резекция рубца проводится подслизисто, однако данная особенность если и имеет влияние на результат восстановления, то только в сторону ухудшения за счёт большего рубцевания вторичного дефекта по

сравнению с однократной травмой [23; 91; 40; 147; 213; 43; 191; 233; 146; 129; 134; 163].

Обработка эндоларингеального доступа для формирования дефекта ГС с целью последующей идентификации и резекции развившейся на его месте рубцовой ткани, а также подбор необходимого для этого инструментария входило в задачи исследования. По данным литературы, чаще всего дефект ГС создаётся с помощью холодного микроинструментария, коагулятора или лазера, травма ГС наносится в области передней и средней третей до поверхностных слоев щиточерпаловидной мышцы [152; 234]. Тем не менее представленных в литературе данных и фотографий недостаточно для обеспечения воспроизводимости этого этапа эксперимента, в наибольшей степени это касается соотношения размеров травмы и последующей идентификации границ рубца при эндоларингеальном доступе в тех работах, где имплантация продукта проводилась в рубец или дефект после его резекции [215; 119; 129; 118; 230]. В нашей работе показано, что оптимальным для прямой ларингоскопии гортани кроликов является использование модифицированного трахеоскопа, укороченного до 14 см, конец которого заужен и расположен под углом 45° книзу, таким образом чтобы отверстие дистального края была в форме эллипса диаметром $1,3 \times 0,8$ см и с удалённой верхней частью канала трахеоскопа на половину окружности от начала инструмента на 9,5 см для облегчения подвода инструментов. Так же успешным и удобным для манипуляций было использование прямой ларингоскопии с помощью неонатологического клинка для оротрахеальной интубации по Miller C № 1, длиной 10 см. Визуальный контроль осуществлялся с помощью эндоскопа 0° диаметром 4,0 мм, длиной 18 см либо диаметром 2,7 мм, длиной 11 см. Для создания дефекта ГС эндоларингеальные микрощипцы длиной 18 см с диаметром захватывающей поверхности 2 мм, используемые в педиатрической хирургической практике оказались наиболее удобным и безопасным инструментом, так как рукоятка инструмента находилась ближе к животному, чем эндоскопическая камера, что позволяло свободно проводить манипуляции без снижения качества визуализации. По нашим данным

резекция слизистой оболочки, среднего и глубокого слоя собственной пластинки ГС на протяжении 1/3 голосовой складки с отступом 3 мм от передней комиссуры через 3 месяца приводила к формированию рубца, который легко идентифицировался при осмотре как визуально, так и при дотрагивании щипцами за счёт большей плотности по сравнению с окружающими тканями, дефект меньшего размера (однократное выкусывание участка голосовой складки в области средней трети) оказалось недостаточным, при контрольной ларингоскопии через 3 месяца – рубец практически не визуализировался.

В зависимости от источника МСК работа была разделена на две части. В первой части применялись аутологичные (собственные) МСК животных из костного мозга, во второй части – ксеногенные МСК костного мозга человека. Выбор источника клеток обусловлен тем, что МСК костного мозга – один из наиболее хорошо изученных типов клеток, в связи с чем, технологии с использованием данного типа клеток имеют наибольшие перспективы быстрой трансляции в клиническую практику. Кроме того, продолжающиеся активные экспериментальные исследования на фоне единичных пилотных клинических испытаний различных международных коллективов по восстановлению рубцовых повреждений гортани с помощью МСК говорят о не полном раскрытии их потенциала в этом отношении [152; 33; 135; 234; 100; 226; 101; 153]. Мы изучали аутологичные и ксеногенные клетки из одного источника (костный мозг), на одной экспериментальной модели, хирургические этапы выполнялись идентичным образом на всех животных, что отражает основную стратегию доклинических и клинических испытаний по медицинским продуктам на основе стволовых клеток, согласно которой в доклинических исследованиях должен использоваться тот вид и источник клеток, который планируется к применению в клинической практике, а в случаях, где это нецелесообразно – гомологичный продукт; в данном случае аутологичные МСК костного мозга кроликов являются гомологичным продуктом по отношению к человеческим костномозговым МСК [181]. По данным литературы, в таком варианте дизайна - наше исследование выполнено впервые. При этом целенаправленное сравнение результатов

восстановления повреждений ГС с помощью аутологичных и человеческих МСК между собой в нашей работе не входило в задачи исследования ввиду очевидного несоответствия биологической совместимости ксеногенного и аутологичного продукта. В экспериментах с МСК человека мы не использовали иммуносупрессирующую терапию, опираясь на исследование Kim Y. M. и соавторов (2014), в котором имплантация МСК человека жировой ткани в ГС кролика без использования иммуносупрессантов не вызывала иммунологических реакций, что по мнению авторов связано с иммуно-привилегированными свойствами МСК и их способностью ограничивать интенсивность воспалительного процесса, на что также есть указания в ряде работ [231; 44; 133; 194]. В исследованиях Svensson B. (2011) продемонстрировано, что использование такролимуса в качестве иммуносупрессанта снижает антифибротические эффекты МСК человека при их имплантации в повреждённые ГС кролика [216].

Первая часть работы (аутологичные МСК) включала 2 экспериментальные группы: 6 голосовых складок с рубцовыми дефектами без лечения (экспериментальная группа 1) и 6 голосовых складок с введенной во вторичную рану суспензией аутологичных МСК. Дополнительно, 6 интактных ГС были взяты из биобанка и оценивались в качестве группы чистого контроля. Для каждого животного группы с имплантацией аутологичные МСК были получены и накоплены из костно-мозгового резерва между двумя операциями.

Во второй части исследования использовались ксеногенные МСК костного мозга человека в суспензии (группа 1), их комплекс с ПЭГ-фибриновым гидрогелем (группа 2), в контрольных группах вводился фибриновый гидрогель без клеток (группа 3) и физиологический раствор (группа 4). Таким образом, всего - 4 экспериментальные группы, по 6 животных в каждой. Аналогично первой части работы, в качестве группы чистого контроля 6 интактных голосовых складок были взяты из биобанка. Для исследования распределения и сохранения МСК человека в голосовых складках в ранние сроки после имплантации, дополнительно 3 животным была имплантирована суспензия МСК человека,

трансдуцированных лентивирусным вектором, экспрессирующим зелёный флуорисцирующий белок (GFP) и 3 животным – комплекс МСК и ПЭГ-фибринового геля, содержащим аналогичные клетки. Инъекция осуществлялась в дефект голосовой складки, то есть в собственную пластинку и поверхностные слои щиточерпаловидной мышцы. В части исследования с аутологичными МСК объём имплантата составлял 100–150 мкл (1×10^5) МСК, с ксеногенными МСК человека – 500 мкл (5×10^5) МСК. Большой объём вводимого продукта во второй части работы использовался для оценки риска дыхательных нарушений. Дозы от 100 тысяч до 1 миллиона клеток являются наиболее часто используемым количеством в экспериментальных работах по восстановлению ГС, следует отметить, что только в исследовании Bartlett R. S. и соавторов (2016) проводилось сравнение двух доз МСК костного мозга человека 150 и 300 тысяч [143; 236; 215; 169; 119; 123; 129; 118; 34].

Выбор клеточного носителя в экспериментах с МСК человека на основе фибрина связан со следующими положениями. В работе Park H. и соавторов (2010) показано, что в культурах МСК с фибрином и ко-гелями фибрина с гиалуроновой кислотой и коллагеном было обнаружено в два раза большее количество общей ДНК, чем в культурах с коллагеном и гиалуроновой кислотой по отдельности, что говорит о положительном влиянии таких скаффолдов на выживаемость и деление клеток; экспрессия эластина была также значительно выше в клетках, выращенных в гелях на основе фибрина, чем в других группах [171]. В работах Shiba T. L., Goel A. N. и соавторов (2016; 2018) показана успешная имплантация тканеинженерного комплекса на основе МСК жировой ткани и фибрина в острую рану ГС кроликов, восстановленные ГС были способны поддерживать вибрацию, гистологически фиброзные и воспалительные изменения были незначительны [206; 80]. Кроме того, по данным Ремакля М., Эккель Х. Э. (2014) в ларингологии препараты фибрина в качестве гемостатического средства широкого применяются в клинической практике, но наблюдается большой разброс в величине и эффективности гемостаза, а также отмечены их перспективы в качестве среды для доставки лекарств [23].

Непосредственно ПЭГ-фибриновый гель использовался в связи с его более выраженным благоприятным влиянием на ангиогенез, распространение, рост и пролиферацию МСК и фибробластов за счёт гомогенно распределенных гибких фибрилл с меньшим пространством между ними, по сравнению с нативным фибрином по данным *in vitro* исследований. Такая модификация фибринового скаффолда в исследованиях по восстановлению ГС *in vivo* в нашей работе применена впервые [82; 208; 209].

При подкожной имплантации ПЭГ-фибринового геля лабораторным крысам в нашей работе показано, что в первую неделю данный имплантат не вызывает воспалительной реакции и сохраняет свою целостную структуру, практически не подвергаясь биодеградации, на 7-е сутки в ткань имплантата начинают вращать тонкостенные сосуды, а также тяжи грануляционной ткани, разделяя его на отдельные полосы. Эти данные также повлияли на выбор ПЭГ-фибринового геля в качестве клеточного носителя при проведении операций на ГС.

В исследовании с МСК человека - интраоперационно полуколичественным методом (балльная шкала) - определялась интенсивность кровотечения, в раннем послеоперационном периоде оценивались длительность и интенсивность стридорозного дыхания, ЧДД, сроки восстановления питания и активности животных. В группах, где использовался ПЭГ-фибриновый гель, выявлена статистически значимая меньшая интенсивность кровотечения во время операции, при этом время вмешательства практически не имело различий между группами, несмотря на подготовку двухкомпонентного препарата при использовании фибринового скаффолда. Также по данным исследования интенсивности, длительности стридорозного дыхания, ЧДД, восстановления питания и активности животных на 1-е сутки после операции не получено каких-либо статистически значимых различий между группами, что свидетельствует об отсутствии более высокого риска нарушений дыхания или глотания по сравнению с инъекцией эквивалентного объёма физиологического раствора. Следует отметить, что оценка кровотечения и раннего послеоперационного периода в экспериментальных исследованиях по восстановлению ГС методами

регенеративной медицины, по данным литературы, ранее не проводилась, несмотря на возможность потери клеток из места имплантации при кровотечении и непредсказуемость риска развития реактивного отёка и миграции имплантатов при исследовании новых биоматериалов.

Для оценки сохранения и распределения МСК человека в голосовых складках на 3-й день после имплантации, препараты ГС с имплантированными трансдуцированными клетками в суспензии и ПЭГ-фибриновом геле были исследованы на конфокальном микроскопе. Выявлено, что на ранних сроках (3-й день) МСК человека сохраняются в месте имплантации в голосовых складках кролика. В эти сроки МСК человека локализуются в тканях, непосредственно окружающих дефект голосовой складки кролика, и не распространяются в другие отделы голосового отдела гортани, при этом введение МСК костного мозга человека, иммобилизованных в ПЭГ-фибриновом гидрогеле, обеспечивало более высокую концентрацию клеток в месте повреждения. Данные результаты могут быть интерпретированы с двух позиций: 1) ПЭГ-фибриновый гель способствует выживанию и миграции клеток благодаря благоприятному микроокружению, что коррелирует с данными *in vitro* исследований; 2) МСК сохраняются в месте имплантации за счёт уменьшения их потери при кровотечении во время операции, благодаря гемостатическому эффекту фибринового скаффолда. В исследовании Choi J. W. и соавторов (2014) также отмечено, что имплантация МСК в комплексе с подслизистой основой тонкого кишечника в рану ГС способствует лучшему сохранению клеток на протяжении 8 недель наблюдения, по сравнению с суспензией МСК в растворе [56]. Аналогично в работе Hertegård S и соавторов (2019) имплантация костномозговых МСК человека в геле гиалуроновой кислоты в повреждение ГС кроликов значительно уменьшала утечку клеток после введения [99].

Через 3 месяца все животные в исследовании с аутологичными МСК и МСК человека выводились из эксперимента, подготавливались образцы голосовых складок, которые направлялись на оценку морфологических и биомеханических свойств.

По данным морфологического исследования было показано, аналогично работам других авторов, что голосовые складки кролика не имеют принципиальных гистологических отличий от голосовых складок человека. Во всех опытных группах в обеих частях работы у животных гистологическое исследование выявило рубцы слизистой оболочки, развившиеся на месте операционного дефекта. После клеточной терапии аутологичными МСК наблюдалось уменьшение площади рубцов и их разрыхление, по сравнению с рубцами без лечения. Важно отметить отличия в архитектонике рубцовой ткани: коллагеновые волокна после терапии МСК тоньше и, кроме того, имеют продольное и взаимно параллельное строение, по сравнению с нерегулярно переплетающимися волокнами в рубцах контрольной группы. В этом отношении рубцовая ткань после лечения аутологичными МСК значительно ближе стоит к нормальной структуре слизистой оболочки, чем к рубцовой ткани без имплантации МСК. По данным полуколичественной оценки морфологических признаков, отличающих рубцовую ткань от интактной голосовой складки между группами были получены статистически значимые различия в показателях инфильтрации, снижения количества фибробластов, дезорганизации и плотности коллагеновых волокон, с преобладанием степени отличий от нормы в группе рубцов без имплантации. Также в группе рубцов, после инъекции МСК наблюдалась заметная количественная тенденция уменьшения толщины рубцовой ткани по сравнению с контролем.

Похожие данные, заключающиеся в уменьшении воспаления, общего уровня фиброза, снижении депозитов коллагена и толщины рубца, а также восстановлении содержания эластических волокон, гиалуроновой кислоты и других компонентов межклеточного матрикса при имплантации МСК жировой ткани и костного мозга, фибробластов, эмбриональных и индуцированных стволовых клеток а также их комбинаций с различными скаффолдами, показаны в целом ряде работ [236; 169; 58; 123; 34; 230; 217; 133; 125; 175; 56; 163]. Тем не менее как было отмечено в главе 1.9, прецизионный сравнительный анализ данных между собой осложняется чрезвычайно широким спектром дизайнов

исследований. Также в работах, посвященных влиянию стволовых клеток на процессы рубцевания голосовых складок при повреждениях, для оценки общего уровня фиброза применяется балльная оценка, при этом не учитываются все остальные морфологические компоненты, в том числе показатели инфильтрации, васкуляризации, количество фибробластов и др [99; 217]. В связи с чем в нашей работе мы использовали полуколичественный анализ по 11 критериям с последующей статистической обработкой, объективно показывающий различия между рубцами, сформировавшимися без имплантации и в присутствии МСК.

Коллаген III типа описывается как важный компонент белков экстрацеллюлярного матрикса ГС, который определяется во всех слоях собственной пластинки, в то время как коллаген I типа преимущественно локализуется в поверхностных и глубоких слоях. [218]. В исследованиях, посвященных влиянию стволовых клеток на регенерацию ГС при повреждениях (Hertegard S. et al., 2006; Cedervall J. et al., 2007; Svensson B. et al., 2010; Kim Y. M. et al., 2013; 2014; Hu R. et al., 2014), с помощью иммуногистохимии проводился сравнительный анализ содержания коллагена I типа: согласно результатам, в рубцах ГС после клеточной терапии наблюдалось снижение его относительного количества [102; 123; 133; 49; 215; 134]. Оценка коллагена I типа, как основного компонента рубца, безусловно важна, однако для изучения репарации голосовой складки, степени восстановления ее нативной морфологии, на наш взгляд, не менее принципиально содержание коллагена III типа. Важным для нас было именно сравнение соотношения обоих типов коллагена в голосовых складках после клеточной терапии. Известно, что рубцовая ткань преимущественно состоит из коллагена I типа и значительно теряет коллаген типа III. Это связано с повышенной продукцией коллагена и коллагеназ и высокой тропностью последних к коллагену III типа. Высокий показатель отношения содержания коллагена типа I к коллагену типа III говорит об измененной архитектонике ткани, причиной которой может стать повреждение или процесс старения [55]. По данным нашей работы в группе чистого контроля (интактные ГС) наблюдалась неразличимая разница в интенсивности и распространенности окрашивания

коллагенов I и III типов, а в группе рубцов без имплантации содержание коллагена III типа было на 45,5% ниже, чем коллагена I типа. В то же время в группе рубцов после инъекции аутологичных МСК и интактными голосовыми складками не было выявлено статистически значимых различий в интенсивности окрашивания коллагена III-го типа, а его содержание в этой группе было выше на 16,8%, чем содержание коллагена I типа. Таким образом, в рубцах после имплантации МСК наблюдалась нормализация количественного соотношения двух типов коллагена (I и III).

В исследовании с ксеногенными МСК костного мозга человека морфологическое исследование показало, что в группе, где использовался комплекс ПЭГ-фибринового гидрогеля с МСК костного мозга человека, отмечалось более выраженное уменьшение общей площади и толщины рубцовой ткани на месте послеоперационного дефекта по сравнению с группами, где были использованы МСК костного мозга человека в суспензии, ПЭГ-фибриновый гидрогель без клеток, либо имплантации не проводилось. В этой группе (2-я экспериментальная группа) коллагеновые волокна и фибробласты в основном имели продольную ориентацию, у некоторых животных рубцовая ткань была рыхлая и по плотности расположения коллагена не отличалась от интактной слизистой ГС. При оценке морфологических критериев выявлены достоверные различия между опытной группой МСК + ПЭГ-фибриновый гель и группой рубцов без лечения по следующим морфологическим признакам: площадь рубца, нерегулярность архитектоники коллагеновых волокон, плотность коллагеновых волокон, фиброз мышечной ткани, с преобладанием альтерации в группе контроля. Следует отметить тенденцию к уменьшению выраженности изменений по критериям площади рубца, нерегулярности и плотности коллагеновых волокон и в группе МСК в суспензии, но различия с рубцами без имплантации статистической значимости не достигли. Исследование толщины собственной пластинки ГС выявило статистически значимое уменьшение толщины рубца у всех трёх опытных групп, где проводилось лечение при их попарном сравнении с группой рубцов без лечения, при этом наибольшие различия наблюдались со 2-й

опытной группой (МСК + ПЭГ-фибриновый гель). Таким образом рубцовая ткань, которая образуется при комбинированной имплантации, по своему строению в особенности в отношении архитектоники коллагеновых волокон приближается к строению слизистой оболочке интактных ГС.

Механические параметры голосовых складок непосредственно отражаются на характеристиках голоса: нарушение генерации волн слизистой оболочки и вибрации голосовых складок при рубцовых повреждениях является результатом повышения ригидности тканей и изменения их формы. В связи с этим во многих работах им уделяется особое внимание, где доминирующим по частоте использования методом оценки механических свойств является параллельная реометрия [102; 217; 215; 134; 56]. Так, в работах Svensson В. и соавторов (2010) и Kim Y.M. и соавторов (2013) методом параллельной сдвиговой реометрии показано, что регенерация повреждений голосовых складок в присутствии костномозговых МСК приближает их механические свойства (динамическая вязкость и модуль упругого сдвига) к их значениям в интактной слизистой оболочке [215; 134]. Несмотря на то, что параллельная реометрия уверенно показывает статистические различия в параметрах динамической вязкости и модуля упругого сдвига между экспериментальными группами, она предполагает работу с макро-образцом голосовой складки, исключая при этом прецизионный анализ характеристик структуры собственной пластинки голосовых складок и белков межклеточного матрикса. В тоже время в целом ряде работ указывается на значительный вклад непосредственно микроархитектоники коллагеновых фибрилл в механические свойства тканей ГС и их нарушение при рубцевании [159; 222; 190; 189; 97].

Таким образом, вопросы влияния клеточной терапии на процессы коллагенообразования, его ремоделирования при рубцевании и, как следствие, механику голосовых складок часто остаются открытыми. Для углубленного изучения морфологии и механических свойств собственной пластинки голосовых складок в норме активно применяется метод, относящийся к группе зондовых – атомно-силовая микроскопия (АСМ). [159; 96; 97; 210]. Согласуясь с этими

данными, мы также отдали предпочтение АСМ для анализа упаковки и толщины коллагеновых фибрилл, а также их механических свойств, после имплантации в рану голосовой складки аутологичных МСК. Рубцы после клеточной терапии по сравнению с рубцами без имплантации имели меньшую толщину коллагеновых волокон и их пучков по данным оптической микроскопии, а по данным АСМ выявлена тенденция к меньшей толщине составляющих их фибрилл.

Ещё одним важным отличием является то, что в рубцах без лечения рубцовая ткань представлена в основном плотно переплетающимися элементами на ультраструктурном уровне. Особенно переплетаются коллагеновые волокна, состоящие из фибрилл и пучки коллагеновых волокон, что отчетливо видно как на световой микроскопии, так и на АСМ. В тоже время в рубце, созревающем при влиянии МСК, переплетение волокнистых структур на разном уровне выражено значительно меньше, в большей степени имеется однонаправленность фибрилл в волокнах и волокон в пучках и самих коллагеновых пучков между собой. Это в значительной степени приближает архитектонику коллагеновых волокон, микро- и ультраструктуру слизистой оболочки ГС после клеточной терапии к морфологической структуре интактных складок.

В нашем исследовании метод АСМ выявил статистически значимое повышение эластического модуля Юнга в экстрацеллюлярном матриксе рубцов голосовых складок в группе без введения стволовых клеток, в то же время значения этого параметра в группе с рубцами, регенерация которых происходила на фоне имплантированных аутологичных МСК не имели значимых отличий от нормальной слизистой оболочки. Это, очевидно, непосредственно связано с обширными областями сверхплотной упаковки фибрилл в группе рубцов без имплантации и переплетениями коллагеновых волокон между собой и возвращением к структуре, напоминающей исходную, в группе рубцов после имплантации МСК. Последнее коррелирует с данными оценки эластических свойств макрообразцов в исследованиях других авторов и свидетельствуют о том, что восстановление механических свойств ткани голосовых складок с помощью

МСК вероятно происходит за счет нормализации архитектоники внеклеточных структурных белков, в частности коллагеновых волокон.

Однако в связи с тем, что АСМ проводилась на фиксированных, а не на нативных препаратах, полученные данные модуля Юнга свидетельствуют лишь о достоверных различиях в ригидности между сравниваемыми группами, но не показывают абсолютные механические свойства тканей. Для получения истинных абсолютных значений механических параметров целесообразно использовать методы индентирования, которые позволяют работать с нативным образцом ткани и картировать механические свойства, то есть АСМ в жидкости или наноиндентирование.

В связи с этим во второй части работы (исследование с МСК костного мозга человека) оценка локальных механических характеристик голосовых складок в области повреждения проводилась методом наноиндентирования в жидкой среде. По результатам исследования модуль Юнга, в данном случае отражающий жёсткость рубцовой ткани во всех группах после имплантации, был статистически значимо меньше, чем в контрольной группе, что говорит о формировании более эластичной ткани на месте дефекта, при этом в группе комбинированной имплантации (МСК + ПЭГ-фибриновый гель) модуль Юнга был значимо ниже по сравнению с остальными группами лечения и не имел статистически значимых различий с показателем интактных голосовых складок, что свидетельствует о восстановлении вязко-эластических упругих свойств ГС. Отличием данной оценки является измерение механических характеристик непосредственно слизистой оболочки в области рубца на нативном препарате ГС, что снижает риск недостоверных показаний в результате аутолитических процессов и фиксации образцов.

Для анализа вибрационных свойств голосовых складок в настоящее время в экспериментах используется высокочастотная съемка вибрации голосовых складок макропрепарата гортани с последующей оценкой амплитуды волны слизистой оболочки [206; 169; 133; 56]. С использованием видеокимографии Kim Y. M. и соавторов (2014) и Ohno S. и соавторы (2011) продемонстрировали

положительное влияние стволовых клеток на восстановление амплитуды колебаний в рубцовой слизистой голосовой складки [169; 133]. Однако наряду с амплитудой колебаний голосовых складок, крайне важным параметром является и частотный анализ вибраций. Учитывая активное развитие технологий регенеративной медицины в оториноларингологии, различными международными группами продолжается поиск и разработка универсального и неинвазивного метода диагностики вибрирующих тканей ЛОР органов, в ряде работ показаны перспективы использования лазерной виброметрии для оценки колебаний голосовых складок, однако такая оценка в экспериментах по восстановлению ГС методами регенеративной медицины по данным литературы не применялась [50; 148]. Для реализации этой цели в нашей работе была разработана волоконно-оптическая система мониторинга вибрационной динамики тканей с бесконтактной системой регистрации вибраций при звуковых возбуждениях. Основная проблема анализа вибрационных свойств ГС заключается в определении базовых параметров оптических сигналов-откликов, несущих прямую информацию о состоянии каждой конкретной исследуемой интактной ткани, а также параметров исследуемой ткани при патологических изменениях на различных стадиях проводимой терапии. Исследование выявило уверенное повышение вибрационных частот ГС с рубцами по сравнению с интактными ГС, что связано с повышением жёсткости фиброзной ткани и коррелирует с данными морфологического исследования и результатами определения механических свойств методом наноидентирования. В тоже время важно учитывать выявляемый при исследовании высокий уровень индивидуальности оптических сигналов-откликов ткани разных особей, прежде всего, определяющийся при анализе спектров мощности оптических откликов. Каких-либо прямых корреляций в характеристиках определяемых виброчастот во всех исследуемых частотных диапазонах между ГС после имплантации комплекса МСК и ПЭГ-фибринового геля и интактными ГС обнаружено не было. Это с одной стороны свидетельствует о гетерогенности свойств тканей ГС в области дефекта после терапии МСК и, следовательно, заключение о состоянии архитектоники ГС после лечения

необходимо оценивать по анализу оптических сигналов-откликов, зафиксированных от пространственно разнесенных участков поверхности ткани; с другой стороны - позволяет предполагать сходность вибрационных характеристик леченных и интактных ГС у конкретного животного.

Таким образом, по совокупности результатов проведенных экспериментов, можно говорить, что мезенхимные стромальные клетки костного мозга обладают свойствами увеличивать степень регенерации тканей голосовых складок при рубцовых повреждениях голосового отдела гортани.

ПЕРСПЕКТИВЫ ВНЕДРЕНИЯ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ В КЛИНИЧЕСКУЮ ПРАКТИКУ

Регенеративная медицина – это активно развивающаяся область, которая открывает новые перспективы в лечении заболеваний, для которых отсутствуют, либо малоэффективны существующие способы. Интерес к её возможностям, обусловленный научным прогрессом, значительно увеличился за последние несколько лет, так по данным Альянса Регенеративной медицины, в 2020 году в мире проводится 1220 клинических исследований I-III фаз (более 90 тысяч пациентов) с применением продуктов и подходов, относящихся к данной области, среди которых в 368 исследованиях используется клеточная терапия [30].

Клеточная терапия подразумевает использование клеточных продуктов, содержащих живые клетки, в связи с чем механизмы внедрения данных методов лечения в клиническую практику не аналогичны таковым для новых хирургических техник и традиционных лекарственных препаратов. Это связано со сложными вопросами оценки безопасности, технологиями забора, накопления подготовки, имплантации клеток, влиянием социальных, этических и экономических факторов. Поэтому наряду с накоплением научных данных об эффективности происходит непрерывное становление и совершенствование

нормативно-правовой базы, регламентирующей исследования и применение в клинике методов регенеративной медицины и, в частности клеточной терапии.

Фактически термины «клеточные технологии» или «клеточная терапия» с позиции законов в мире представлены понятием «клеточный продукт» (лекарственные препараты передовой терапии - в странах Европейского союза, продукты клеточной и генной терапии – в США), которые должны применяться для лечения после соответствующей регистрации и лицензирования производства. На 2018 год в мире был зарегистрирован 31 препарат, содержащий жизнеспособные клетки человека, из которых 7 - мезенхимные стромальные клетки [13]. Несмотря на существенные различия в законодательстве разных стран, можно выделить некоторые общие тенденции: 1) разделение клеточных продуктов на продукты, содержащие аллогенные клетки, предназначенные для серийного производства и применения у многих пациентов, и продукты, содержащие аутологичные клетки, изготавливаемые для применения конкретным больным; 2) стратификация клеточных продуктов по риску нежелательных эффектов на основании источника клеток, степени их генетической модификации или других производимых с клетками манипуляций. Такое разделение имеет крайне важное значение, так как регистрация продуктов для серийного производства подразумевает полноценные доклинические и клинические исследования, что существенно удлиняет путь до получения терапии пациентом, несмотря на существующие механизмы ускоренного рассмотрения, такие как Fast Track designation; Regenerative Medicine Advanced Therapy Designation (США); [11; 13] В тоже время для продуктов аутологичного применения, существует механизм «госпитальных исключений» (hospital exemptions), однозначно отражённый в директиве в Европейского парламента № 1394/2007, согласно которому клеточные препараты, изготавливаемые для конкретной клинической ситуации под персональную ответственность лечащего врача не нуждаются в регистрации, что не исключает необходимость соответствия клеточной лаборатории стандартам надлежащей тканевой практики

(Good Tissue Practice, GTP); [11]. Hertegård S., и соавт. (2020) опубликованы результаты пилотного клинического исследования по лечению рубцов голосовых складок у 16 пациентов с помощью аутологичных костномозговых МСК, несмотря на отсутствие зарегистрированного препарата для серийного производства. При полном отсутствии побочных эффектов – у 62–75% пациентов значительно улучшилась вибрация ГС по данным высокочастотной видеоларингоскопии [100].

В нашей стране клиническое применение клеточных технологий приобрело законодательную базу с 2017 года после вступления в силу Федерального закона № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» (БМКП). Для клиницистов ключевым моментом данного акта является понятие клеточной линии, являющейся неотъемлемой частью биомедицинского клеточного продукта: стандартизованная, воспроизводимая популяция клеток, культивируемая вне организма человека. То есть фактически для любого варианта клеточной терапии, в котором используются клетки, накопленные в лабораторных условиях, требуется полная регистрация используемого средства лечения, как биомедицинского клеточного продукта, с прохождением соответствующих доклинических и клинических испытаний и лицензированием его производства. На данный момент понятие «внутрибольничных исключений» в отечественном законодательстве отсутствует, что с одной стороны защищает пациентов от теневого использования аутогенных препаратов, с другой затрудняет накопление данных оценки эффективности в клинических исследованиях.

В отношении результатов нашего экспериментального исследования, мы видим перспективы внедрения в клиническую практику, опираясь на следующие положения. Первое – это возможность получения разрешения на клиническое исследование биомедицинского клеточного продукта, содержащего данный тип клеток; так, в 2021г. уже получено первое разрешение в России на клиническое исследование клеточного продукта для восстановления хряща коленного сустава [157]. Далее – после накопления большего числа зарегистрированных в России

БМКП – возможны появления подзаконных актов, подобных «больничным исключениям» для аутологичных продуктов, и введение понятия минимально манипулированных клеточных продуктов. И наконец, значительный интерес представляет внедрение в клиническую оториноларингологию технологий регенеративной медицины, в которых используются продукты, содержащие МСК в составе выделенной фракции, но не производится культивирование клеток вне организма человека, что, соответственно, не требует процедур, регламентированных ФЗ № 180 «О биомедицинских клеточных продуктах». Так, стромально-вазкулярная фракция жировой ткани применяется в России в ортопедической практике при лечении дегенеративных заболеваний хрящевой ткани суставов [25]. Данный подход показал эффективность и в отношении восстановления рубцов голосовых складок в первом клиническом исследовании, проведенном во Франции (Mattei A. и соавт. 2020); [154].

Таким образом, наше экспериментальное исследование является лишь первым шагом внедрения подходов регенеративной медицины в разработку новых методов лечения пациентов с рубцовыми повреждениями голосового отдела гортани в нашей стране. В то же время проведенные эксперименты свидетельствуют о том, что МСК костного мозга при имплантации в острую фазу раны голосовой складки после иссечения рубца обладают свойствами увеличивать степень их регенерации. С помощью морфологического, иммуногистохимического, исследования, атомно-силовой микроскопии, наноидентификация механических свойств показано: рубцовая ткань голосовых складок, образуемая на месте дефекта по своему строению, особенно архитектуре коллагеновых структур и биомеханическим свойствам приближается к строению нативных голосовых складок, по сравнению с дефектами, репарация которых проходит без введения клеток. Учитывая эти положительные научные результаты, а также непрерывно совершенствующуюся законодательную базу в отношении перспектив трансляции клеточных технологий в клиническую практику присутствует значительный оптимизм.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментальная модель рубцового процесса голосовых складок на лабораторных кроликах является воспроизводимой и позволяет визуально и тактильно идентифицировать рубец ($p < 0,05$).
2. В первую неделю имплантат ПЭГ-фибринового геля не подвергается биодеградации и не вызывает воспалительной реакции со стороны окружающих тканей. Использование ПЭГ-фибринового геля в качестве клеточного носителя снижает интенсивность интраоперационного кровотечения ($p = 0,03945$), не увеличивает риск дыхательных нарушений в раннем послеоперационном периоде (p - от 0,9497 до 1) и уменьшает потерю клеток при имплантации.
3. Имплантация МСК костного мозга в рану после иссечения рубца ГС способствует её регенерации: замещённая ткань морфологически приближается к нативной структуре по сравнению с дефектами, репарация которых происходила без введения клеток. Рубцы после клеточной терапии отличаются меньшей толщиной собственной пластинки ГС ($p = 0,06$ для аутологичных МСК, $p < 0,05$ для человеческих МСК), восстановлением архитектоники коллагеновых структур ($p = 0,086$ – для аутологичных МСК, $p < 0,05$ – для человеческих МСК в комплексе с ПЭГ-фибриновым гелем); восстановлением соотношения коллагена I и III типов ($p < 0,05$ для аутологичных МСК).
4. Рубцы голосовых складок после имплантации МСК костного мозга обладают лучшими локальными вязко-упругими характеристиками по сравнению с рубцами без имплантации и не имеют статистически значимых отличий от интактных голосовых складок ($p = 0,59$ – для аутологичных МСК, $p = 0,898$ – для человеческих МСК в комплексе с ПЭГ-фибриновым гелем).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Усовершенствованная в эксперименте модель рубцового процесса голосовых складок, включающая создание дефекта 1/3 голосовой складки до голосовой мышцы с отступом 3 мм от передней комиссуры и последующей резекцией рубца через 3 месяца, рекомендуется к использованию в дальнейших экспериментальных исследованиях по разработке методов восстановления структуры голосового отдела гортани с помощью технологий регенеративной медицины.
2. Рекомендуется учитывать характеристики имплантируемого клеточного продукта в голосовые складки при рубцовых повреждениях в аспекте возможных прогнозируемых дыхательных нарушений и интраоперационного кровотечения.
3. Полученные результаты восстановления морфологических и механических характеристик голосовых складок с рубцовыми повреждениями с помощью клеточной терапии МСК являются основой для апробации таких технологий в клинической практике и дальнейшей разработки новых методов лечения пациентов с рубцовыми повреждениями голосового отдела гортани.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вавин, В. В. Особенности применения CO₂-лазера при хирургическом лечении хронических рубцовых стенозов гортани. / В. В. Вавин, И. И. Нажмудинов, Х. Ш. Давудов [и др.]. – DOI 10.21518/2079-701X-2020-6-108-113 // Медицинский совет. – 2020. – № 6. – Р. 108–113.
2. Вавин, В. В. Использование CO₂-лазера в эндоларингеальной хирургии постинтубационных стенозов гортани у детей / В. В. Вавин, Х. Ш. Давудов, Т. И. Гаращенко [и др.]. – DOI: 10.20953/1817-7646-2019-5-34-38 // Вопросы практической педиатрии. – 2019. – № 14 (5). – С. 34–38.
3. Вавин, В. В. Микрохирургия хронических постинтубационных стенозов гортани с использованием CO₂-лазера / В. В. Вавин, И. И. Нажмудинов, Х. Ш. Давудов [и др.]. – DOI 10.21518/2079-701X-2020-6-132-138 // Медицинский совет. – 2020. – № 6. – С. 132–138.
4. Вавин, В. В. Этиопатогенетические факторы заживления раны при хронических постинтубационных рубцовых стенозах гортани и трахеи / В. В. Вавин, Д. А. Кузнецова, И. И. Нажмудинов, Х. Ш. Давудов. – DOI 10.17116/otorino20208502178 // Вестник оториноларингологии. – 2020. – № 85 (2). – Р. 78–83.
5. Гаращенко, Т. И. Осложнения интубации трахеи и трахеотомии после длительной искусственной вентиляции легких у детей / Т. И. Гаращенко, Н. Э. Бойкова, М. А. Стройкова, В. Э. Аведисян // Вопросы практической педиатрии. – 2015. – № 10 (5). – Р. 68–72.
6. Гуоров, А. В. Возможности топических препаратов в лечении острого и хронического ларингита и осложнений, возникающих при хирургических вмешательствах на гортани и трахее / А. В. Гуоров, Е. А. Кирасирова, Е. В. Кулабухов [и др.] // Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение. – 2019. – Т. 3, № 2-2. – С. 42–46.
7. Дайхес, Н. А. Клинические рекомендации Парезы и параличи гортани: МКБ 10: J38.0 Возрастная категория: взрослые, дети ID: КР305 Год утверждения: 2016 (пересмотр каждые 3 года) / Н. А. Дайхес, В. Э. Кокорина, И. И. Нажмудинов [и др.]. – С. 16.
8. Егоров, В. И. Папилломатоз гортани у детей: современное состояние проблемы / В. И. Егоров, Д. М. Мустафаев, А. О. Кочнева. – DOI 10.17116/otorino20188305184 // Вестник оториноларингологии. – 2018. – № 83 (5). – С. 84–90.
9. Зенгер, В. Г. Хирургия повреждений гортани и трахеи / В. Г. Зенгер, А. Н. Наседкин, В. Д. Паршин. – М. : Медкнига, 2007. – 364 с. – С. 30–31.
10. Кирасирова, Е. А. Современные аспекты лечения больных двусторонним параличом гортани в зависимости от длительности заболевания / Е. А. Кирасирова, О. К. Пиминиди, Е. А. Кузина [и др.]. – DOI 10.17116/otorino20178254-8 // Вестник оториноларингологии. – 2017. – № 82 (5). – С. 4–8.

11. Корсаков И.Н. Анализ рынка продуктов регенеративной медицины / И.Н. Корсаков, И.И. Наделяева, И.И. Еремин [и др.]. // Гены & Клетки. - 2017. - Т. XII, № 1. С. 72-89.

12. Крюков, А. И. Современные методы профилактики и терапии осложнений при реконструктивной хирургии у пациентов со стенозом гортани и трахеи / А. И. Крюков, А. В. Гуров, Е. А. Кирасирова, Е. В. Кулабухов. DOI 0.17116/otorino20198406148 // Вестник оториноларингологии. – 2019. – № 84 (6). – С. 48–53.

13. Мельникова, Е.В. Международный опыт нормативно-правового регулирования препаратов, содержащих жизнеспособные клетки человека / Е.В. Мельникова, А.А. Горяев, М.В. Савкина [и др.] – DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-3-150-160 // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2018 – 18(3). С. 150–160.

14. Мустафаев, Д. М. Ранения шеи: обзор литературы / Д. М. Мустафаев, В. И. Егоров. – DOI: 10.18692/1810-4800-2017-3-103-109 // Российская оториноларингология. – 2017. – № 3 (88). – С. 103–109.

15. Нажмудинов, И. И. Варианты хирургического лечения рубцовых стенозов среднего (складкового) отдела гортани / И. И. Нажмудинов, В. В. Вавин, Х. Ш. Давудов [и др.]. – DOI 10.21518/2079-701X-2019-21-118-125 // Медицинский совет. – 2019. – № 21. – Р. 118–125.

16. Павлов, П. В. Оптимизация хирургической тактики при хронических стенозах гортани у детей: автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 14.01.03 / Павлов Павел Владимирович ; Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт уха, горла, носа и речи. – СПб., 2010. – 36 с.

17. Патент на изобретение RU 2153300 С2, 27.07.2000. Способ лечения мембран гортани и эндопротез для его осуществления : заявка № 98114734/14 от 23.07.1998 / Цветков Э. А., Павлов П. В., Попов А. В.

18. Патент на изобретение RU 2458644 С1, 20.08.2012. Способ медиафиксации голосовой складки в лечении больных с односторонними параличами гортани : заявка № 2011131913/14 от 28.07.2011 / Старостина С. В., Мареев О. В., Николенко В. Н.

19. Патент на изобретение RU 2600661 С1, 27.10.2016. Способ лечения рецидивирующего респираторного папилломатоза гортани с наличием рубцовой мембраны голосового отдела : заявка № 2015138440/14 от 09.09.2015 / Свистушкин В. М., Старостина С. В., Волкова К. Б.

20. Патент на изобретение RU 2609777 С, 03.02.2017. Способ послеоперационного протезирования голосового отдела гортани после ларингопластики и стент для его осуществления : заявка № 2016108044 от 09.03.2016.// Крюков А. И., Кунельская Н. Л., Кирасирова Е. А. [и др.]

21. Патент на изобретение RU 2665458 С1, 29.08.2018. Способ ларинготрахеопластики при сочетанных межголосовых и подголосовых стенозах гортани : заявка № 2017140936 от 23.11.2017 / Захарова М. Л., Павлов П. В.

22. Патент на изобретение RU 2729354 С1, 07.08.2020. Способ лечения рубцового стеноза голосового отдела гортани в области передней комиссуры :

заявка № 2019139645 от 05.12.2019 / И. И. Нажмудинов, И. Г. Гусейнов, Х. Ш. Давудов [и др.]

23. Ремакль, М. Хирургия гортани и трахеи / М. Ремакль, Х. Э. Эккель : пер с англ. под ред. Ю. К. Янова. – М. : Изд-во Панфилова, Бином; 2014. – 198 с.

24. Солдатский, Ю. Л. Распространенные ошибки диагностики и лечения детей, страдающих рецидивирующим респираторным папилломатозом / Ю. Л. Солдатский, Е. К. Онуфриева, А. М. Стеклов, Ю. В. Стрыгина // Российская оториноларингология. – 2011. – № 3 (52). – С. 142.

25. Смышляев И.А. Оценка безопасности и эффективности внутрисуставного введения стромально-васкулярной фракции жировой ткани для лечения гонартроза: промежуточные результаты клинического исследования / И.А. Смышляев, С.И. Гильфанов, В.А. Копылов, Р.Г. [и др.] // Травматология и ортопедия России. – 2017. – Т. 23, № 3. – С. 17-31.

26. Старостина, С. В. Анализ встречаемости малых анатомических аномалий гортани среди пациентов с дисфонией / С. В. Старостина. – DOI 10.21518/2079-701x-2016-18-72-75 // Медицинский совет. – 2016. – № 18. – С. 72–75.

27. Старостина, С. В. Новый подход к инъекционной медиализации голосовой складки в лечении больных с односторонними параличами гортани / С. В. Старостина, О. В. Мареев // Российская оториноларингология. – 2011. – № 3 (52). – С. 137.

28. Юнина, А. И. Травмы органов шеи и их осложнения / А. И. Юнина. – М., 1972. – 208 с.

29. Allen, J. Cause of vocal fold scar / J. Allen. – DOI 10.1097/moo.0b013e32833fecd1 // Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery. – 2010. – № 18 (6). – P. 475–480.

30. Alliance for Regenerative Medicine; Growth & Resilience in Regenerative Medicine; 2020; URL: <https://alliancerm.org/sector-report/2020-annual-report/>.

31. Balazs, E. A. The rheological properties and biological function of hyaluronic acid / E. A. Balazs, D. A. Gibbs // Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix / Balazs E. A. (ed). Vol. 3. – New York : Academic Press, 1970. – P. 1241–1253.

32. Ban, M. J. Regenerative Efficacy of Fibroblast Growth Factor for the Treatment of Aged Vocal Fold: From Animal Model to Clinical Application / M. J Ban, S. C. Lee, J. H. Park [et al.]. – DOI 10.1111/coa.13597 // Clinical Otolaryngology. – 2020.

33. Bartlett, R. S. Bioengineering the Vocal Fold: A Review of Mesenchymal Stem Cell Applications / R. S. Bartlett, S. L. Thibeault // Advances in Biomimetics, in Tech / Prof. Marko Cavrak (Ed.). – 2011. – ISBN: 978-953-307-191-6. – URL: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-biomimetics/bioengineering-he-vocal-fold-a-review-of-mesenchymal-stem-cell-applications>.

34. Bartlett, R. S. Mesenchymal stromal cell injection promotes vocal fold scar repair without long-term engraftment / R. S. Bartlett, J. T. Guille, X. Chen [et al.]. – DOI 10.1016/j.jcyt.2016.07.005 // Cytotherapy. – 2016. – № 18 (10). – P. 1284–1296.

35. Belafsky, P. C. Vocal Fold Augmentation with Calcium Hydroxylapatite / P. C. Belafsky, G. N. Postma. – DOI 10.1016/j.otohns.2004.03.025 // Otolaryngology-Head and Neck Surgery. – 2004. – № 131 (4). – P. 351–354.
36. Benninger, M. S. Vocal Fold Scarring: Current Concepts and Management / M. S. Benninger, D. Alessi, S. Archer [et al.] – DOI 10.1177/019459989611500521 // Otolaryngology-Head and Neck Surgery. – 1996. – № 115 (5). – P. 474–482.
37. Bergamini, G. Therapy of Unilateral Vocal Fold Paralysis With Polydimethylsiloxane Injection Laryngoplasty: Our Experience / G. Bergamini, M. Alicandri-Ciufelli, G. Molteni, [et al.]. – DOI 10.1016/j.jvoice.2008.05.003 // Journal of Voice. – 2010. – № 24 (1). – P. 119–125.
38. Boseley, M. E. Development of the Human True Vocal Fold: Depth of Cell Layers and Quantifying Cell Types within the Lamina Propria / M. E. Boseley, C. J. Hartnick. – DOI 10.1177/000348940611501012 // Annals of Otology, Rhinology & Laryngology. – 2006. – № 115 (10). – P. 784–788.
39. Bouchayer, M. Microsurgical Treatment of Benign Vocal Fold Lesions: Indications, Technique, Results / M. Bouchayer, G Cornut. – DOI 10.1159/000266150 // Folia Phoniatica et Logopaedica. – 1992. – № 44 (3-4). – P. 155–184.
40. Branski, R. C. Acute Vocal Fold Wound Healing in a Rabbit Model / R. C. Branski, K. Verdolini, C. A. Rosen, P. A. Hebda. – DOI 10.1177/000348940511400105 // Annals of Otology, Rhinology & Laryngology. – 2005. – № 114 (1). – P. 19–24.
41. Branski, R. C. Effects of Transforming Growth Factor- β 1 on Human Vocal Fold Fibroblasts / R. C. Branski, S. S. Barbieri, B. B. Weksler [et al.] – DOI 10.1177/000348940911800310 // Annals of Otology, Rhinology & Laryngology. – 2009. – № 118 (3). – P. 218–226.
42. Cakir, Z. A. Sulcus vocalis in monozygotic twins / Z. A. Cakir, O. Yigit, I. Kocak [et al.]. – DOI 10.1016/j.anl.2009.03.007 // Auris. Nasus. Larynx. – 2010. – № 37 (2). – P. 255–257.
43. Campagnolo, A. M. Histologic Study of Acute Vocal Fold Wound Healing after Corticosteroid Injection in a Rabbit Model / A. M. Campagnolo, D. H. Tsuji, L. U. Sennes, [et al.]. – DOI 10.1177/000348941011900211 // Annals of Otology, Rhinology & Laryngology. – 2010. – № 119 (2). – P. 133–139.
44. Caplan, A. I. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! / A. I. Caplan. – DOI 10.1002/sctm.17-0051 // Stem Cells Translational Medicine. – 2017. – № 6 (6). – P. 1445–1451.
45. Caplan, A. I. Perspective The MSC : An Injury Drugstore / A. I. Caplan, D. Correa // Cell Stem Cell. – 2011. – Vol. 9, № 1. – P. 11–15.
46. Carneiro, C. G. The rabbit as an experimental model in laryngology / C. G. Carneiro, F. Scapini // Intl. Arch. Otorhinolaryngol. – 2009. – Vol. 13, № 2. – P. 146–150.
47. Carroll, T. L. Long-term results of calcium hydroxylapatite for vocal fold augmentation / T. L. Carroll, C. A. Rosen. – DOI 10.1002/lary.21258 // The Laryngoscope. – 2011. – № 121 (2). – P. 313–319.
48. Catten, M. Analysis of Cellular Location and Concentration in Vocal Fold Lamina Propria / M. Catten, S. D. Gray, T. H. Hammond [et al.]. – DOI 10.1177/

019459989811800516 // Otolaryngology-Head and Neck Surgery. – 1998. – № 118 (5). – P. 663–667.

49. Cedervall, J. Injection of Embryonic Stem Cells Into Scarred Rabbit Vocal Folds Enhances Healing and Improves Viscoelasticity: Short-Term Results / J. Cedervall, L. Ährlund-Richter, B. Svensson, [et al.]. – DOI 10.1097/mlg.0b013e3181379c7c // The Laryngoscope. – 2007. – № 117 (11). – P. 2075–2081.

50. Chan, A. Vocal fold vibration measurements using laser Doppler vibrometry / A. Chan, L., Mongeau, K Kost. – DOI 10.1121/1.4789937 // The Journal of the Acoustical Society of America. – 2013. – № 133 (3). – P. 1667–1676.

51. Chan, R. W. Viscoelastic shear properties of human vocal fold mucosa: Measurement methodology and empirical results / R. W. Chan, I. R. Titze. – DOI 10.1121/1.427947 // The Journal of the Acoustical Society of America. – 1999. – № 106 (4). – P. 2008–2021.

52. Chan, R. W. Viscoelastic shear properties of human vocal fold mucosa: Theoretical characterization based on constitutive modeling / R. W. Chan, I. R. Titze. – DOI 10.1121/1.428354 // The Journal of the Acoustical Society of America. – 2000. – № 107 (1). – P. 565–580.

53. Chan, R. W. Viscosities of Implantable Biomaterials in Vocal Fold Augmentation Surgery / R. W. Chan, I. R. Titze. – DOI 10.1097/00005537-199805000-00019 // The Laryngoscope. – 1998. – № 108 (5). – P. 725–731.

54. Chan, R. W. Vocal Fold Tissue Failure: Preliminary Data and Constitutive Modeling / R. W. Chan – DOI 10.1115/1.1785804 // Journal of Biomechanical Engineering. – 2004. – № 126 (4). – P. 466.

55. Cheng, W. The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury / W. Cheng, R. Yan-hua, N. Fang-gang, Z. Guo-an. – DOI 10.5897/AJB10.1999 ISSN 1684–5315// African Journal of Biotechnology. – 2011. – Vol. 10, № 13. – P. 2524–2529.

56. Choi, J. W. Small intestine submucosa and mesenchymal stem cells composite gel for scarless vocal fold regeneration / J. W. Choi, J. K. Park, J. W. Chang [et al.]. – DOI 10.1016/j.biomaterials.2014.03.008 // Biomaterials. – 2014. – № 35 (18). – P. 4911–4918.

57. Classification of Laryngotracheal Stenosis. – DOI 10.1288/00005537-199212000-00004 // The Laryngoscope. – 1992. – № 102 (12). – P. 1335–1340.

58. De Bonnecaze, G. Adipose stromal cells improve healing of vocal fold scar: Morphological and functional evidences / G. De Bonnecaze, B. Chaput, V. Woisard [et al.]. – DOI 10.1002/lary.25867 // The Laryngoscope. – 2016. – № 126 (8). – P. E278–E285.

59. Dedo, H. H. Histologic Evaluation of Teflon Granulomas of Human Vocal Cords: A Light and Electron Microscopic Study / H. H. Dedo, B. Carlouou. – DOI 10.3109/00016488209130907 // Acta Oto-Laryngologica. – 1982. – № 93 (1-6). – P. 475–484.

60. Dejonckere, P. H. A basic protocol for functional assessment of voice pathology, especially for investigating the efficacy of (phonosurgical) treatments and evaluating new assessment techniques / P. H. Dejonckere, P. Bradley, P. Clemente [et

al.]. – DOI 10.1007/s004050000299 // European Archives of Oto-Rhino-Laryngology. – 2001. – № 258 (2). – P. 77–82.

61. Dikkers, F. Benign Lesions of the Vocal Folds: Clinical and Histopathological Aspects / F. Dikkers. – Groningen : Rijksuniversiteit Groningen, 1994.

62. Dominici, M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller [et al.]. – DOI 10.1080/14653240600855905 // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8 (4), iss. 315–317.

63. Duflo, S. Effect of a synthetic extracellular matrix on vocal fold lamina propria gene expression in early wound healing / S. Duflo, S. L. Thibeault, W. Li [et al.]. – DOI 10.1089/ten.2006.12.3201. – PMID: 17518634 // Tissue Eng. – 2006 Nov. – № 12 (11). – P. 3201–3207.

64. Ehrlich, H. P. Collagen considerations in scarring and regenerative repair / H. P. Ehrlich // Scarless wound healing / H. G. Garg, M. T. Longaker, eds. – New York, NY : Marcel Dekker, 2000. – P. 99–113.

65. Ellis, J. C. Migration of Teflon after Vocal Cord Injection / J. C. Ellis, T. V. Mccaffrey, L. W. Desanto, H. V. Reiman. – DOI 10.1177/019459988709600111 // Otolaryngology-Head and Neck Surgery. – 1987. – № 96 (1). – P. 63–66.

66. Fahy G. M. Dr. William Haseltine on regenerative medicine, aging and human immortality / G. M. Fahy // Life Ext. – 2002. – № 8. – P. 58.

67. Finck, C. L. Implantation of esterified hyaluronic acid in microdissected Reinke's space after vocal fold microsurgery / C. L. Finck, B. Harmegnies, A. Remacle, P. Lefebvre. – DOI 10.1016/j.jvoice.2008.12.01 // J. Voice. – 2010 Sep. – № 24 (5). – P: 626–635.

68. Fisher, K. V. Regulation of vocal fold transepithelial water fluxes / K. V. Fisher, A. Telser, J. E. Phillips, D. B. Yeates. – DOI 10.1152/jappl.2001.91.3.1401 // Journal of Applied Physiology. – 2001. – № 91 (3). – P. 1401–1411.

69. Fishman, J. M. Stem cell approaches for vocal fold regeneration / J. M. Fishman, J. Long, M. Gugatschka [et al.]. – DOI 10.1002/lary.25820 // The Laryngoscope. – 2016. – № 126 (8). – P. 1865–1870.

70. Ford, C. N. Sulcus Vocalis: A Rational Analytical Approach to Diagnosis and Management / C. N. Ford, K. Inagi, A. Khidr [et al.]. – DOI 10.1177/000348949610500304 // Annals of Otology, Rhinology & Laryngology. – 1996. – № 105 (3). – P. 189–200.

71. Friedrich, G. Laryngeal framework surgery: a proposal for classification and nomenclature by the Phonosurgery Committee of the European Laryngological Society / G. Friedrich, F. I. C. R. S. de Jong, H. F., Mahieu [et al.]. – DOI 10.1007/s004050100375 // European Archives of Oto-Rhino-Laryngology. – 2001. – № 258 (8). – P. 389–396.

72. Friedrich, G. Phonochirurgie: einföhrung in die stimmverbessernde kehlkopfchirurgie / G. Friedrich, W Bigenzahn // Gerhard Böhme (ed) Sprach-, Sprech-, Stimm- Und Schluckstörunge. – Vol. 2. – 4 edn. – München : Elsevier GmbH, 2006. – P. 177–189.

73. Friedrich, G. Surgical treatment of glottic stenosis / G. Friedrich // *Otorhinolaryngol Nova*. – 1996. – № 10. – P. 218–220.

74. Friedrich, G. Titanium Vocal Fold Medializing Implant: Introducing a Novel Implant System for External Vocal Fold Medialization / G. Friedrich. – DOI 10.1177/000348949910800112 // *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. – 1999. – № 108 (1). – P. 79–86.

75. Friedrich, G. Vocal fold scars: current concepts and future directions. Consensus report of the Phonosurgery Committee of the European Laryngological Society / G. Friedrich, F. G. Dikkers, C. Arens [et al.]. – DOI 10.1007/s00405013-2498-9 // *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* – 2013. – № 270 (9). – P. 2491–2507.

76. Fukuda, H. A new concept of lubricating mechanisms of the larynx / H. Fukuda, M. Kawaida, T. Tatchara [et al.] // *Vocal Physiology: Voice Production, Mechanisms and Functions* / O. Fujimura (ed). – New York : Raven Press, 1988. – P. 83–92.

77. Gillespie, M. B. Effectiveness of Calcium Hydroxylapatite Paste in Vocal Rehabilitation / M. B. Gillespie, T. S. Dozier, T. A. Day [et al.]. – DOI 10.1177/000348940911800802 // *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. – 2009. – № 118 (8). – P. 546–551.

78. Giovanni, A. Clinical Experience With Gore-Tex for Vocal Fold Medialization / A. Giovanni, J.-M. Vallicioni, R. Gras, M. Zanaret. – DOI 10.1097/00005537-199902000-00020 // *The Laryngoscope*. – 1999. – № 109 (2). – P. 284–288.

79. Giovanni, A. Sulcus vocalis: a review / A. Giovanni, C. Chanteret, & A. Lagier– DOI 10.1007/s00405-006-0230-8 // *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. – 2007. – № 264 (4). – P. 337–344.

80. Goel, A. N. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Persist in Tissue-Engineered Vocal Fold Replacement in Rabbits / A. N. Goel, B. S. Gowda, M. S. Veena [et al.] // *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. – 2018.

81. Golchin, A. Mesenchymal Stem Cell Therapy for COVID-19: Present or Future / A. Golchin, E. Seyedjafari, A. Ardeshirylajimi. – DOI 10.1007/s12015-020-09973-w // *Stem Cell Rev. Rep.* – 2020. – № 16 (3). – P. 427–433.

82. Gorkun, A. A. Angiogenic potential of spheroids from umbilical cord and adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells within fibrin gel / A. A. Gorkun, A. I. Shpichka, I. M. Zurina [et al.]. – DOI 10.1088/1748-605x/aac22d // *Biomedical Materials*. – 2018. – № 13 (4). – P. 044108.

83. Graupp, M. The unsolved chapter of vocal fold scars and how tissue engineering could help us solve the problem / M. Graupp, S. Bachna-Rotter, C. Gerstenberger [et al.]. – DOI 10.1007/s00405-015-3668-8 // *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. – 2015. – № 273 (9). – P. 2279–2284.

84. Gray, S. D. Biomechanical and Histologic Observations of Vocal Fold Fibrous Proteins / S. D. Gray, F. Alipour, I. R. Titze, T. H. Hammond. – DOI 10.1177/000348940010900115 // *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. – 2000. – № 109 (1). – P. 77–85.

85. Gray, S. D. Cellular physiology of the vocal folds / S. D. Gray. – DOI 10.1016/s0030-6665(05)70237-1 // *Otolaryngologic Clinics of North America*. – 2000. – № 33 (4). – P. 679–697.

86. Gray, S. D. Molecular and cellular structure of vocal fold tissue / S. D. Gray, M. Hirano, K. Sato // *Vocal fold physiology: frontiers of basic science* / I. R. Titze, ed. – 1st ed. – San Diego, Calif : Singular Publishing, 1993. – P. 1–34.

87. Gray, S. D. Morphologic ultrastructure of anchoring fibers in normal vocal fold basement membrane zone / S. D. Gray, S. S. N. Pignatari, P. Harding. – DOI 10.1016/s0892-1997(05)80318-2 // *Journal of Voice*. – 1994. – № 8 (1). – P. 48–52.

88. Gray, S. D. Vocal fold proteoglycans and their influence on biomechanics / S. D., Gray, I. R. Titze, R. Chan, T. H. Hammond. – DOI 10.1097/00005537-199906000-00001 // *The Laryngoscope*. – 1999. – № 109 (6). – P. 845–854.

89. Gunjawate, D. R. Acoustic Analysis of Voice in Singers: A Systematic Review / D. R. Gunjawate, R. Ravi, R. Bellur. – DOI 10.1044/2017_jslhr-s-17-0145 // *Journal of Speech Language and Hearing Research*. – 2018. – № 61 (1). – P. 40.

90. Hahn, M. S. Collagen composite hydrogels for vocal fold lamina propria restoration / M. S. Hahn, B. A. Teply, M. M. Stevens, [et al.]. – DOI 10.1016/j.biomaterials.2005.07.022 // *Biomaterials*. – 2006. – № 27 (7). – P. 1104–1109.

91. Hammond, T. H. Age- and gender-related elastin distribution changes in human vocal folds // T. H. Hammond, S. D. Gray, J. Butler [et al.]. – DOI 10.1016/s0194-5998(98)70071-3 // *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*. – 1998. – № 119 (4). – P. 314–322.

92. Hammond, T. H. The intermediate layer: a morphologic study of the elastin and hyaluronic acid constituents of normal human vocal folds / T. H. Hammond, R. Zhou, E. H. Hammond [et al.] // *J. Voice*. – 1997. – № 11. – P. 59–66.

93. Hantzakos, A. Vocal fold scars: a common classification proposal by the American Laryngological Association and European Laryngological Society / A. Hantzakos, F. G. Dikkers, A. Giovanni [et al.]. – DOI 10.1007/s00405-019-05489-3 // *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. – 2019.

94. Hardingham, T. E. Proteoglycans: many forms and many functions / T. E. Hardingham, A. J. Fosang. – DOI 10.1096/fasebj.6.3.1740236 // *The FASEB Journal*. – 1992. – № 6 (3). – P. 861–870.

95. Hartnick, C. J. Development and Maturation of the Pediatric Human Vocal Fold Lamina Propria / C. J. Hartnick, R. Rehbar, V. Prasad. – DOI 10.1097/01.mlg.0000150685.54893.e9 // *The Laryngoscope*. – 2005. – № 115 (1). – P. 4–15.

96. Heris, H. K. Indentation of poroviscoelastic vocal fold tissue using an atomic force microscope / H. K. Heris, A. K. Miri, U. Tripathy [et al.]. – DOI 10.1016/j.jmbbm.2013.05.026 // *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. – 2013. – № 28. – P. 383–392.

97. Heris, H. K. Microstructural and mechanical characterization of scarred vocal folds / H. K. Heris, A. K. Miri, N. R. Ghattamaneni [et al.]. – DOI 10.1016/j.jbiomech.2015.01.014 // *Journal of Biomechanics*. – 2015. – № 48 (4). – P. 708–711.

98. Hertegard, S. Cross-linked hyaluronan versus collagen for injection treatment of glottal insufficiency: 2-year follow-up / S. Hertegard, L. Hallen, C. Laurent [et al.] // *Acta Otolaryngol.* – 2004. – № 124. – P. 1208–1214.

99. Hertegård, S. Hyaluronan for the local delivery of mesenchymal stromal cells to the injured vocal fold / S. Hertegård, S. R. Nagubothu, E. Malmström [et al.]. – DOI 10.1089/scd.2019.0102 // *Stem Cells and Development.* – 2019.

100. Hertegård, S. Treatment of vocal fold scarring with autologous bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells—first phase I/II human clinical study / S. Hertegård, S. R. Nagubothu, E. Malmström [et al.] . – DOI 10.1186/s13287-020-01632-8 // *Stem Cell Res. Ther.* – 2020. – № 11. – P. 128.

101. Hertegård, S. Treatment of vocal fold scarring with autologous bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells-first phase I/II human clinical study: commentary to response / S. Hertegård, K. LeBlanc. – DOI 10.1186/s13287-020-01748-x // *Stem Cell Res. Ther.* – 2020. – № 11 (1). – P. 235.

102. Hertegard, S. Viscoelastic and histologic properties in scarred rabbit vocal folds after mesenchymal stem cell injection / S. Hertegard, J. Cedervall, B. Svensson [et al.]. – DOI 10.1097/01.mlg.0000224548.68499.35 // *Laryngoscope* – 2006. – № 116. – P. 1248–1254.

103. Hipp, J. Sources of Stem Cells for Regenerative Medicine / J. Hipp, A. Atala. – DOI 10.1007/s12015-008-9010-8 // *Stem Cell Reviews.* – 2008. – № 4 (1). – P. 3–11.

104. Hirano, M. Fibroblasts in Human Vocal Fold Mucosa / M. Hirano, K. Sato, T Nakashimas. – DOI 10.1080/00016489950181800 // *Acta Oto-Laryngologica.* – 1999. № 119 (2). – P. 271–276.

105. Hirano, M. Morphological Structure of the Vocal Cord as a Vibrator and its Variations / M. Hirano. – DOI 10.1159/000263771 // *Folia Phoniatica et Logopaedica.* – 1974. – № 26 (2). – P. 89–94.

106. Hirano, M. Phonosurgery: basic and clinical investigations. / M. Hirano // *Otol. Fukuoka* – 1975. – № 21. – P. 239.

107. Hirano, M. Structure and vibratory behavior of the vocal folds / M. Hirano // *Dynamic aspects of speech production* / M. Sawashima, F. S. Cooper, eds. – Tokyo, Japan : University of Tokyo Press, 1977. – P. 13–30.

108. Hirano, M. Structure of the vocal fold in normal and disease states. Anatomical and physical study / M. Hirano // *ASH A. Rep.* – 1981. – № 11. – P. 11-30.

109. Hirano, M. Vocal mechanisms in singing: Laryngological and phoniatic aspects / M. Hirano. – DOI 10.1016/s0892-1997(88)80058-4 // *Journal of Voice.* – 1988. – № 2 (1). – P. 51–69.

110. Hirano, S. A phase I/II exploratory clinical trial for intracordal injection of recombinant hepatocyte growth factor for vocal fold scar and sulcus / S. Hirano, A. Kawamoto, I. Tateya [et al.]. – DOI 10.1002/term.2603. – PMID: 29084372 // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2018 Apr. – № 12 (4). – P. 1031–1038.

111. Hirano, S. Current treatment of vocal fold scarring / S. Hirano. – DOI 10.1097/01.moo.0000162261.49739.b7 // *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery.* – 2005. – № 13 (3). – P. 143–147.

112. Hirano, S. Fibronectin and Adhesion Molecules on Canine Scarred Vocal Folds / S. Hirano, D. M. Bless, B. Rousseau [et al.]. – DOI 10.1097/00005537-200306000-00010 // *The Laryngoscope*. – 2003. – № 113 (6). – P. 966–972.

113. Hirano, S. Histologic Characterization of Human Scarred Vocal Folds / S. Hirano, S. Minamiguchi, M. Yamashita [et al.]. – DOI 10.1016/j.jvoice.2007.12.002 // *Journal of Voice*. – 2009. – № 23 (4). – P. 399–407.

114. Hirano, S. Intracordal Injection of Basic Fibroblast Growth Factor in 100 Cases of Vocal Fold Atrophy and Scar / S. Hirano, Y. Sugiyama, M. Kaneko [et al.]. – DOI 10.1002/lary.29200. – PMID: 33107605 // *Laryngoscope*. – 2020 Oct 27.

115. Hirano, S. Regenerative Effects of Local Injection of Basic Fibroblast Growth Factor into the Vocal Fold Atrophy and Scarring: Results of 60 Cases / S. Hirano, M. Kaneko, Y. Kishimoto // *Ann. Clin. Otolaryngol.* – 2016. – № 1. – P. 1005.

116. Hirano, S. Roles of hepatocyte growth factor and transforming growth factor beta1 in production of extracellular matrix by canine vocal fold fibroblasts / S. Hirano, D. Bless, D. Heisey, C. Ford // *Laryngoscope*. – 2003. – № 113. – P. 144–148.

117. Hirsch, J. A. Effects of dry air and subsequent humidification on tracheal mucous velocity in dogs / J. A. Hirsch, J. L. Tokayer, M. J. Robinson, M. A. Sackner // *J. Appl. Physiol.* – 1975 Aug. – № 39 (2). – P. 242–246.

118. Hiwatashi, N. Adipose-derived stem cells versus bone marrow-derived stem cells for vocal fold regeneration / N. Hiwatashi, S. Hirano, M. Mizuta [et al.]. – DOI 10.1002/lary.24816 // *The Laryngoscope*. – 2014. – № 124 (12). – P. E461–E469.

119. Hiwatashi, N. Comparison of ASCs and BMSCs combined with atelocollagen for vocal fold scar regeneration / N. Hiwatashi, S. Hirano, R. Suzuki, [et al.]. // *The Laryngoscope*. – 2015. – № 126 (5). – P. 1143–1150. – DOI 10.1002/lary.25667.

120. Hiwatashi, N. Stem Cell-Mediated Paracrine Signaling Alters Fibroplasia in Human Vocal Fold Fibroblasts in Vitro / N. Hiwatashi, R. Bing, I. Kraja, R. C. Branski. – DOI 10.1177/0003489417716186 // *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. – 2017. – № 126 (8). – P. 581–588.

121. Hoover, C. A. Vocal Fold Mucosal Tears / C. A. Hoover, R. T. Sataloff, K. M. Lyons, M. Hawkshaw. – DOI 10.1016/s0892-1997(01)00045-5 // *Journal of Voice*. – 2001. – № 15 (3). – P. 451–455.

122. Horwitz, E. M. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement / E. M. Horwitz, K. Le Blanc, M. Dominici [et al.]. – DOI 10.1080/14653240500319234 // *Cytotherapy*. – 2005. – № 7(5). – P. 393–395.

123. Hu, R. Fibroblast-Like Cells Differentiated from Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells for Vocal Fold Wound Healing / R. Hu, W. Ling, W. Xu, D. Han // *PLoS ONE*. – 2014. – № 9 (3). – P. e92676. – DOI 10.1371/journal.pone.0092676.

124. Hunter, E. J. Comparison of the produced and perceived voice range profiles in untrained and trained classical singers / E. J. Hunter, J. G. Svec, I. R. Titze // *Journal of Voice*. – 2006. – Vol. 20, № 4. – P. 513–526.

125. Imaizumi, M. Retention of Human-Induced Pluripotent Stem Cells (hiPS) With Injectable HA Hydrogels for Vocal Fold Engineering / M. Imaizumi, N. Y. K. Li-Jessen, Y. Sato [et al.]. – DOI 10.1177/0003489417691296 // *Annals of Otolology, Rhinology & Laryngology*. – 2017. – № 126 (4). – P. 304–314.
126. Isshiki, N. Recent Modifications in Thyroplasty Type I / N. Isshiki, H. Kojima, T. Taira, K. Shoji. – DOI 10.1177/000348948909801005 // *Annals of Otolology, Rhinology & Laryngology*. – 1989. – № 98 (10). – P. 777–779.
127. Isshiki, N. Thyroplasty Type I (Lateral Compression) For Dysphonia Due To Vocal Cord Paralysis Or Atrophy / N. Isshiki, H. Okamura, T. Ishikawa. – DOI 10.3109/00016487509121353 // *Acta Oto-Laryngologica*. – 1975. – № 80 (1-6). – P. 465–473.
128. Itoh, T. Vocal Fold Furrows. A 10-Year Review of 240 Patients / T. Itoh, H. Kawasaki, I. Morikawa, M. Hirano. – DOI 10.1016/s0385-8146(83)80002-9 // *Auris. Nasus. Larynx*. – 1983. – № 10. – P. S17–S26.
129. Johnson, B. H. Q. Tissue regeneration of the vocal fold using bone marrow mesenchymal stem cells and synthetic extracellular matrix injections in rats / B. H. Q. Johnson, R. Fox, X. Chen, S. Thibeault. – DOI 10.1002/lary.20782 // *The Laryngoscope*. – 2010. – № 120 (3). – P. 537–545.
130. Kanemaru, S. Destiny of autologous bone marrow-derived stromal cells implanted in the vocal fold / S. Kanemaru, T. Nakamura, M. Yamashita [et al.]. – DOI 10.1177/000348940511401203 // *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*. – 2005. – № 114.
131. Kanemaru, S.-I. Regeneration of the Vocal Fold Using Autologous Mesenchymal Stem Cells / S.-I. Kanemaru, H. Kojima, S. Hirano [et al.]. – DOI 10.1177/000348940311201101 // *Annals of Otolology, Rhinology & Laryngology*. – 2003. – № 112 (11). – P. 915–920.
132. Kim, C.-S. The Ability of Conditioned Media From Stem Cells to Repair Vocal Fold Injuries / C.-S. Kim, H. Choi, S. W. Kim, D.-I. Su. – DOI 10.1002/lary.27679n // *The Laryngoscope*. – 2019. ==208
133. Kim, Y.-M. Adipose-derived stem cell-containing hyaluronic acid/alginate hydrogel improves vocal fold wound healing / Y.-M. Kim, S. H. Oh, J.-S. Choi [et al.]. – DOI 10.1002/lary.24405 // *Laryngoscope*. – 2014. – № 124. – P. E64–E72.
134. Kim, Y.-M. Bone Marrow-Derived Clonal Mesenchymal Stem Cells as a Source of Cell Therapy for Promoting Vocal Fold Wound Healing / Y.-M. Kim, T. Yi, J.-S. Choi [et al.] // *Annals of Otolology, Rhinology & Laryngology*. – 2013. – № 122 (2). – P. 121.
135. King, S. N. Current applications of mesenchymal stem cells for tissue replacement in otolaryngology-head and neck surgery / S. N. King, S. E. Hanson, P. Hematti, S. L. Thibeault // *Am. J. Stem. Cells*. – 2012. – № 1 (3). – P. 225–238.
136. Kishimoto, Y. Chronic vocal fold scar restoration with hepatocyte growth factor hydrogel / Y. Kishimoto, S. Hirano, Y. Kitani [et al.] // *Laryngoscope*. – 2010. – № 120. – P. 108–113.

137. Kitahara, S. Vocal fold injury following endotracheal intubation / S. Kitahara, Y. Masuda, Y. Kitagawa. – DOI 10.1258/002221505774481192 // *The Journal of Laryngology & Otology*. – 2005. – № 119 (10).

138. Koufman, J. A. Laryngoplasty for vocal cord medialization / J. A. Koufman. – DOI 10.1288/00005537-198607000-00004 // *The Laryngoscope*. – 1986. – № 96 (7). – P. 726–731.

139. Krischke, S. Quality of Life in Dysphonic Patients / S. Krischke, S. Weigelt, U. Hoppe [et al.]. – DOI 10.1016/j.jvoice.2004.01.007 // *Journal of Voice*. – 2005. – № 19 (1). – P. 132–137.

140. Kurita, S. A comparative study of the layer structure of the vocal fold / S. Kurita, K. Nagata, M. Hirano // *Vocal Fold Physiology: Contemporary Research and Clinical Issues* / D. M. Bless, J. H. Abbs, eds. – San Diego, Calif : College-Hill Press, Inc., 1983. – P. 3–21.

141. Kutty, J. Engineered Micro-Environments and Vibrational Culture Systems for Vocal Fold Tissue Engineering / J. Kutty // *All Dissertations*, 2008. – Paper 232. – P. 16.

142. Kutty, J. K. Tissue Engineering Therapies for the Vocal Fold Lamina Propria / J. K. Kutty, K. Webb. – DOI 10.1089/ten.teb.2008.0588 // *Tissue Engineering Part B: Reviews*. – 2009. – № 15 (3). – P. 249–262.

143. Lee, B. J. The Prevention of Vocal Fold Scarring Using Autologous Adipose Tissue-Derived Stromal Cells / B. J. Lee, S. G. Wang, J. C. Lee [et al.]. – DOI 10.1159/000099627 // *Cells Tissues Organs*. – 2006. – № 184 (3-4). – P. 198–204.

144. Lee, B.-J. Intracordal Injection of Autologous Auricular Cartilage in the Paralyzed Canine Vocal Fold / B.-J. Lee, S.-G. Wang, E.-K. Goh, [et al.]. – DOI 10.1016/j.otohns.2004.02.019 // *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. – 2004. – № 131 (1). – P. 34–43.

145. Li, L. Tissue engineering-based therapeutic strategies for vocal fold repair and regeneration / L. Li, J. M. Stiadle, H. K. Lau [et al.]. – DOI 10.1016/j.biomaterials.2016.08.054 // *Biomaterials*. – 2016. – № 108. – P. 91–110. ==035

146. Lim, X. Immediate Inflammatory Response and Scar Formation in Wounded Vocal Folds / X., Lim, I. Tateya, T. Tateya [et al.]. – DOI 10.1177/000348940611501212 // *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*. – 2006. – № 115 (12). – P. 921–929.

147. Ling, C. Alteration in cellular morphology, density and distribution in rat vocal fold mucosa following injury / C. Ling, M. Yamashita, E. A. Waselchuk [et al.]. – DOI 10.1111/j.1524-475x.2009.00550.x // *Wound Repair and Regeneration*. – 2010. – № 18 (1). – P. 89–97.

148. Luizard, P. Laser scanning vibrometry and modal analysis to characterize a vocal fold replica GIPSA-lab UMR 5216 [11 rue des mathématiques, BP 46, 38402 Saint-Martin-D'Hères, France] / P. Luizard, N. Hermant, X. Laval, X. Pelorson // *The 22nd Congress on sound and vibration*. – Italy, 2015.

149. Mahla, R. S. Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics / R. S. Mahla. – DOI 10.1155/2016/6940283 // International Journal of Cell Biology. – 2016. – P. 1–24. ==17

150. Martínez Arias, À. Treatment of vocal fold scar by carbon dioxide laser and collagen injection: retrospective study on 12 patients / À. Martínez Arias, M. Remacle, G. Lawson. – DOI 10.1007/s00405-010-1231-1 // European Archives of Oto-Rhino-Laryngology. – 2010. – № 267 (9). – P. 1409–1414.

151. Mattei, A. Autologous adipose-derived stromal vascular fraction and scarred vocal folds: first clinical case report / A. Mattei, J. Magalon, B. Bertrand [et al.] – DOI 10.1186/s13287-018-0842-0 // Stem Cell Research & Therapy. – 2018. – № 9 (1).

152. Mattei, A. Cell therapy and vocal fold scarring / A. Mattei, J. Magalon, B. Bertrand [et al.]. – DOI 10.1016/j.anorl.2017.06.006 // European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases. – 2017. – № 134 (5). – P. 339–345.

153. Mattei, A. Commentary about mesenchymal stem cells and scarred vocal folds / A. Mattei, J. Magalon, M. Velier [et al.]. – DOI 10.1186/s13287-020-01693-9 // Stem Cell Research & Therapy. – 2020. – № 11 (1).

154. Mattei, A. Feasibility of First Injection of Autologous Adipose Tissue-Derived Stromal Vascular Fraction in Human Scarred Vocal Folds: A Nonrandomized Controlled Trial / A. Mattei, B. Bertrand, E. Jouve [et al.]. – DOI 10.1001/jamaoto.2019.4328. – PMID: 32053141. – PMCID: PMC7163407 // JAMA Otolaryngol Head Neck Surg. – 2020 Apr 1. – № 146(4). – P. 355–363.

155. McCulloch, T. M. Medialization Laryngoplasty with Expanded Polytetrafluoroethylene / T. M. McCulloch, H. T. Hoffman. – DOI 10.1177/000348949810700512 // Annals of Otology, Rhinology & Laryngology. – 1998. – № 107 (5).

156. McGeachie, J. Growth factors and their implications for clinicians: A brief review / J. McGeachie, M. Tennant. – DOI 10.1111/j.1834-7819.1997.tb06081.x // Australian Dental Journal. – 1997. – № 42 (6). – P. 375–380.

157. Minzdrav.gov.ru / URL: <https://minzdrav.gov.ru/news/2021/03/13/16256-mihail-murashko-minzdrav-rossii-razreshil-klinicheskie-issledovaniya-pervogo-v-rossii-biomeditsinskogo-kletochnogo-produkta>.

158. Min, Y. B. Stress-Strain Response of the Human Vocal Ligament / Y. B. Min, I. R. Titze, F. Alipour-Haghighi. – DOI 10.1177/000348949510400711 // Annals of Otology, Rhinology & Laryngology. – 1995. – № 104 (7). – P. 563–569.

159. Miri, A. K. Microstructural characterization of vocal folds toward a strain-energy model of collagen remodeling / A. K. Miri, H. K. Heris, U. Tripathy [et al.]. – DOI 10.1016/j.actbio.2013.04.044 // Acta Biomaterialia. – 2013. – № 9 (8). – P. 7957–7967.

160. Miri, A. K. Nanoscale viscoelasticity of extracellular matrix proteins in soft tissues: A multiscale approach / A. K. Miri, H. K. Heris, L. Mongeau, F. Javid. – DOI 10.1016/j.jmbbm.2013.10.022 // Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. – 2014. – № 30. – P. 196–204.

161. Miri, A. K. Nonlinear laser scanning microscopy of human vocal folds / A. K. Miri, U. Tripathy, L. Mongeau, P. W. Wiseman. – DOI 10.1002/lary.22460 // *The Laryngoscope*. – 2012. – № 122 (2). – P. 356–363.

162. Monday, L. A. Epidermoid Cysts of the Vocal Cords / L. A. Monday, M. Bouchayer, G. Cornut, J. B. Roch. – DOI 10.1177/000348948309200205 // *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. – 1983. – № 92 (2). – P. 124–127.

163. Morisaki, T. Adipose-derived mesenchymal stromal cells prevented rat vocal fold scarring / T. Morisaki, Y. Kishimoto, I. Tateya [et al.]. – DOI 10.1002/lary.26855 // *The Laryngoscope*. – 2017. – № 128 (1). – P. E33–E40.

164. Mortensen, M. M. The Use of the Pulse Dye Laser in the Treatment of Vocal Fold Scar: A Preliminary Study / M. M. Mortensen, P. Woo, C. Ivey [et al.]. – DOI 10.1097/mlg.0b013e31817d7546 // *The Laryngoscope*. – 2008. – № 118 (10). – P. 1884–1888.

165. Murry, T. The relationship between ratings of voice quality and quality of life measures / T. Murry, R. Medrado, N. D. Hogikyan, J. E. Aviv. – DOI 10.1016/j.jvoice.2003.11.003 // *Journal of Voice*. – 2004. – № 18 (2). – P. 183–192.

166. Myer, C. M. Proposed Grading System for Subglottic Stenosis Based on Endotracheal Tube Sizes / C. M. Myer, D. M. O'Connor, R. T. Cotton – DOI 10.1177/000348949410300410 // *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. – 1994. – № 103 (4). – P. 319–323.

167. Neuenschwander, M. C. Management of Vocal Fold Scar with Autologous Fat Implantation / M. C. Neuenschwander, R. T. Sataloff, M. M. Abaza [et al.]. – DOI 10.1016/s0892-1997(01)00031-5 // *Journal of Voice*. – 2001. – № 15 (2). – P. 295–304.

168. Neumann, O. G. Oral mucosal grafts in laryngeal reconstruction (author's transl) / O. G. Neumann // *HNO*. – 1976. – № 2. – P. 248–251.

169. Ohno, S. Implantation of an Atelocollagen Sponge with Autologous Bone Marrow – Derived Mesenchymal Stromal Cells for Treatment of Vocal Fold Scarring in a Canine Model / S. Ohno, S. Hirano, S.-I. Kanemaru [et al.]. – DOI 10.1177/000348941112000610 // *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. – 2011. – № 120 (6). – P. 401–408.

170. Okui, A. Therapeutic Efficacy of Basic Fibroblast Growth Factor in Patients With Vocal Fold Atrophy / A. Okui, U. Konomi, T. Kanazawa [et al.]. – DOI 10.1002/lary.28541 // *The Laryngoscope*. – 2020.

171. Park, H. Three-Dimensional Hydrogel Model Using Adipose-Derived Stem Cells for Vocal Fold Augmentation Laser scanning vibrometry and modal analysis to characterize a vocal fold replica GIPSA-lab UMR 5216 / H. Park, S. Karajanagi, K. Wolak [et al.]. – DOI 10.1089/ten.tea.2009.0029 // *Tissue Engineering Part A*. – 2010. – № 16 (2). – P. 535–543.

172. Pawlak, A. S. Immunocytochemical Study of Proteoglycans in Vocal Folds / A. S. Pawlak, E. Hammond, T. Hammond, S. D. Gray – DOI 10.1177/000348949610500102 // *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. – 1996. – № 105 (1). – P. 6–11.

173. Payr, E. Plastik am Schidknorpel zur der folgen einseitiger stimmbandlahmung / E. Payr // Dtsh. Med. Wochenschr. – 1915. – № 43. – P. 1265–1270.

174. Peled, Z. M. Response to tissue injury / Z. M. Peled, G. S. Chin, W. Liu [et al.]. – PMID: 11039884 // Clin. Plast. Surg. – 2000 Oct. – № 27 (4). – P. 489–500.

175. Peng, H. The use of laryngeal mucosa mesenchymal stem cells for the repair the vocal fold injury / H. Peng, L. Ming, R. Yang [et al.]. – DOI 10.1016/j.biomaterials.2013.08.004 // Biomaterials. – 2013. – № 34 (36). – P. 9026–9035.

176. Perouse, A. R. Iatrogenic scarring of the vocal folds after phonosurgery for benign lesions. A descriptive study of 108 patients / A. R. Perouse, B. Coulombeau. – PMID: 26521343 // Rev. Laryngol. Otol. Rhinol. (Bord.). – 2014. – № 135 (2). – P. 57–61.

177. Pontes, P. Treatment of sulcus vocalis: Auditory perceptual and acoustical analysis of the slicing mucosa surgical technique / P. Pontes, M. Behlau. – DOI 10.1016/s0892-1997(05)80260-7 // Journal of Voice. – 1993. – № 7 (4). – P. 365–376.

178. Prades, J.-M. Lamina propria of the human vocal fold: histomorphometric study of collagen fibers / J.-M. Prades, J. M. Dumollard, S. Duband [et al.]. – DOI 10.1007/s00276-009-0577-9 // Surgical and Radiologic Anatomy. – 2009. – № 32 (4). – P. 377–382.

179. Prodinge, P. M. Lipoaugmentation of the Vocal Folds: A Survey on Alternative Donor Sites for Graft Harvesting / P. M. Prodinge, G. Windisch, G. P. Hammer. [et al.]. – DOI 10.1016/j.jvoice.2008.01.015 // Journal of Voice. – 2009. – № 23 (5). – P. 625–630.

180. Pruffer, N. Pulse dye and other laser treatments for vocal scar / N. Pruffer, P. Woo, K. W. Altman. – DOI 10.1097/moo.0b013e32833f890d // Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery. – 2010. – № 18 (6). – P. 492–497.

181. Reflection paper on stem cell-based medicinal products EMA/CAT/571134/2009. – P. 8/14.

182. Regenerative Medicine in Otolaryngology / J. Ito (ed.). – Tokyo : Springer, 2015. – 243 p. – P. 4–17. – DOI 10.1007/978-4-431-54856-0. – ISBN 978-4-431-54855-3.

183. Remacle, M. Endoscopic cordectomy. a proposal for a classification by the Working Committee, European Laryngological Society / M. Remacle, H. E. Eckel, A. Antonelli [et al.]. – DOI 10.1007/s004050050228 // European Archives of Oto-Rhino-Laryngology. – 2000. – № 257 (4). – P. 227.

184. Remacle, M. Medialization framework surgery for voice improvement after endoscopic cordectomy / M. Remacle, G. Lawson, A. Hedayat [et al.]. – DOI 10.1007/s004050100350 // European Archives of Oto-Rhino-Laryngology. – 2001. – № 258 (6). – P. 267–271.

185. Remacle, M. Proposal for revision of the European Laryngological Society classification of endoscopic cordectomies / M. Remacle, C. Van Haverbeke, H. Eckel [et al.]. – DOI 10.1007/s00405-007-0279-z // European Archives of Oto-Rhino-Laryngology. – 2007. – № 264 (5). – P. 499–504.

186. Ren, X. Growth Factor Engineering Strategies for Regenerative Medicine Applications / X. Ren, M. Zhao, B. Lash [et al.]. – DOI 10.3389/fbioe.2019.00469 // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. – № 7.

187. Rihkanen, H. Vocal Fold Augmentation by Injection of Autologous Fascia / H. Rihkanen. – DOI 10.1097/00005537-199801000-00010 // *The Laryngoscope*. – 1998. – № 108 (1). – P. 51–54.

188. Rosen, C. A. Vocal Fold Scar / C. A. Rosen. – DOI 10.1016/s0030-6665(05)70266-8 // *Otolaryngologic Clinics of North America*. – 2000. – № 33 (5). – P. 1081–1086.

189. Rousseau, B. Characterization of chronic vocal fold scarring in a rabbit model / B. Rousseau, S. Hirano, R. W. Chan [et al.]. – DOI 10.1016/j.jvoice.2003.06.001 // *Journal of Voice*. – 2004. – № 18 (1). – P. 116–124.

190. Rousseau, B. Characterization of Vocal Fold Scarring in a Canine Model / B. Rousseau, S. Hirano, T. D. Scheidt [et al.]. – DOI 10.1097/00005537-200304000-00007 // *The Laryngoscope*. – 2003. – № 113 (4). – P. 620–627.

191. Rousseau, B. Extracellular Matrix Gene Expression after Vocal Fold Injury in a Rabbit Model / B. Rousseau, P. J. Ge, T. Ohno [et al.]. – DOI 10.1177/000348940811700809 // *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*. – 2008. – № 117 (8). – P. 598–603.

192. Ruben R. J. Redefining the Survival of the Fittest: Communication Disorders in the 21st Century / R. J. Ruben. – DOI 10.1097/00005537-200002010-00010 // *The Laryngoscope*. – 2000. – № 110. – P. 241–241.

193. Rubin, H. J. Misadventures With Injectable Polytef (Teflon) / H. J. Rubin. – DOI 10.1001/archotol.1975.00780310036010 // *Archives of Otolaryngology – Head and Neck Surgery*. – 1975. – № 101 (2). – P. 114–116.

194. Ryan, J. M. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection / J. M. Ryan, F. P. Barry, J. M. Murphy, B. P. Mahon // *J. Inflamm. (Lond.)*. – 2005. – № 2. – P. 8.

195. Sampogna, G. Regenerative medicine: Historical roots and potential strategies in modern medicine / G. Sampogna, S. Y. Guraya, A. Forgione. – DOI 10.1016/j.jmau.2015.05.002 // *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. – 2015. – Vol. 3, iss. 3. – P. 101–107.

196. Sataloff, R. T. Autologous fat implantation for vocal fold scar: A preliminary report / R. T. Sataloff, J. R. Spiegel, M. Hawkshaw [et al.]. – DOI 10.1016/s0892-1997(97)80083-5 // *Journal of Voice*. – 1997. – № 11 (2). – P. 238–246.

197. Sataloff, R. T. Laryngeal minimicroflap: a new technique and reassessment of the microflap saga / R. T. Sataloff, J. R. Spiegel, R. J. Heuer [et al.] // *J. Voice*. – 1995. – № 9. – P. 198–204.

198. Sataloff, R. T. The professional voice / R. T. Sataloff // *Otolaryngology-head and neck surgery*. Vol. 3 / C. W Cummings, J. M. Frederickson, L. A. Harker, eds. [et al.]. – St. Louis : Mosby, 1986. – P. 2029–2056.

199. Sato, K. 3D Structure of the Macula Flava in the Human Vocal Fold / K. Sato, M. Hirano, T. Nakashima. – DOI 10.1080/00016480310001123 // *Acta Oto-Laryngologica*. – 2003. – № 123 (2). – P. 269–273.

200. Sato, K. Electron Microscopic Investigation of Sulcus Vocalis / K. Sato, M. Hirano. – DOI 10.1177/000348949810700111 // *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. – 1998. – № 107 (1). – P. 56–60.

201. Sato, K. Functional Histology of the Macula Flava in the Human Vocal Fold – Part 1: Its Role in the Adult Vocal Fold / K. Sato, H. Umeno, T. Nakashima. – DOI 10.1159/000314261 // *Folia Phoniatrica et Logopaedica*. – 2010. – № 62 (4). – P. 178–184.

202. Sato, K. Functional Histology of the Macula Flava in the Human Vocal Fold – Part 2: Its Role in the Growth and Development of the Vocal Fold / K. Sato, H. Umeno, T. Nakashima. – DOI 10.1159/000316962 // *Folia Phoniatrica et Logopaedica*. – 2010. – № 62 (6). – P. 263–270.

203. Sato, K. Histologic Investigation of the Macula Flava of the Human Vocal Fold / K. Sato, M. Hirano. – DOI 10.1177/000348949510400210 // *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. – 1995. – № 104 (2). – P. 138–143.

204. Sato, K. Vitamin A-Storing Stellate Cells in the Human Newborn Vocal Fold / K. Sato, T. Nakashima. – DOI 10.1177/000348940511400704 // *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. – 2005. – № 114 (7). – P. 517–524.

205. Schneider, B. Functional Results After External Vocal Fold Medialization Thyroplasty With the Titanium Vocal Fold Medialization Implant / B. Schneider, D.-M. Denk, W. Bigenzahn – DOI 10.1097/00005537-200304000-00008 // *The Laryngoscope*. – 2003. – № 113 (4). – P. 628–634.

206. Shiba, T. L. Tissue-Engineered Vocal Fold Mucosa Implantation in Rabbits. / T. L. Shiba, J. Hardy, G. Luegmair [et al.]. – DOI 10.1177/0194599816628501 // *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. – 2016. – № 154 (4). – P. 679–688.

207. Shin, Y. Persistent Dysphonia after Laryngomicrosurgery for Benign Vocal Fold Disease / Y. Shin, J. Chang, S. Yang [et al.]. – DOI 10.3342/ceo.2013.6.3.166 // *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology*. – 2013. – № 6 (3). – P. 166–170.

208. Shpichka, A. I. Digging deeper: structural background of PEGylated fibrin gels in cell migration and lumenogenesis / A. I. Shpichka, P. V. Konarev, Y. M. Efremov [et al.]. – DOI 10.1039/c9ra08169k // *RSC Advances*. – 2020. – № 10 (8). – P. 4190–4200.

209. Shpichka, A. I. Transparent PEG-fibrin gel as a flexible tool for cell encapsulation / A. I. Shpichka, V. A. Revkova, N. A. Aksenova [et al.] – DOI 10.17691/stm2018.10.1.08 // *Sovremennye tehnologii v medicine* – 2018. – № 10 (1). – P. 64.

210. Sivasankar, M. Atomic Force Microscopy Investigation of Vocal Fold Collagen / M. Sivasankar, A. Ivanisevic. – DOI 10.1097/mlg.0b013e3180caa1df // *The Laryngoscope*. – 2007. – № 117 (10). – P. 1876–1881.

211. Smith, E. Effect of voice disorders on quality of life / E. Smith, K. Verdolini, S. Gray [et al.] // *Journal of Medical Speech-Language Pathology*. – 1996. – № 4 (4). – P. 223–244.

212. Squillaro, T. Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells: An Update / T. Squillaro, G. Peluso, U. Galderisi. – DOI 10.3727/096368915x689622 // *Cell Transplantation*. – 2016. – № 25 (5). – P. 829–848.

213. Stephens, P. The cellular proliferative phase of the wound repair process / P. Stephens, D. W. Thomas. – DOI 10.12968/jowc.2002.11.7.26421 // *Journal of Wound Care*. – 2002. – № 11(7). – P. 253–261.

214. Sulica, L. Current practice in injection augmentation of the vocal folds: indications, treatment principles, techniques, and complications / L. Sulica, C. A. Rosen, G. N. Postma [et al.] // *Laryngoscope*. – 2010. – № 120. – P. 319–325.

215. Svensson, B. Injection of human mesenchymal stem cells improves healing of vocal folds after scar excision-A xenograft analysis / B. Svensson, S. R. Nagubothu, J. Cedervall [et al.]. – DOI 10.1002/lary.22143 // *The Laryngoscope*. – 2011. – № 121 (10). – P. 2185–2190.

216. Svensson, B. Restoration of scarred vocal folds with stem cell implantation – analyses in a xenograft model / B. Svensson. – Stockholm : Karolinska institutet, 2011. – P. 36 – ISBN 978-91-7457-616-0.

217. Svensson, B. Stem Cell Therapy in Injured Vocal Folds: A Three-Month Xenograft Analysis of Human Embryonic Stem Cells / B. Svensson, S. R. Nagubothu, C. Nord [et al.] // *BioMed Research International*. – 2015. – Vol. 2015. – Article ID 754876. – 7 p.

218. Tang, S. S. Insights Into the Role of Collagen in Vocal Fold Health and Disease / S. S. Tang, V. Mohad, M. Gowda, S. L. Thibeault. – DOI 10.1016/j.jvoice.2017.01.008 // *Journal of Voice*. – 2017. – № 31 (5). – P. 520–527.

219. Tateya, T. Histological Study of Acute Vocal Fold Injury in a Rat Model / T. Tateya, I. Tateya, J. H. Sohn, D. M. Bless. – DOI 10.1177/000348940611500406 // *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*. – 2006. – № 115 (4). – P. 285–292.

220. Tateya, T. Histologic Characterization of Rat Vocal Fold Scarring / T. Tateya, J. H. Sohn, I. Tateya, D. M. Bless. – DOI 10.1177/000348940511400303 // *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*. – 2005. – № 114 (3). – P. 183–191.

221. Teixeira, J. P. Acoustic Analysis of Vocal Dysphonia / J. P. Teixeira, P. O. Fernandes. – DOI 10.1016/j.procs.2015.08.544 // *Procedia Computer Science*. – 2015. – № 64. – P. 466–473.

222. Thibeault, S. L. Histologic and Rheologic Characterization of Vocal Fold Scarring / S. L. Thibeault, S. D. Gray, D. M. Bless [et al.]. – DOI 10.1016/s0892-1997(02)00078-4 // *Journal of Voice*. – 2002. – № 16 (1). – P. 96–104.

223. Tidman, M. J. Evaluation of Anchoring Fibrils and Other Components of the Dermal-Epidermal Junction in Dystrophic Epidermolysis Bullosa by a Quantitative Ultrastructural Technique / M. J. Tidman, R. A. J. Eady. – DOI 10.1111/1523-1747.ep12265460 // *Journal of Investigative Dermatology*. – 1985. – № 84(5). – P. 374–377.

224. Titze, I. R. Design and validation of a bioreactor for engineering vocal fold tissues under combined tensile and vibrational stresses / I. R. Titze, R. W. Hitchcock, K. Broadhead [et al.]. – DOI 10.1016/j.jbiomech.2004.01.007 // *Journal of Biomechanics*. – 2004. – № 37 (10). – P. 1521–1529.

225. Titze, I. R. On the relation between subglottal pressure and fundamental frequency in phonation / I. R. Titze. – DOI 10.1121/1.397562 // *The Journal of the Acoustical Society of America*. – 1989. – № 85 (2). – P. 901–906.

226. Tran, Q. T. Measurement of Young's Modulus in the in Vivo Human Vocal Folds / Q. T. Tran, B. R. Gerratt, G. S. Berke, J. Kreiman. – DOI 10.1177/000348949310200803 // *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. – 1993. – № 102 (8). – P. 584–591.

227. Tsunoda, K. Autologous Transplantation of Fascia into the Vocal Fold: Long-Term Result of Type-1 Transplantation and the Future / K. Tsunoda, K. Kondou, K. Kaga [et al.]. – DOI 10.1097/01.mlg.0000183966.72921.31 // *The Laryngoscope*. – 2005. – № 115. – P. 1–10.

228. Vacanti, C. A. The history of tissue engineering / C. A. Vacanti // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2006. – Vol. 10, № 3. – P. 569–576.

229. Vahabzadeh-Hagh, A. M. Hirano's cover-body model and its unique laryngeal postures revisited / A. M. Vahabzadeh-Hagh, Z. Zhang, D. K. Chhetri. – DOI 10.1002/lary.27000 // *The Laryngoscope*. – 2017. – № 128 (6). – P. 1412–1418.

230. Valerie, A. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Regeneration of Vocal Folds: A Study on a Chronic Vocal Fold Scar / A. Valerie, K. Vassiliki, M. Irimi [et al.]. – DOI 10.1155/2016/9010279 // *Stem Cells International*. – 2016. – P. 1–12.

231. Vizoso, F. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine / F. Vizoso, N. Eiro, S. Cid [et al.]. – DOI 10.3390/ijms18091852 // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – № 18 (9). – P. 1852.

232. Ward, P. H. Transcutaneous Teflon Injection of the Paralyzed Vocal Cord / P. H. Ward, D. G. Hanson, E. Abemayor. – DOI 10.1288/00005537-198506000-00002 // *The Laryngoscope*. – 1985. – № 95 (6). – P. 644–649. ==142

233. Welham, N. V. Inflammatory Factor Profiles One Hour following Vocal Fold Injury / N. V. Welham, X. Lim, I. Tateya, D. M. Bless. – DOI 10.1177/000348940811700213 // *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. – 2008. – № 117 (2). – P. 145–152.

234. Wingstrand, V. L. Mesenchymal Stem Cell Therapy for the Treatment of Vocal Fold Scarring: A Systematic Review of Preclinical Studies / V. L. Wingstrand, C. Grønhøj Larsen, D. H. Jensen, [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0162349 // *PLOS ONE*. – 2016. – № 11 (9). – P. e0162349.

235. Woo, P. Diagnosis and Treatment of Persistent Dysphonia After Laryngeal Surgery / P. Woo, J. Casper, R. Colton, D. Brewer. – DOI 10.1288/00005537-199409000-00007 // *The Laryngoscope*. – 1994. – № 104 (9). – P. 1084–1091.

236. Xu, W. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Collagen – Hyaluronic Acid Gel Composite Scaffolds for Vocal Fold Regeneration / W. Xu, R. Hu, E. Fan, D. Han. – DOI 10.1177/000348941112000209 // *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. – 2011. – № 120 (2). – P. 123–130.

237. Zhang, F. J. Implantation of gelatin sponge combined with injection of autologous fat for sulcus vocalis / F. Zhang, A. J. Sprecher, C. Wei, J. Jiang. – DOI 10.1016/j.otohns.2010.03.002 // *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. – 2010. – № 143 (2). – P. 198–203.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АСМ - атомно-силовая микроскопия
БМКП - биомедицинский клеточный продукт
ВКМ - внеклеточный матрикс
ГК - гиалуроновая кислота
ГС - голосовые складки
ГЭРБ - гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь
ИВЛ - искусственная вентиляция лёгких
ИЛ - интерлейкин
МСК - мезенхимные стромальные клетки
ПЦР - полимеразная цепная реакция
ПЭГ- полиэтиленгликоль
ЦОГ – циклооксигеназа
ЭСК - эмбриональные стволовые клетки
iPS - индуцированные стволовые клетки
TGF- β - трансформирующий фактор роста β
TNF- α - фактор некроза опухолей альфа
Fgf - фактора роста фибробластов
HGF - фактора роста гепатоцитов
PDL - импульсный цветной лазер
КТР - калий-титанил-фосфатный лазер
HAS - гиалуронсинтаза
MMP - матриксная металлопротеиназа
VHI - Voice Handicap Index