

Васин Виталий Иванович

**Механизмы и оценка эффективности заживления острых кожных ран при использовании
наружных и инвазивных лекарственных средств**

14.03.03 – Патологическая физиология

14.01.17 – Хирургия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) и федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Силина Екатерина Владимировна

доктор медицинских наук, профессор

Ступин Виктор Александрович

Официальные оппоненты:

Морозов Сергей Георгиевич – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», директор

Сергеев Алексей Николаевич - доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра общей хирургии, заведующий кафедрой

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «19» апреля 2022 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного Совета ДСУ 208.001.08 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая д. 8, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д 37/1 и на сайте организации: www.sechenov.ru

Автореферат разослан « » _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор



Калюжин Олег Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Вопросы заживления кожных ран различной этиологии и эффективное медицинское сопровождение этого процесса продолжают оставаться в числе высоко актуальных [Дибиров М.Д. и соавт., 2019; Ступин В.А. и соавт., 2019; Baron J.M. et al., 2020; Ribeiro D.M.L. et al., 2019]. Объясняется это, с одной стороны, увеличивающимся количеством бытовых и военных ранений, когда острая рана происходит у соматически здорового человека, а также ростом числа операций в мире [Гареев И.Ф., 2018; Пьянкова А.И., 2017; Тараско А.Д. и соавт., 2016; Aghdash S. et al., 2018; Cai Y-L. et al., 2018; Rosberg H.E. et al., 2018; Nerlander M.P. et al., 2019; Wild H. et al., 2020]. С другой стороны, увеличение продолжительности жизни, а значит и коморбидности, сопровождается ростом распространенности хронических трофических язв различной этиологии, заживление которых становятся острой клинической проблемой [Дибиров М.Д. и соавт., 2016; Antonopoulos C.N. et al., 2019; Han G. et al., 2019; Stupin V.A. et al., 2017]. Несмотря на постоянно увеличивающееся количество лекарственных средств и методов, используемых для лечения ран, проблема эффективной регенерации до сих пор не решена [Архипов Д.В. и соавт., 2019; Дас М. и Бейкер А., 2016; Морозов С.Г. и соавт., 2019; Моторина И.Г. и соавт., 2018; Ступин В.А. и соавт., 2019; Ennis W.J. et al., 2016; Zielins E.R. et al., 2015; Beers E.H., et al., 2019; Haalboom M. et al., 2018; Shukla S.K. et al., 2019]. Результаты мета-анализов и систематических обзоров по эффективности разных средств и методов, используемых для лечения ран, демонстрируют отсутствие единых и эффективных подходов и лекарственных средств для лечения ран [Alven S. et al., 2020; Norman G. et al., 2016; Webster J. et al., 2019; Westby M.J. et al., 2018; Zhang L. et al., 2019].

Независимо от этиологии ран и сопутствующей патологии, в процессе их заживления можно выделить ключевые процессы. Вначале это последовательно сменяющие друг друга этапы собственно воспаления, идущие при участии лейкоцитарных клеток, образования грануляционной ткани, пролиферации фибробластов с формированием межклеточного матрикса, что должно заканчиваться эпителизацией и закрытием поверхности раны [Алексеева Н.Т., 2015; Королькова Т.Н. и соавт., 2019; Морозов С.Г., Копасов А.Е., 2020; Силина Е.В. и соавт., 2017; Ярец Ю.И. и соавт., 2018; Eming S.A. et al., 2014; Landen N.X. et al., 2016; Nosenko M.A. et al., 2019]. Нарушение указанных процессов – основа патогенеза длительно незаживающих ран. Очевидно, что актуальным является изучение процессов регенерации и механизмов действия стимулирующих заживление ран лекарств совместно с развитием персонализированного подхода.

В последнее время перспективными считаются многокомпонентные перевязочные средства на основе полимерных и клеточных технологий [Бежин А.И., 2019; Паюшина О.В.,

2018; Петров Ю.П., 2018; Kurita M, 2018; Ahmadi A.R., 2019; Kaygusuz H., 2017; Masood N., 2019; Rasool A., 2019; Kalantari K., 2020; Koivuniemi R., 2020, Li X.X., 2020; Silina E. et al., 2020; Sulaeva I., 2020]. Накапливаются данные о положительном влиянии на заживление ран таких полимеров, как хитозан и целлюлоза [Grace J.L. et al., 2018; Hussain Z. et al., 2018; Joseph B. et al., 2017; Kar A.K. et al., 2019; Matica M.A. et al., 2019; Sahana T.G. 2018]. Подает большие надежды введение в лекарственные средства наночастиц веществ, которые изменяют характеристики имеющихся средств, обеспечивая увеличение их биодоступности [Kaygusuz H. et al., 2017; Naderi N. et al., 2018; Kalantari K. et al., 2020; Bai Q. et al., 2020]. Так, диоксид церия способен в клеточной культуре или ране проявлять антиоксидантные свойства за счет способности менять свою валентность и стабилизировать pH межклеточной и раневой среды [Charbgoon F. et al., 2017; Dutta D. et al., 2016; Nelson B.C. et al., 2016; Rather H.A. et al., 2017; Nethi S. et al., 2019; Xiaomin M. et al., 2019; Zgheib C. et al., 2019]. Однако это новое направление пока не имеет работ, соответствующих всем требованиям доказательной медицины в связи с раздробленностью поисковых исследований, проводимых с малым числом животных преимущественно молодого возраста в экспериментах с разным размером и тяжестью ран, длительностью наблюдения и ограниченностью методов контроля за заживлением. Кроме того, сравнительные эффекты применения мезенхимальных прогениторных клеток в сочетании с лекарствами новых типов пока не изучены.

Для решения данных вопросов было проведено экспериментальное исследование, **цель** которого – изучить влияние мезенхимальных стволовых клеток и полимерного средства на основе хитозана и целлюлозы с интегрированными в состав наночастицами диоксида церия на механизмы заживления острых кожных ран.

Задачи исследования:

1. Выявить особенности заживления острой кожной раны у крыс зрелого возраста при интактной регенерации под струпом и при дополнительном инъекционном повреждении.
2. Оценить динамику размеров ран и эффективность применения полимерного средства на основе хитозана и целлюлозы с интегрированными в состав наночастицами диоксида церия, мезенхимальных стволовых клеток при их местном инъекционном и системном применении, комбинации полимерного средства с культурой мезенхимальных стволовых клеток, а также зарегистрированных лекарственных средств (стимулятор регенерации тканей депротеинизированный гемодериват крови телят, проотивомикробное комбинированное средство диоксометилтетрагидропиримидин + хлорамфеникол).
3. Изучить влияние выбранных биологических и фармакологических средств на уровень микрогемоциркуляции в краях ран на разных этапах заживления на протяжении двух недель с момента моделирования острой кожной раны.

4. Исследовать морфологическую характеристику лейкоцитарных и фибробластных клеток в центре и краях ран в процессе заживления на 3, 7 и 14 сутки при воздействии на них мезенхимальных стволовых клеток, полимерного средства с диоксидом церия, депротеинизированного гемодеривата крови телят, диоксометилтетрагидропиримидин-хлорамфеникола, сравнив с контрольными ранами.

5. Сравнить итоги эпителизации и коллагенизации острых кожных ран на протяжении 14 суток с момента их моделирования при заживании ран без лечения, а также при воздействии на них депротеинизированного гемодеривата крови телят, диоксометилтетрагидропиримидин-хлорамфеникола, мезенхимальных стволовых клеток, полимерного средства с диоксидом церия и при комбинации последнего с клеточной терапией.

Научная новизна

Впервые доказана эффективность применения нового разработанного полимерного средства на основе хитозана и целлюлозы с интегрированными в их состав наночастицами диоксида церия как самостоятельный препарат, так и в комбинации с мезенхимальными стволовыми клетками (МСК), и выявлена перспективность применения этих средств в лечении острых кожных ран.

Исследована эффективность применения культуры прогениторных МСК при их локальном инъекционном применении непосредственно в рану и при генерализации их действия на интактной ране, на новом патофизиологическом подходе объяснен механизм локального и системного действия МСК, а также причины разноречивости результатов исследования МСК и ограниченности времени их эффективности.

Впервые на статистически репрезентативном материале с использованием крыс зрелого возраста выполнен мультифакторный рандомизированный лонгитюдный эксперимент со стандартизированным моделированием иссечения всех слоев эпидермиса и дермы, анализом гистологических, морфометрических и микроциркуляторных данных на протяжении 14 суток с оценкой фаз экссудативного воспаления, пролиферации, регенерации одновременно в восьми исследуемых группах (результаты исследования новых полимерных и клеточных средств сравнивались не только с группами интактного и инвазивного контроля, но и с зарегистрированными и применяющимися в клинической практике регенеративными средствами). Отдельно изучен морфометрический состав фибробластных и лейкоцитарных клеток в разных отделах ран (центр и края); доказана решающая роль лейкоцитарной инфильтрации и фибробластной пролиферации на развитие разных этапов воспаления и выявлены закономерности, ускоряющие процессы регенерации. Проведен корреляционный анализ клеточного состава с уровнем микрогемоперфузии края ран и с размерами кожных ран при интактном заживлении под струпом и дополнительной травматизации инъекционным

введением в края ран лекарственных средств, при применении некоторых зарегистрированных лекарств (стимулятор регенерации тканей депротеинизированный гемодериват крови телят, проотивомикробное комбинированное средство диоксометилтетрагидропиримидин + хлорамфеникол), МСК при их местном инъекционном и системном применении, а также полимерного средства на основе хитозана и целлюлозы с интегрированными в состав гидрогеля наночастицами диоксида церия и комбинации этого полимерного средства с культурой МСК.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Дополнительная травматизация краев ран, даже если она произведена введением лекарственных средств, на четверть замедляет процесс регенерации острой раны.
2. Полимерное средство с наночастицами диоксида церия, мезенхимальные стволовые клетки и их сочетание превосходят по эффективности избранные зарегистрированные ранозаживляющие средства (депротеинизированный гемодериват крови телят, диоксометилтетрагидропиримидин + хлорамфеникол) и являются перспективными для клинического применения.
3. Уровень микроциркуляции краев ран является объективным динамическим процессом, коррелирующим с гистологическими и морфометрическими показателями тканей ран, должен оцениваться в зависимости от фазы раневого процесса и использоваться для прогноза заживления ран и эффективности проводимого лечения.
4. Сравнительная морфометрическая динамика состава лейкоцитарных и фибробластных клеток в разных отделах ран является объективным признаком фазы раневого процесса и служит прогнозом оценки заживления ран.

Теоретическая и практическая значимость

Получены новые данные о механизмах действия и эффективности в части заживления острых ран нового средства, включающего природные биологически активные вещества, такие как хитозан и целлюлоза введенные в агаровый гидрогель. В качестве стабилизирующего компонента использовали наночастицы диоксида церия, который обладает способностью стабилизировать pH раны за счет смены валентности и, таким образом, препятствовать развитию микрофлоры в ране.

Доклиническое исследование, построенное на принципах доказательности, сравнило эффекты нового средства с контрольными группами животных, а также с группами в которых применялись имеющиеся сегодня в арсенале практической медицины хорошо зарекомендовавшими себя лекарственными средствами (стимулятор регенерации тканей депротеинизированный гемодериват крови телят и противомикробное комбинированное средство диоксометилтетрагидропиримидин + хлорамфеникол). Кроме того, определена сравнительная эффективность использования в лечении острых ран мезенхимальных стволовых

клеток, и получены новые научные результаты сопоставимости их локального и системного действия, эффективность которого ограничена 5 сутками.

Включение в исследование комплекса объективных инструментальных методов оценки заживления открыло новые данные в части развития фаз раневого процесса в зависимости от применяемого лекарственного средства и его различной эффективности в разные фазы заживления. Это позволило на основании объективных данных определить сроки, в которые используемые средства демонстрируют наилучший результат. Найденные факты заставляют для достижения максимального эффекта динамически изменять применяемые лекарственные средства, что в целом меняет и принятую сегодня доктрину лечения острых ран.

Доказано повреждающее действие на ткани любого раствора или эмульсии вводимого в кожу, что всегда сопровождается замедлением регенерации ран. Проведена оценка скорости эпителизации и коллагенизации ран при разных воздействиях на них (в восьми исследуемых группах – при применении новых полимерных и клеточных средств в сравнении с группами интактного и инвазивного контроля и с зарегистрированными регенеративными средствами).

Полученные результаты помогут оптимизировать и уточнить протоколы ведения острых ран с использованием лекарственных средств. Определено перспективное направление в разработке новых ранозаживляющих средств.

Степень достоверности

Достоверность и обоснованность результатов диссертационной работы основана на использовании достаточного по объему материала с применением различных клинко-инструментальных валидных современных методов исследования, сопоставимости результатов с данными отечественных и зарубежных авторов. Статистическая обработка и сравнительный анализ полученных фактических данных выполнен с использованием статистической программы SPSS 23.0 с применением параметрических и непараметрических критериев. Все это позволило сформулировать объективные выводы, которые определены высокой точностью результатов, обосновать научную и практическую значимость работы.

Первичная документация диссертации проверена комиссией, созданной распоряжением проректора по научно-исследовательской работе ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) Д.В. Бутнару, распоряжение от 23 ноября 2021 г. № 339/Р.

Работа выполнена на кафедрах патологии человека Института биодизайна и моделирования сложных систем ФГАОУ ВО Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) и госпитальной хирургии №1 лечебного факультета ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России

Апробация результатов

Материалы диссертации доложены 25 ноября 2021 г. и 26 ноября 2021 г. на объединенной научной конференции кафедр патологии человека ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова и госпитальной хирургии №1 л/ф ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Материалы диссертационной работы доложены на XLVI международной научно-практической конференции «Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования», XXXI International scientific conference «European Research».

Внедрение результатов исследования

Фактические данные диссертационного исследования и теоретические заключения, сделанные на их основе, включены в материалы для преподавания (лекции, занятия и др.) и используются при обучении студентов, подготовке ординаторов, аспирантов и слушателей на кафедрах патологии человека ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ и госпитальной хирургии №1 л/ф ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научных специальностей 14.03.03 – Патологическая физиология (пунктам № 2, 4, 5, 8 области исследования паспорта специальности «патологическая физиология») и 14.01.17 – Хирургия (пунктам № 1, 2, 4 области исследования паспорта специальности «хирургия»).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, отражающих основные результаты диссертации, из них: 2 статьи – в изданиях из Перечня Университета/Перечня ВАК при Минобрнауки России, 5 научных статей в журналах, входящих в международные базы данных (Web of Science, Scopus, Chemical Abstracts), включая одну статью в журнале второго квартиля и две статьи в журналах первого квартиля, а также 2 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 224 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы «материалы и методы исследования», 3-х глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка условных обозначений и списка литературы. Работа иллюстрирована 69 рисунками и 35 таблицами. Библиографический указатель включает 305 источников литературы, в том числе 113 ссылок на русскоязычные работы и публикации в российских журналах, а также 192 ссылки на англоязычные работы и зарубежные публикации.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы и методы исследования

Экспериментальное доклиническое рандомизированное контрольно-сравнительное исследование выполнено на 112 белых крысах линии Wistar одного пола (самцы) зрелого возраста (9 месяцев). Масса тела крыс в день моделирования ран составила 424 ± 55 г, медиана 410 г при межквартильном интервале 380:460 г.

Моделирование кожных ран выполняли под общей анестезией (хлоралгидрат 300 мг/кг внутривенно). На выбритой коже спины на одинаковом расстоянии по обе стороны от позвоночника с помощью специального устройства (Патент РФ №79701/10.01.2009) формировали квадратные раны заданного размера (длина каждой стороны 11 мм), удаляя все слои кожи вплоть до мышечной фасции. Всего было смоделировано 224 раны (две раны на каждой крысе). Площадь ран в день моделирования составила 132 ± 13 мм² (Me = 128,8 мм²).

Для реализации поставленной цели и задач была избрана модель острой кожной раны как прототип небольших операций, выполняемых под местной анестезией в хирургии и косметологии, которые по численности превосходят все другие хирургические вмешательства. Поскольку проблема заживления ран наиболее остро стоит у людей во второй половине жизни, эксперимент проведен на крысах не молодого, а зрелого возраста. Акцент в работе сделан на первых этапах регенерации, так как от успешности их течения зависит станет ли рана хронической или произойдет эффективное и качественное исцеление. В качестве сравнения лекарственных средств были выбраны разные по механизмам действия и способам применения формы, а их эффективность в отношении лечения ран ранее уже была доказана.

В работе представлены результаты лечения 4 серий животных, каждая из которых включала по 2 лекарственных группы, всего исследовали 8 групп ран: (1) Контроль_0 (K0) – интактные раны, заживающие под струпом без воздействия лекарственных средств; (2) Контроль_фр (Kфр) - в края ран в день моделирования (сутки 0) однократно инъекционно вводили изотонический физиологический раствор натрия хлорида (0,9% NaCl); (3) Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) - в края ран в день моделирования инъекционно вводили взвесь культуры прогениторных МСК, полученных из пуповины человека в концентрации $0,5 \times 10^6$ (всего 100.000 МСК в рану); (4) Контроль_мск – интактные контралатеральные раны группы МСК, на противоположной стороне тела, без непосредственного лекарственного воздействия (отдаленное/системное действие МСК); (5) Полимерное соединение с диоксидом церия (ПСДЦ) - на 0, 1, 3, 7 сутки наружно на поверхность ран наносили биопрепарат, содержащий биосовместимые наночастицы диоксида церия (CeO₂), интегрированные в гидрогелевую матрицу, включающую природные и синтетические полимеры структурообразующих полисахаридов (хитозан, водорастворимые

производные целлюлозы пектин, агар-агар, алгинат); (6) ПСДЦ+МСК - на 0, 1, 3, 7 сутки наружно наносили биопрепарат, содержащий ПСДЦ и МСК (50000 клеток на рану); (7) ДХ - в раны этой группы на 0, 1, 3, 7 сутки наружно наносили комбинированную противомикробную мазь Левомеколь[®], содержащую в 1 грамме Диоксометилтетрагидропиримидин (40 мг) и Хлорамфеникол (7,5 мг); (8) Депротеинизированный гемодериват крови телят (ДГКТ, препарат Актовегин[®] в концентрации 40 мг/мл) инъекционно вводили в края ран в сутки 0, а также на 1 и 3 сутки препарат вводили внутримышечно в дозе 0,2 мл. Таким образом, среди 8 групп 3 были с инъекционным введением лекарственных средств в края раны (в раны групп Кфр, МСК, ДГКТ через единый прокол в сутки 0 вводили по 0,2 мл раствора каждого препарата), 3 – с наружным нанесением лекарства (на поверхность ран групп ПСДЦ, ПСДЦ+МСК, ДХ на 0, 1, 3, 7 сутки наносили средство в объеме 1 мл на см²), 2 группы ран были интактными, заживающими под струпом (К0 и Контроль_мск). Методика и объем введения препаратов во всех ранах инъекционных и наружных средств была однотипной и выполнялась в стандартных условиях (комнатная температура 22-23°C; влажность воздуха 50%±5%). Весь период исследования животные содержались в индивидуальных клетках в стандартных условиях вивария при световом режиме 12/12 со свободным доступом к пище и воде.

Контрольных исследовательских точек было 6: 0 сутки (моделирование ран, измерения, лечение), оценка динамики заживления ран осуществляли на 1, 3, 5, 7, 14 сутки. На 3, 7, 14 сутки эксперимента выводили по 7 животных каждой группы под общей анестезией (хлоралгидрат 300 мг/кг внутривенно).

Исследование выполнено с использованием современных методов визуального, инструментального и лабораторного контроля. На 0, 1, 3, 5, 7, 14 сутки эксперимента осуществляли осмотр животных, их взвешивание (весы Supra BSS-4095), оценку динамики размеров и состояния ран по показателю площадь ран (в мм², с помощью программы JMicroVision 1.2.7 (Швейцария) по фотографиям, сделанным по единой методике. Изменения площади ран относительно первоначального размера вычисляли путем вычитания $S_x - S_0 = \Delta S$, где S_0 – площадь раны в день 0, S_x – площадь раны на 1, 3, 5, 7 или 14 сутки. Положительное значение означало увеличение площади ран, отрицательное – сокращение.

В сутки 0 (всем крысам) и перед эвтаназией на 3, 7 и 14 сутки у наркотизированных животных проводили исследование состояния микрогемодикуляции с помощью аппаратно-программного комплекса для электрофизиологических исследований MP150 (BIOPAC Systems, Inc, США), который включает модуль для лазер-доплеровской флоуметрии LDF100C, датчик для лазер-доплеровской флоуметрии TSD145 и программное обеспечение AcqKnowledge version 4.4.1. Игольчатый датчик устанавливали на коже по центру каждой из 4 сторон стандартной квадратной раны (1,5-2 мм от ее края), фиксируя наличие сдвига частоты отраженного сигнала

и, в соответствии с алгоритмом программной обработки сигнала, перфузионные единицы (Blood Perfusion Units, BPU). Итоговый показатель микроперфузии - усредненная величина BPU от всех 4-х сторон каждой раны. В день 0 медианы показателя микрогемоперфузии по 4-м сторонам ран составил 105 – 121 BPU (при межквартильном интервале Q1: 79-96 BPU; Q3: 139-157 BPU). В среднем по всей ране в день 0 показатель микрогемоперфузии составил (Me) 115 BPU при межквартильном интервале 96 : 147 BPU.

Для гистологического анализа были сделаны три последовательных среза каждой раны у животных, выведенных из эксперимента на 3, 7 и 14 сутки. Срезы окрашивали по 3 методам: гематоксилин-эозином (для описательной световой микроскопии с оценкой эпителлизации ран), гематоксилином (для обработки в программе Image-J (National Institutes of Health, USA) с количественным анализом фибробластных и лейкоцитарных клеток по их морфологическим характеристикам в слоях грануляций), по Ван-Гизону (для оценки коллагенизации раны, включая локацию коллагена, объем и степень его зрелости). На каждом срезе выделяли три равные по протяженности области (центр ран и два их противоположных края). Микроскопию выполняли при увеличениях $\times 40$, $\times 100$, $\times 400$ с использованием микроскопов Leica CME (Германия) и Levenhuk D740 (США).

Представленный материал диссертации был получен в ходе выполнения гранта ФГБУ Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (232GRNTIS5/35963), посвященного разработке вариантов биомедицинского полимерного продукта, стимулирующего заживление ран. Цикл медико-биологических работ осуществлялся комплексным межведомственным коллективом сотрудников ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), ФГБОУ ВО Курский ГМУ Минздрава России и ООО «ИНТЭКОС».

Статистический анализ результатов исследования проведен с использованием программы SPSS 23.0 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM, США) с применением стандартных параметрических и непараметрических критериев. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Описательная статистика непрерывных количественных данных представлена в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего при нормальном распределении, а также в виде медианы (Me), значений нижнего Q1 (25%) и верхнего Q3 (75%) квартилей при распределении, отличном от нормального. Для сравнения двух независимых непараметрических выборок использовали критерий Манна-Уитни. Для сравнения более двух независимых выборок применяли критерий Крускала-Уоллиса. Для сравнения двух зависимых выборок использовали критерий Вилкоксона. Качественные показатели анализировали в процентах, их сравнительный анализ выполняли по критерию χ^2 (анализ таблиц

сопряженности). Для определения взаимосвязи разных показателей проведен корреляционный анализ по методам Спирмана и Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ собственных исследований

Результаты оценки динамики размеров ран.

В ходе исследования было установлено, что заживление интактной острой раны (без лечения, K0) сопровождалось сокращением её площади к 7 суткам в 1,31 раза, а за 2 недели площадь ран группы K0 сокращалась в среднем 5,94 раза. Площадь ран группы K0 к 14 суткам в среднем составила 22,1 мм² при межквартильном интервале [15,5 : 30,6] мм². Визуальные признаки воспаления с увеличением размеров ран регистрировались до 3 суток, а позитивные изменения были заметны с 5 суток. В группе Kфр наблюдалось значимое увеличение площади ран вплоть до 5 суток с возвращением исходных размеров на 7 сутки, при этом в период 3-7 дни площадь ран группы Kфр была на 22-26% больше, чем в группе K0. То есть дополнительная даже однократная инъекционная травматизация углов ран приводила к пролонгации воспаления и задержке начала регенерации до 5-7 суток. В итоге к 14 суткам площадь ран группы Kфр составила в среднем 25,9 мм² [18,4 : 29,0], сократившись в 4,56 раза (в группе K0 этот регресс был в 1,3 раза больше, $p < 0,05$) (рис. 1).

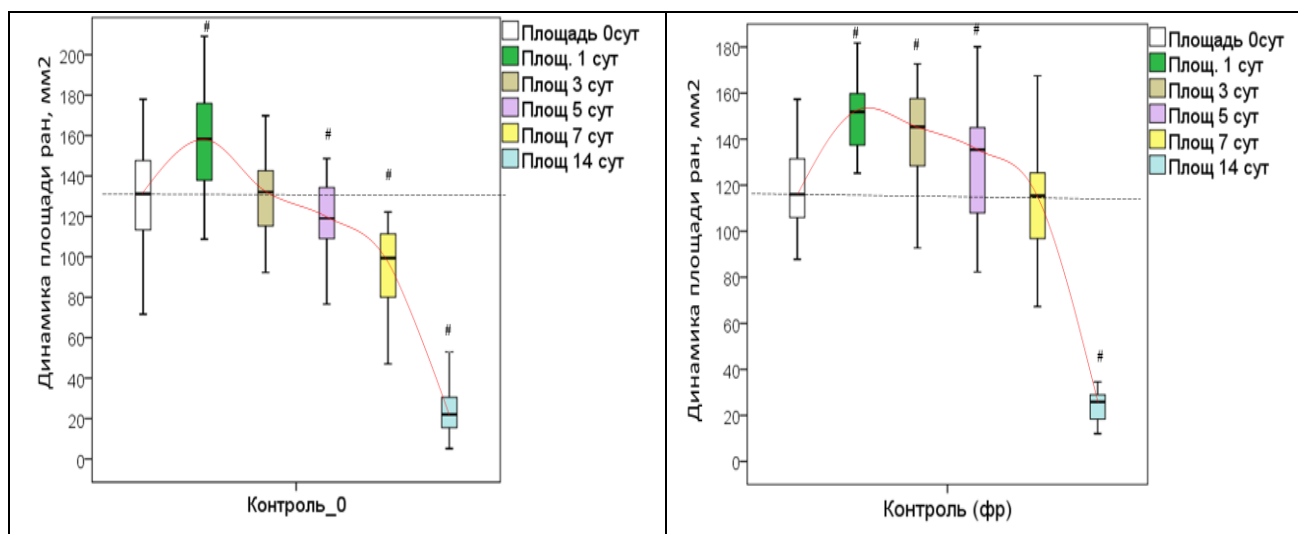


Рисунок 1 - Динамика площади ран групп Контроль_0 Контроль_фр в период с 0 до 14 сутки исследования (# - различие связанного показателя относительно дня 0 в пределах одной группы при $p < 0,05$; критерий Вилкоксона).

Назначение ДХ и ДГКТ было мало эффективным, хотя и сопровождалось лучшим сокращением площади ран по сравнению только с группой Kфр лишь на 14 день эксперимента. Площадь ран группы ДХ сократилась за 2 недели в среднем в 6,71 раза, группы ДГКТ - в 7,68 раза, это соответственно в 1,46 и 1,68 раза лучше, чем в группе Kфр, однако от группы K0 различий не было установлено на всех точках исследования ($p > 0,05$). Применение ДХ сопровождалось тенденцией к замедлению заживления ран вплоть до 7 суток. Площадь ран

группы ДХ вернулась к начальному размеру на 2 дня позже по сравнению с К0 (на 5-е сутки площадь ран группы ДХ была в 1,17 раза больше, чем в группе К0, а на 7-е сутки – в 1,09 раза больше; $p > 0,05$). В группе ДГКТ наблюдали значимое увеличение площади ран до 3 суток с возвращением к исходным размерам на 5 сутки, при этом вплоть до 7 суток размер ран не отличался от группы Кфр ($p > 0,05$).

Применение МСК продемонстрировало достоверную эффективность на 1-5 сутки при локальном введении (МСК) и 1-3 сутки при системном применении (Контроль_мск), объективизируя ингибирование патофизиологических воспалительных процессов в острую фазу, что в результате улучшало процесс регенерации ран к исходу 14 суток. Площадь ран групп МСК и Контроль_мск, в отличие от ран групп К0 и Кфр, не увеличивались в размере в первые дни, на 1-3 сутки, их сокращение происходило раньше, начиная с 3 суток, т.е. на 2 дня раньше, чем в группе К0 и на неделю раньше, чем в группе Кфр. К 14 суткам площадь ран группы МСК составила в среднем $15,3 \text{ мм}^2$ [$10,5 : 21,2$], сократившись в 8,8 раза относительно исходного размера на 0 сутки, группы Контроль_мск – $11,3 \text{ мм}^2$ [$9,0 : 24,3$], сократившись за 2 недели в среднем в 11,9 раза, демонстрируя значимое улучшение результата заживления в 1,9-2,0 раза относительно контрольных ран групп К0 и Кфр ($p < 0,05$). Статистическая неразличимость размеров ран в группах МСК и Контроль_мск на всех точках исследования говорит о сопоставимом локальном и системном эффектах клеточной терапии.

Установлена эффективность обеих полимерных изделий (ПСДЦ и ПСДЦ+МСК), при этом применение ПСДЦ+МСК оказалось наилучшим. Площадь ран группы ПСДЦ была достоверно меньше по сравнению с контрольными ранами на 1, 3 и 14 сутки ($p < 0,05$), площадь ран группы ПСДЦ+МСК была меньше, чем в К0 и Кфр на 1, 3, 5, 7, 14 сутки ($p < 0,05$). На 14 сутки площадь ран в группе ПСДЦ составила в среднем $11,9 \text{ мм}^2$ [$7,7 : 17,5$] мм^2 , сократились за 2 недели в 11,84 раза ($p < 0,01$). В группе К0 площадь ран на 14 сутки была значимо в 1,86 раза больше ($p < 0,01$), а в группе Кфр - в 2,18 раза больше ($p < 0,01$), чем в группе ПСДЦ. Площадь ран группы ПСДЦ+МСК на 14 сутки составила в среднем $8,5 \text{ мм}^2$ [$5,7 : 11,6$] мм^2 , уменьшившись по сравнению с 0 днем в 16,73 раза ($p < 0,01$) – это был максимальный эффект среди всех групп. В группе К0 площадь ран на 14 сутки была в 2,60 раза больше ($p < 0,01$), в группе Кфр - в 3,05 раза больше ($p < 0,01$), чем в группе ПСДЦ+МСК. Площадь ран группы ПСДЦ по сравнению с ранами группы ПСДЦ+МСК была больше на 7 сутки в среднем в 1,26 раза ($p < 0,05$), а на 14 - в 1,40 раза ($p > 0,05$). Наибольшее различие с контрольными ранами было достигнуто на 7-14 сутки, демонстрируя то, что лечение ПСДЦ+МСК уменьшает их площадь по сравнению с ПСДЦ на 19,5% на 7 сутки и 29,2% на 14 сутки.

Выявлены значимые множественные различия по показателю площадь ран на 1, 3, 5, 7, 14 сутки (рис. 2).

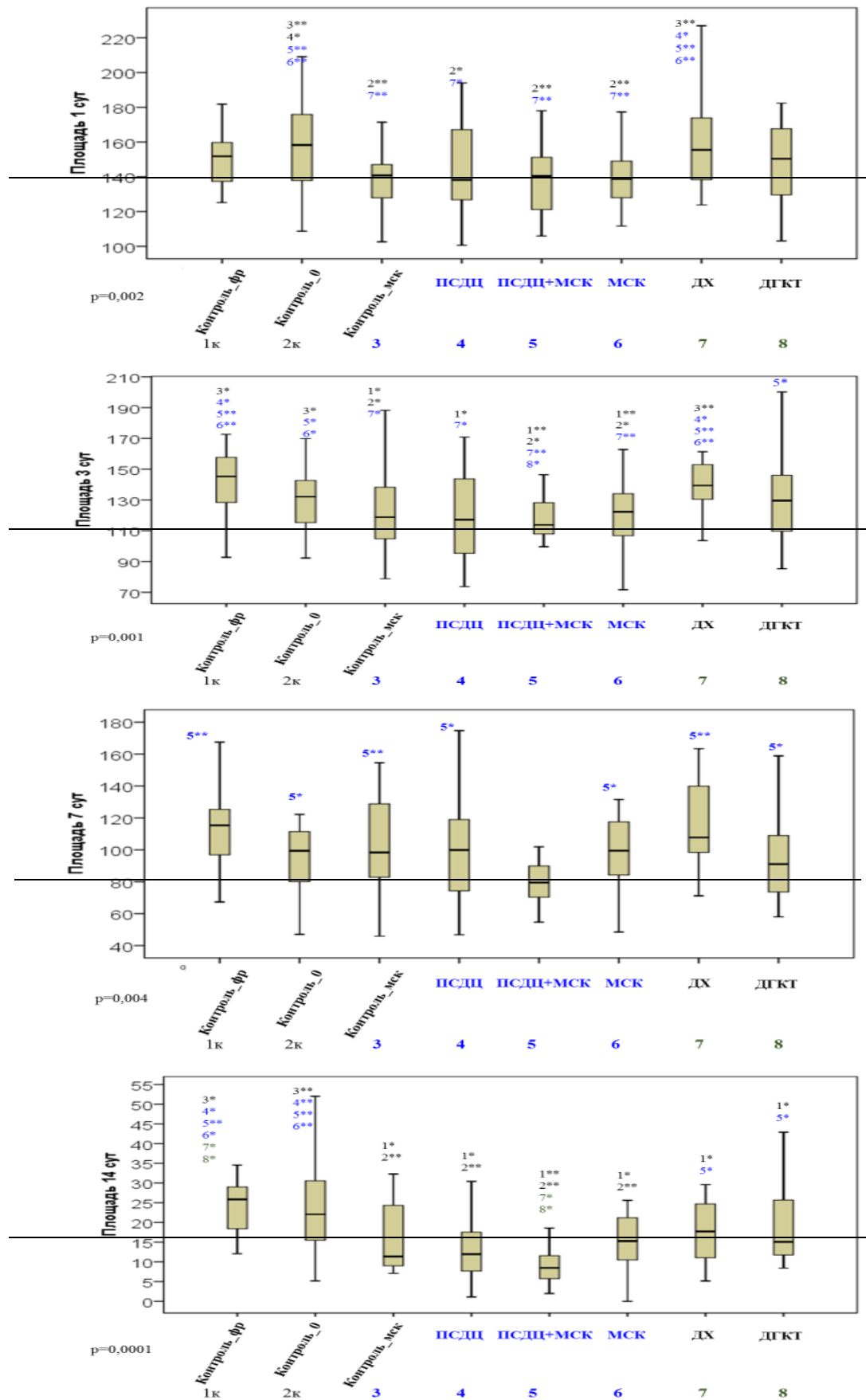


Рисунок 2 - Показатель площадь ран к исходу 1, 3, 7 и 14-х суток исследования в разных группах (* - значимое различие показателя между группами Кфр (1), К0 (2), К_мск (3), ПСДЦ (4), ПСДЦ+МСК (5), МСК (6), ДХ (7), ДГКТ (8) при $p < 0,05$, ** - при $p < 0,01$).

На 1 сутки к градации «лучшего» результата были отнесены группы ПСДЦ+МСК, МСК, Контроль_мск, ПСДЦ, «худшего» - группы ДХ и К0, остальные группы (ДГКТ и Кфр) были в обеих подгруппах. К исходу 3 суток в последовательности от худшего к лучшему группы ран были распределены следующим образом: ДХ = Кфр > К0 = ДГКТ > ПСДЦ ≥ МСК ≥ Контроль_мск > ПСДЦ+МСК, а к исходу 5 суток так: ДХ = Кфр > ДГКТ > К0 = ПСДЦ = МСК > Контроль_мск > ПСДЦ+МСК. Таким образом, вплоть до 5 суток наименьшие размеры были зарегистрированы в ранах групп ПСДЦ+МСК, Контроль_мск, МСК и ПСДЦ. На 7 сутки в «лучшую» подгруппу вошли только раны группы ПСДЦ+МСК, которые значимо отличались от всех остальных групп. На 14 сутки группы расположились следующим образом в последовательности показателя площадь ран (от худшего к лучшему): Кфр > К0 > ДГКТ = ДХ > ПСДЦ = Контроль_мск = МСК > ПСДЦ+МСК.

Результаты исследования микрогемоциркуляции кожи по краям ран.

На 3 сутки исследования уровень перфузии увеличился относительно дня 0 в ранах групп ДГКТ и, в наибольшей степени, ДХ (уровень микрогемоциркуляции по краю ран группы ДХ был в 1,5-2,1 раза выше, чем во всех других группах, $p < 0,05$) (рис. 3). Увеличение гемоперфузии по краю ран на 3 сутки относительно 0 дня коррелировало с увеличением размеров ран, явившись ранним прогностически неблагоприятным маркером.

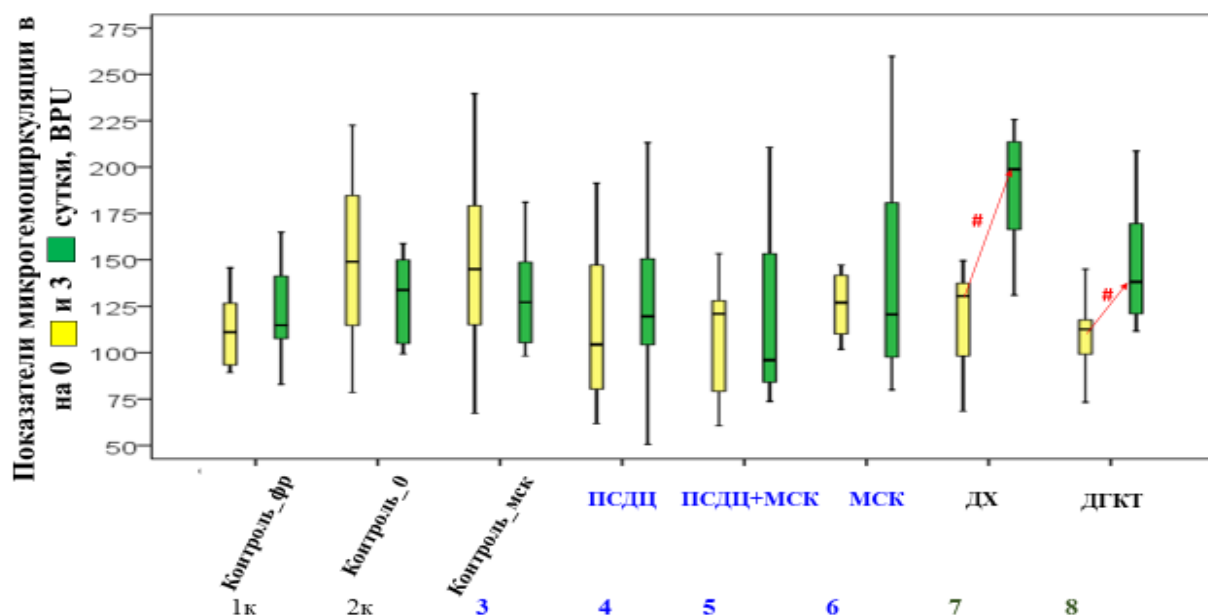


Рисунок 3 - Динамика микрогемоциркуляции на 0 и 3 сутки в ранах разных групп; # - различие динамики связанного показателя в группе относительно дня 0 при $p < 0,05$ (крит. Вилкоксона).

На 7 сутки уровень гемоперфузии не менялся относительно 0 дня в контрольных ранах и увеличился в ранах, которых лечили МСК и Контроль_мск (в 1,2-1,4 раза, $p < 0,05$) и в наибольшей степени ПСДЦ+МСК и ПСДЦ (в 1,6-1,7 раза, $p < 0,05$). В группах ДГКТ и ДХ

положительный перфузионный эффект, зарегистрированный на 3 сутки, завершился и сравнялся к концу 7-х суток с таковым у контрольных животных, не отличаясь от уровня микрогемоциркуляции, установленного на 0 сутки (рис. 4). Корреляций перфузии с размером ран на 7 сутки не найдено.

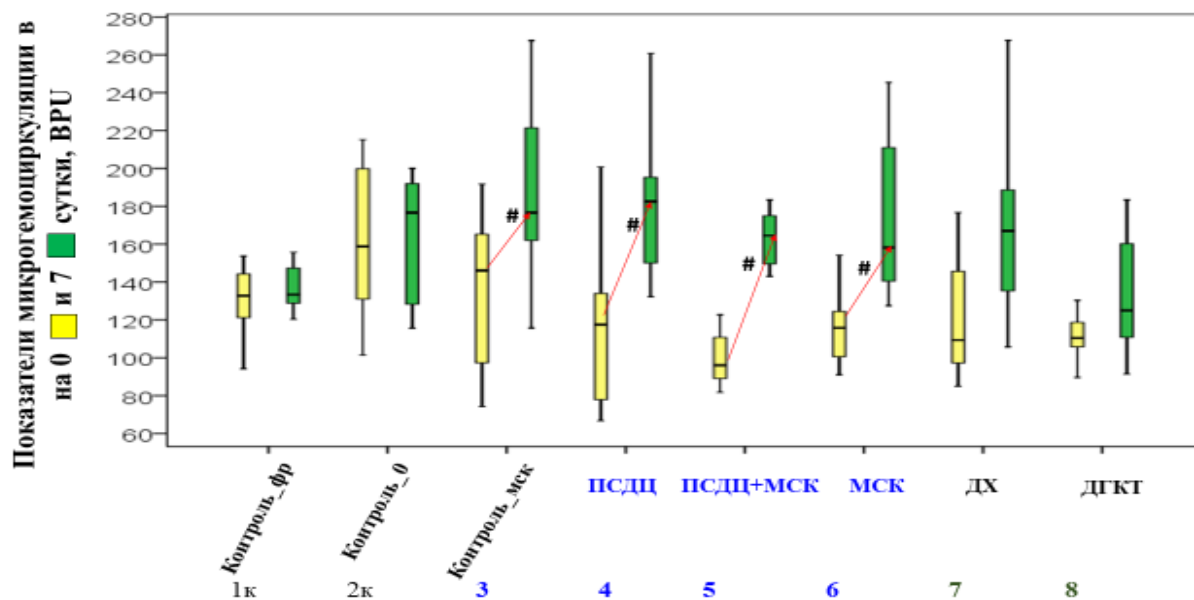


Рисунок 4 - Динамика гемоциркуляции на 0 и 7 сутки в ранах разных групп; # - различие динамики связанного показателя в группе относительно дня 0 при $p < 0,05$ (кр. Вилкоксона).

На 14 сутки исследования показатель микрогемоциркуляции увеличился относительно дня моделирования во всех группах ран, при этом наиболее значимо (в среднем в 1,5-2,0 раза) это произошло в группах Кфр, ДХ, ДГКТ, ПСДЦ и ПСДЦ+МСК. Максимальный уровень перфузии по краю ран 14 сутки был в ранах групп К0 и Кфр, превосходя в среднем в 1,2-1,4 раза таковой в группах Контроль_мск, МСК, ПСДЦ+МСК и ПСДЦ (где данный показатель был наименьшим), не отличаясь при этом от ран групп ДХ и ДГКТ (рис. 5).

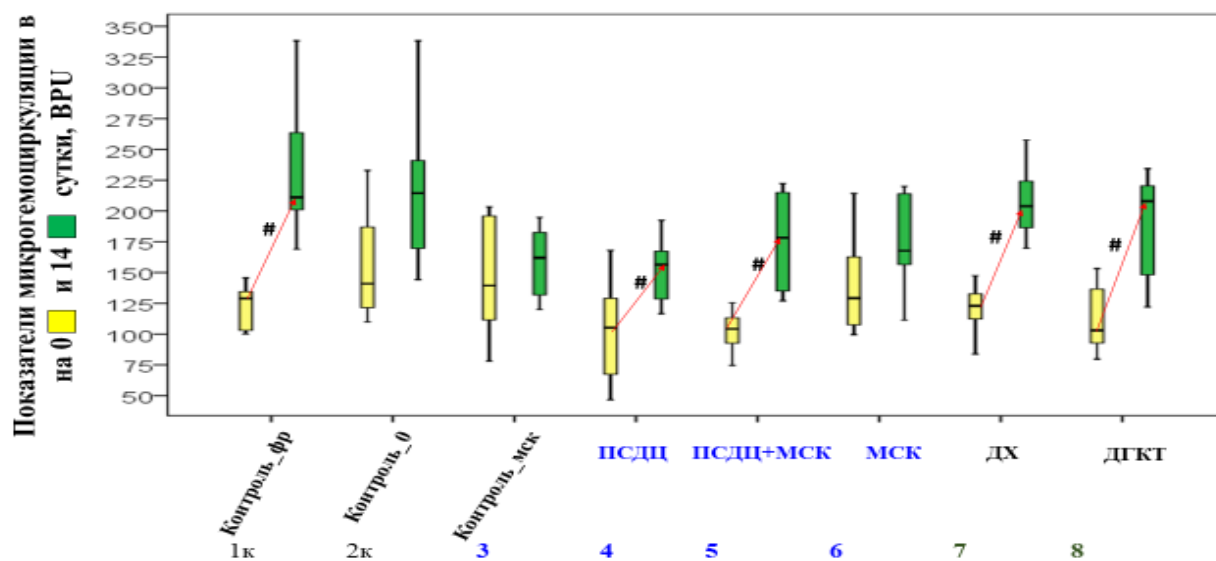


Рисунок 5 - Динамика микрогемоциркуляции на 0 и 14 сутки в ранах разных групп; # - различие динамики связанного показателя в группе относительно дня 0 при $p < 0,05$ (крит. Вилкоксона).

Корреляционный анализ выявил значимые прямые взаимосвязи умеренной силы между показателем микрогемоциркуляции на 14 сутки и показателями площадь ран на 14 сутки ($r=0,403$; $p<0,01$). Следовательно, низкий уровень перфузии ткани края ран был взаимосвязан с ускорением темпов регенерации, что может служить маркером оптимистичного прогноза, что подтверждалось при морфометрическом исследовании гистопрепаратов.

Результаты гистологического и морфологического исследования.

Гистологическая картина на 3 сутки раневого процесса характеризовалась признаками экссудативного воспаления, проявляющегося расширением и полнокровием сосудов, отеком тканей, эмиграцией лейкоцитов из кровеносного русла и инфильтрация ими грануляционной ткани. В разных отделах ран содержание лейкоцитов было больше, чем число фибробластов в 1,8-2,3 раза ($p < 0,05$), варьируя по группам (рис.6).

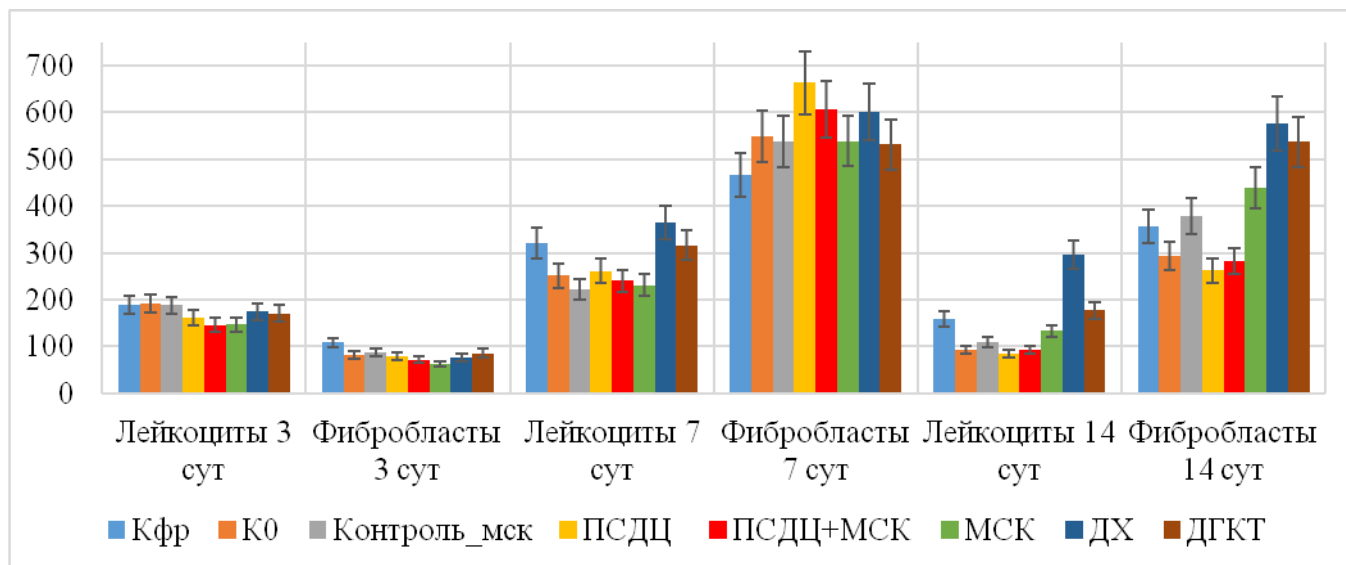


Рисунок 6 - Число лейкоцитов и фибробластов в тканях разных отделов ран разных групп на 3, 7 и 14 сутки исследования (в среднем по всем отделам раны, абс.)

Наиболее значимые механизмы ранозаживления протекали в тканях центра ран, где число лейкоцитов было в 1,2-1,9 раза выше, чем по периферии ран ($p < 0,05$). При этом наименьшее число лейкоцитов на 3 сутки было зарегистрировано в группах МСК, ПСДЦ+МСК и ПСДЦ. Наименьший размер ран к 3 суткам коррелировал с меньшей концентрацией лейкоцитов в центре ран, и с наибольшим процентным содержанием фибробластов в центре ран, что ассоциировалось со скорейшим переходом фазы экссудации в пролиферацию, что максимально проявилось в группе ПСДЦ+МСК.

На 7-е сутки гистологически в тканях ран определяли явления пролиферативной фазы, формировались новые ткани, обильно инфильтрированные клетками разного типа и степени зрелости. Увеличилась общая численности клеток относительно 3 дня в среднем в разных группах в 2,0-3,9 раза в центре ($p < 0,05$) и в 3,0-6,5 раза в краях ран ($p < 0,05$). То есть на 7 сутки

наибольшую роль в процессе заживления ран играли процессы, протекающие по краям ран. Зарегистрировано увеличение лейкоцитарных (в среднем в 1,18-2,09 раза в разных группах), и, особенно, фибробластных клеток (в среднем в 4,32-8,56 раза в разных группах, $p < 0,05$). Поэтому на 7 день раневой процесс в основном обеспечивали фибробласты, продуцирующие межклеточный матрикс, включая коллаген. Число фибробластов на 7 сутки в разных отделах ран было в 1,5-2,5 раза больше, чем лейкоцитов ($p < 0,05$). В наименьшей степени к исходу 7 суток число всех клеток увеличилась в группе Кфр (в среднем в 2,04 раза возросло число клеток в центре и в 3,01 раза в краях ран), в наибольшей – в группах ПСДЦ (в среднем в 3,92 раза возросло число клеток в центре и в 6,49 раза в краях ран, $p < 0,05$) и ПСДЦ+МСК (в 3,32 раза увеличилось число клеток в центре и в 5,55 раза в краях ран, $p < 0,05$). Стабильно высокий уровень лейкоцитарной инфильтрации на 7 сутки служил маркером сохраняющегося воспаления и замедления процесса репарации, а низкая концентрация лейкоцитов, особенно в краях ран - маркером ускоренного заживления. При благоприятном течении раневого процесса лейкоцитов было вдвое меньше в краях, чем в центре ран, а главная роль в процессе регенерации принадлежала клеткам фибробластного дифферона. Наибольшим было число фибробластов в группах ПСДЦ и ПСДЦ+МСК, а значимое преобладание процентного их содержания в краях ран по сравнению с центром ран было установлено в группах К0, МСК, Контроль_мск, ПСДЦ и ПСДЦ+МСК (рис. 7).

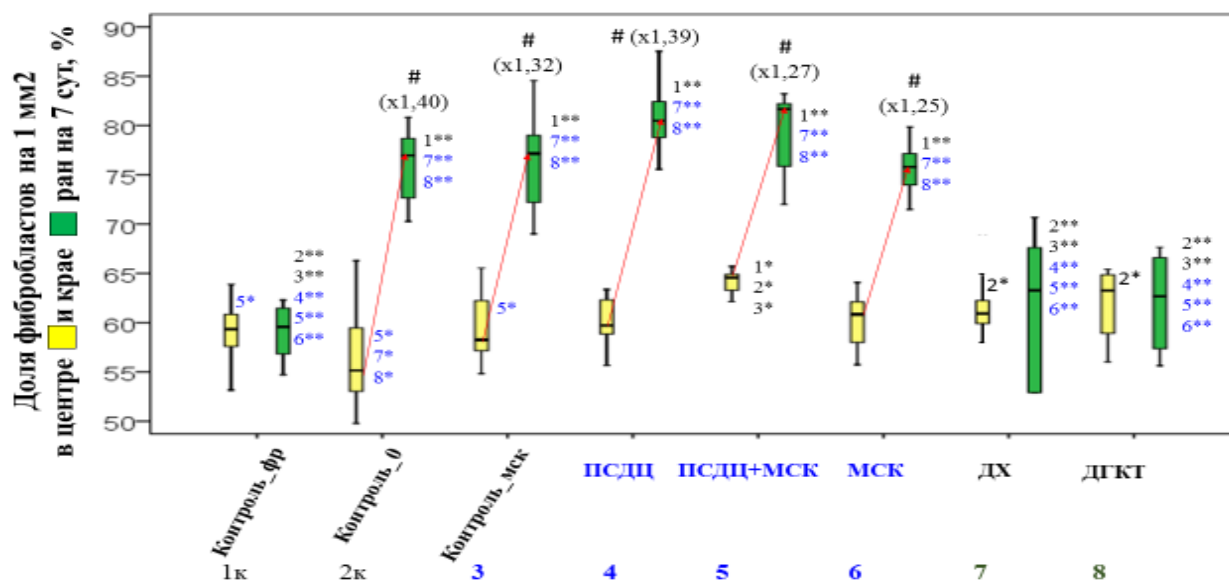


Рисунок 7 - Доля фибробластов в тканях центра (желтый) и края ран (зеленый) разных групп (%). Значимость межгрупповых различий по апостериорным тестам: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$. # - значимое различие показателя в центре и крае раны в пределах одной группы при $p < 0,05$.

Лучше регенерировали к 7 суткам раны с наибольшей численностью и концентрацией фибробластов и наименьшей численностью лейкоцитов, что особенно характерно для тканей края ран. Это было подтверждено результатами корреляционного анализа показателей размера ран и морфометрических данных, исследованных на 7 сутки эксперимента (табл.1).

Применение ПСДЦ и ПСДЦ+МСК обуславливало активацию пролиферативных процессов и увеличение численности фибробластов, их ускоренного созревания с продукцией белков межклеточного матрикса. По показателям морфометрии группы МСК и Контроль_мск не отличались от группы К0 на 7 сутки. Позитивный результат этих групп на 7 сутки ассоциирован с влиянием на лейкоциты, на более раннюю фазу заживления. Лейкоциты мигрировали в рану быстрее, обеспечивая противовоспалительный эффект МСК, а за счет этого и ускорение перехода в пролиферативную фазу, не влияя непосредственно на фибробласты, как это было в группах ран, которые лечили полимерами. ДХ и ДГКТ также не оказывали значимого влияния на фибробласты на 7 сутки. В ранах группы ДХ процентное содержание фибробластов было низким, а лейкоцитов - высоким. Кроме того, не увеличилось содержания фибробластов относительно центра ран, что было характерно для ран группы К0, свидетельствуя о неэффективности использования этого препарата. Введение ДГКТ с травмированием углов ран и усилением воспалительного ответа задерживало процессы регенерации относительно неинвазивных групп, а морфометрические показатели не отличались от группы Кфр ($p > 0,05$).

Корреляционный анализ установил, что к 14 суткам лучше заживали раны с наименьшим числом клеток во всех отделах ран, при этом процент содержания фибробластов преобладал над концентрацией лейкоцитов (табл.1).

Таблица 1 - Корреляционный анализ размера ран и морфометрических показателей на 7 и 14 сутки (представлены значения $r > 0,2$ при $p < 0,05$).

Отдел раны	Показатель	Площадь ран на 7 сутки, мм ²	Площадь ран на 14 сутки, мм ²	Изменение размера ран к 7 сут (S0с – S7с, в мм ²)	Изменение размера ран к 14 сут (S0- S14, мм ²)
Центр	Общее число клеток (абс.)		0,304*	-0,346**	0,305*
	Число фибробластов (абс.)		0,273*	-0,354**	0,262*
	Число лейкоцитов (абс.)		0,356**	-0,259**	0,389**
Край	Общее число клеток (абс.)		0,331*		0,341*
	Число фибробластов (абс.)	-0,213*		-0,504**	0,242*
	Число лейкоцитов (абс.)	0,354**	0,424**	0,564**	0,439**
	% Фибробластов	-0,360**	-0,480**	-0,607**	-0,437**
	% Лейкоцитов	0,360**	0,480**	0,607**	0,437**
	Фибробласты / Лейкоциты	-0,318*	-0,434**	-0,578**	-0,345**
В среднем по всей ране	Число фибробластов (абс.)	-0,282*	0,288*	-0,478**	0,275*
	Число лейкоцитов (абс.)	0,255*	0,385**	0,401**	0,420**
	% Фибробластов	-0,363**	-0,372**	-0,598**	-0,407**
	% Лейкоцитов	0,363**	0,368**	0,598**	0,405**
	Фибробласты / Лейкоциты	-0,331**	-0,353**	-0,554**	-0,363**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

На 14 сутки существенно сократилась численность всех клеток в среднем 1,5 раза по сравнению с 7 сутками (в 1,1-3,1 раза в центре и в 1,1-3,2 раза в краях ран). Особенно

уменьшилось число лейкоцитов, прямо коррелируя с сокращением площади ран. Соотношение клеток в центре и краях ран уравнивалось, свидетельствуя об одинаковой интенсивности регенераторных процессов во всех отделах раны. В наибольшей степени клеточная популяция в тканях центра и краев ран сократилась в группах полимерных средств (ПСДЦ в 2,98 раза, ПСДЦ+МСК в 2,04 раза; $p < 0,05$), в наименьшей - в группах ДХ и ДГКТ. В группе ДХ определили наибольшую концентрацию лейкоцитов. Концентрация фибробластов в тканях ран на 14 сутки была в 2,9 раза выше, чем лейкоцитов, достигая максимального процента в связи с их элиминацией. Выше концентрация фибробластов была в меньших по размерам ран (рис.8).

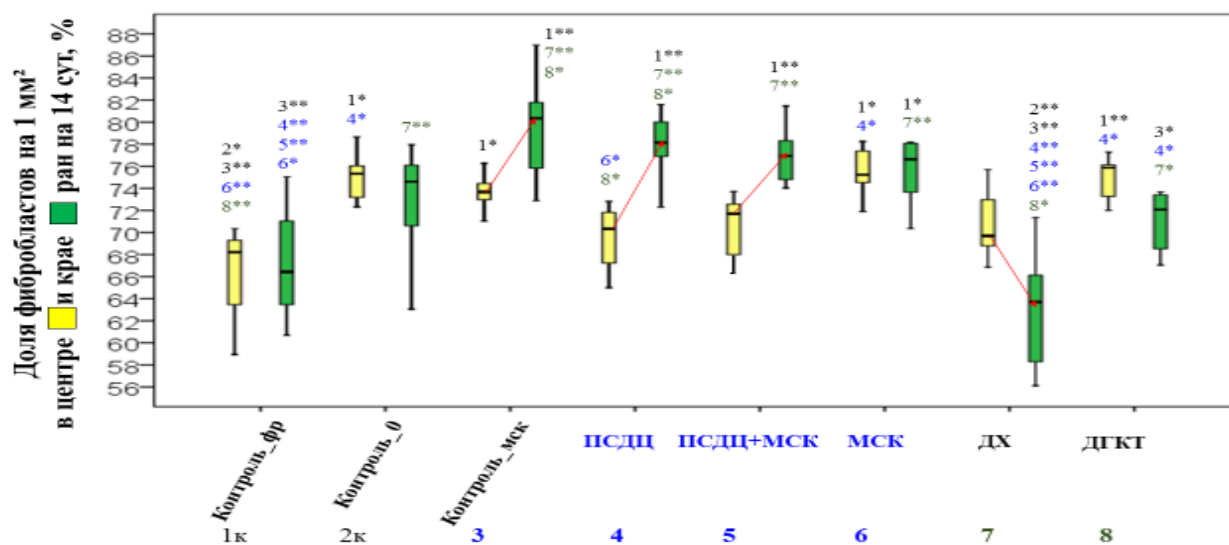


Рисунок 8 - Доля фибробластов в ткани центра (желтый) и края ран (зеленый) разных групп (в %). Значимость межгрупповых различий: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$; стрелками указано значимое различие показателя в центре и крае раны в пределах одной группы при $p < 0,05$.

Морфометрический результат коррелировал с лучшими итогами заживлений. В группах ПСДЦ+МСК и ПСДЦ к 14 суткам эпителизовались 100% ран (все отделы покрыты многослойным плоским ороговевающим эпителием), регистрировали наибольшее количество сформированных производных кожи (72-100%), а также наилучшее формирование и созревание коллагенового матрикса (рис.9).

Корреляционный анализ показателей морфометрии и микрогемодинамики и по выборкам ран животных, выведенных из эксперимента на 3, 7 и 14 сутки установил множество достоверных взаимосвязей. Высокий уровень гемоперфузии вокруг ран на 3 сутки исследования прямо коррелировал с числом лейкоцитов в крае ран ($r=0,289$; $p < 0,05$) и в целом по ране ($r=0,254$; $p < 0,05$) и показателем отношения фибробласты/лейкоциты в среднем по ране у животных, выведенных на 3 сутки ($r= -0,215$; $p < 0,05$). На 7 сутки исследования установлено, что высокий уровень гемоперфузии вокруг ран прямо коррелировал с числом фибробластов в крае ран ($r=0,239$; $p < 0,05$), а также с их процентным содержанием в краевых фрагментах ран

($r=0,302$; $p<0,05$) и в среднем по всем отделам раны ($r=0,274$; $p<0,05$) и отношением фибробласты/лейкоциты в крае ран ($r=0,292$; $p<0,05$) и в среднем по ране ($r=0,262$; $p<0,05$).

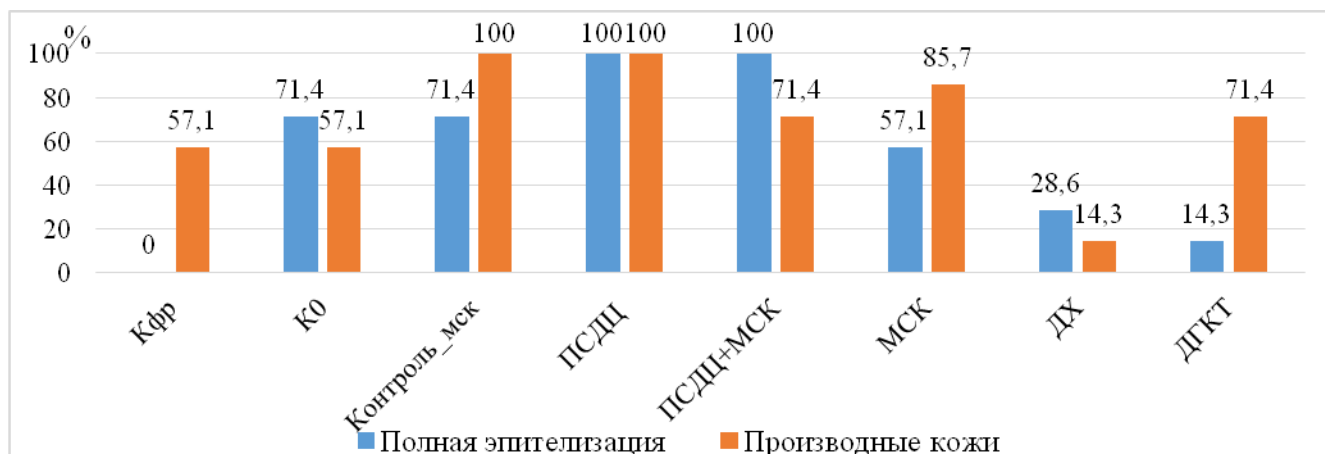


Рисунок 9 - Частота полной эпителизации всей поверхности ран и выявления сформированных производных кожи в разных группах на 14 сутки исследования.

На 14 сутки высокий уровень гемоперфузии кожи вокруг ран прямо коррелировал с числом лейкоцитов во всех фрагментах ран (в центре, краях и в целом по ране $r=0,258-0,318$; $p<0,05$), с их процентным содержанием во всех отделах ($r=0,346-0,389$; $p<0,05$) при обратной корреляции с показателем отношения фибробласты/ лейкоциты в крае ран ($r= -0,322$; $p<0,05$). Наибольшая сила корреляций была зарегистрирована по морфометрическим показателям края ран, а из динамических точек – на 14 сутки.

ВЫВОДЫ

1. При заживлении острой кожной раны без лечения под струпом визуальные признаки увеличения зоны воспаления регистрируются до 3 суток, позитивные изменения начинаются с 5 суток, к 7 суткам размер раны сокращается в 1,31 раза, за 2 недели - в 5,94 раза. Дополнительная даже однократная инъекционная травматизация ран пролонгирует воспаление и задерживает начало регенерации до 5-7 суток, снижая эффективность заживления к 14 суткам в 1,3 раза (сокращение за 2 недели в 4,56 раза).
2. Применение мезенхимальных стволовых клеток продемонстрировало максимальную эффективность на 1-5 сутки при локальном и 1-3 сутки при системном применении за счет противовоспалительных процессов, улучшая процесс регенерации к 14 суткам в 1,9-2,0 раза. Динамика заживления ран сопоставима при локальном и системном применении МСК.
3. При использовании ПСДЦ за 2 недели раны сократились в 11,8 раза, что в 2 раза лучше, чем в контроле. Максимальный эффект достигнут при использовании ПСДЦ+МСК (сокращение раны за 14 суток в 16,7 раза, что в 2,6 раза лучше, чем в контроле), ускоряя процессы заживления.
4. Не установлено преимуществ применения депротеинизированного гемодеривата крови телят на динамику размеров ран и течение экссудативного компонента воспаления и сочетания его с

пролиферативным компонентом, а применение диоксометилтетрагидропиримидина с хлорамфениколом сопровождается увеличением размера ран вплоть до 3 суток и задержкой регенерации не менее, чем на 2 дня по сравнению с контрольными группами.

5. Увеличение микрогемоперфузии кожи края раны на 3 сутки является признаком продолжения экссудативного воспаления, коррелируя с увеличением размера ран. Напротив, увеличение микрогемоперфузии на 7 сутки характеризует завершение перехода экссудации в пролиферацию, обеспечивая ускорение заживления. Высокий уровень перфузии на 14 сутки прямо коррелирует с наибольшим размером ран и связан с торможением темпов регенерации.

6. На 3 сутки число лейкоцитов превосходит число фибробластов в 1,8-2,3 раза, причем в тканях центра ран лейкоцитов в 1,2-1,9 раза больше, чем по ее краям. Наименьший размер ран к 3 суткам коррелирует с меньшей концентрацией лейкоцитов и наибольшим процентным содержанием фибробластов в тканях центра ран. Невысокий уровень лейкоцитарной инфильтрации, характерный для групп МСК, ПСДЦ+МСК и ПСДЦ, ассоциируется с противовоспалительным эффектом и ускорением перехода фазы экссудации в пролиферацию. Скорейший переход в пролиферативную фазу на 3 сутки установлен в группе ПСДЦ+МСК.

7. На 7 сутки заживление ран в наибольшей степени зависит от краевых механизмов регенерации, идущих в основном при участии фибробластов, которых в 1,5-2,5 раза больше, чем лейкоцитов, причем концентрации фибробластов в тканях края ран в 1,2-1,4 раза выше, чем в центре. Лучший эффект заживления характерен для ран с наибольшим числом фибробластов (особенно в краях ран) и наименьшим содержанием лейкоцитов. Максимальное число фибробластов разных степеней зрелости зарегистрировано на 7 сутки в ранах групп ПСДЦ+МСК и ПСДЦ. Стабильно высокий уровень лейкоцитарной инфильтрации на 7 сутки служит маркером сохраняющегося воспаления и замедления репарации, а низкая концентрация лейкоцитов, особенно в тканях края ран - маркером ускоренного заживления.

8. На 14 сутки сокращается содержание всех клеток в тканях ран всех групп в 1,5 раза по сравнению с 7 сутками, особенно лейкоцитарных, прямо коррелируя с сокращением размера ран. Регенераторные процессы сопоставимы во всех отделах ран. Концентрация фибробластов на 14 сутки в 2,9 раза больше, чем лейкоцитов, достигая максимального процента в связи с элиминацией последних. В наибольшей степени концентрация всех типов клеток сократилась в тканях ран групп ПСДЦ и ПСДЦ+МСК, в наименьшей - ДХ, где концентрация лейкоцитов наибольшая. Морфометрический результат коррелирует с лучшими итогами заживлений в группах ПСДЦ и ПСДЦ+МСК (к 14 суткам 100% ран этих групп покрыты многослойным ороговевающим эпителием), наибольшим количеством сформированных производных кожи (86-100%), плотностью и зрелостью вновь синтезированного коллагена.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Инъекции лекарственных веществ в края ран замедляют процесс регенерации, поэтому следует по возможности ограничивать количество таких манипуляций.
2. Доказанная доклиническая эффективность разработанных полимерных соединений на основе хитозана и целлюлозы, обогащенных наночастицами диоксида церия, особенно в комбинации с мезенхимальными стволовыми клетками, обуславливает целесообразность проведения дальнейших работ по изучению эффективности и безопасности этих соединений для последующего применения в клинической практике.
3. Обоснована целесообразность изучения клинического применения мезенхимальных стволовых клеток. Учитывая сопоставимость местного и системного действия МСК их применение целесообразно без дополнительного травмирования ран, что особенно удобно для лечения множественных ран. Поскольку максимальная эффективность МСК ограничивается первыми 3 сутками при системном и 5 сутками при локальном применении, для увеличения изолированного эффекта МСК целесообразно использовать каждые 5 дней.
4. Не следует широко применять антимикробные лекарственные средства (Левомеколь®) для лечения острых ран без признаков бактериальной обсемененности, так как они замедляют процессы заживления, а также Актовегин® для лечения острых кожных ран без ишемизации, так как они не влияют на скорость заживления ран в течении первой недели.
5. Неинвазивное исследование уровня микрогемоциркуляции кожи края раны позволяет прогнозировать результат заживления, метод может быть рекомендован для оптимального выбора лекарственного средства или их комбинаций, контроля эффективности лечения, для улучшения и ускорения процесса регенерации.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Vasin V.I.** Multicomponent polysaccharide essential formula of wound healing medicines enriched with fibroblast growth factor / E.V. Silina, N.V. Khokhlov, V.A. Stupin, N.E. Manturova, V.I. Vasin, E.V. Velikanov, A.L. Popov, V.B. Gavrilyuk, E.B. Artyushkova, M.P. Gladchenko, A.V. Ivanov, V.T. Dudka, A.A. Kryukov, Yu.V. Furman, A.N. Kaplin, A.V. Anikanov, M.A. Chernyatina, E.V. Anurova // **International Journal of Biomedicine**. -2019;9(3):247-250. DOI: 10.21103/Article9(3)_OA12 [Web of Science]
2. **Vasin V.I.** Efficacy of A Novel Smart Polymeric Nanodrug in the Treatment of Experimental Wounds in Rats / E.V. Silina, N.E. Manturova, V.I. Vasin, E.B. Artyushkova, N.V. Khokhlov, A.V. Ivanov, V.A. Stupin // **Polymers**. - 2020,12:e1126. DOI: 10.3390/polym12051126 [Scopus, Web of Science; Q1].

3. **Vasin V.I.** The Effect of Inflammation on the Healing Process of Acute Skin Wounds Under the Treatment of Wounds with Injections in Rats / V. Stupin, N. Manturova, E. Silina, P. Litvitskiy, V. Vasin, E. Artyushkova, A. Ivanov, M. Gladchenko, S. Aliev // **Journal of Experimental Pharmacology**. 2020;12:409-422. DOI: 10.2147/JEP.S275791 [Scopus; Q2].
4. **Васин В.И.** Динамика заживления кожной раны при применении инъекционных стимуляторов регенерации у крыс / Е.В. Силина, Н.Е. Мантурова, Е.Б. Артюшкова, П.Ф. Литвицкий, В.И. Васин, Т.Г. Синельникова, М.П. Гладченко, А.А. Крюков, А.В. Аниканов, А.Н. Каплин, М.Д.З. Наимзада, В.А. Ступин // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия**. - 2020;64(3): 54-63. DOI: 10.25557/0031-2991.2019.03.
5. **Васин В.И.** Сравнительная эффективность наружных препаратов с антибактериальным действием для лечения ран / В.А. Ступин, В.И. Васин, Н.Е. Мантурова, Е.Б. Артюшкова, М.П. Гладченко, А.В. Иванов, А.Б. Салтыков, Е.В. Силина // **Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б.В. Петровского**. - 2020. Т. 8, № 4. С. 135–142. DOI: 10.33029/2308-1198-2020-8-4-135-142
6. **Васин В.И.** К вопросу об эпидемиологии и лечении острых и хронических ран / В.И. Васин, В.А. Ступин, К.А. Корейба, В.Е. Ягжина, Е.Р. Сенина, В.В. Селюто, Е.В. Силина // **Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия естественные и технические науки**. – 2021; №04/2. -С. 70-74 DOI 10.37882/2223-2966.2021.04-2.01
7. **Васин В.И.** Влияние инъекционных лекарственных средств на заживление острых ран / В.И. Васин, В.А. Ступин, Е.В. Силина / Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования: сб. ст. по материалам XLVI Международной научно-практической конференции «Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования». – № 3(42). – М., Изд. «Интернаука», 2021. С.59-64. DOI:10.32743/25419854.2021.3.42.253382
8. **Васин В.И.** Эффективность и механизмы заживления ран при применении биополимеров и стволовых клеток / В.И. Васин // **European Research: сб. ст. XXXI Международной научно-практической конференции**. – Пенза: МЦНС «Наука и Просвещение». – 2021. С.240-242.
9. **Vasin V.** Acute Skin Wounds Treated with Mesenchymal Stem Cells and Biopolymer Compositions Alone and in Combination: Evaluation of Agent Efficacy and Analysis of Healing Mechanisms / E. Silina, V. Stupin, N. Manturova, V. Vasin, K. Koreyba, P. Litvitskiy, A. Saltykov, Z. Balkizov // **Pharmaceutics**. 2021, 13, 1534. – 17 pages. DOI:10.3390/pharmaceutics13101534 [Scopus, Web of Science; Q1].

Список сокращений

К0 - Контрольная группа интактных ран
Кфр - Контрольная группа с введением раствора 0,9% NaCl в края раны
Контроль_мск - Группа интактных ран на противоположной стороне тела животных, которым вводили мезенхимальные стволовые клетки
МСК - Мезенхимальные стволовые клетки
ПСДЦ - Полимерное соединение с диоксидом церия (CeO_2)
ПСДЦ+МСК - Комбинация полимерного средства ПСДЦ с МСК
ДГКТ - Депротеинизированный гемодериват крови телят (Актовегин®)
ДХ - Диоксометилтетрагидропиримидин + Хлорамфеникол (Левомеколь®)
Ме - медиана