

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

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКИЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

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

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Силина Екатерина Владимировна

доктор медицинских наук, профессор

Ступин Виктор Александрович

Москва – 2021

Оглавление

Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы (актуальность и перспективные направления в разработке средств для заживления ран).....	15
Глава 2. Материал и методы исследования	39
2.1. Материал исследования.....	39
2.2. Методы исследования.....	47
2.2.1. Методы измерения размеров ран.....	48
2.2.2. Методы оценки микрогемоциркуляции.....	50
2.2.3. Методы гистологического и морфологического исследования	52
2.2.4. Статистические методы.....	55
Глава 3. Результаты собственных исследований.....	57
3.1. Результаты оценки динамики размеров ран.....	57
3.1.1. Заживление под струпом контрольных ран (интактные раны и при использовании инъекции в края раны 0,9% раствора NaCl)	58
3.1.2. Динамика размеров ран при применении наружных ранозаживляющих противомикробных средств	65
3.1.3. Динамика размеров ран, для лечения которых применяли инъекционный стимулятор регенерации тканей (депротеинизированный гемодериват крови телят).....	69
3.1.4. Динамика размеров острых ран при применении прогениторных мезенхимальных стволовых клеток	73
3.1.5. Динамика размеров острых ран при применении полимерных биопрепаратов с наночастицами диоксида церия и с мезенхимальными стволовыми клетками... ..	82
3.1.6. Дисперсионный анализ динамики заживления ран по показателю площадь одновременно во всех группах исследования	96
3.2. Результаты исследования микрогемоциркуляции кожи по краям ран.....	103
3.2.1. Состояние ран к исходу 3-х суток исследования.....	103
3.2.2. Состояние ран к исходу 7-х суток исследования.....	106

3.2.3. Состояние ран к исходу 14-х суток исследования.....	109
3.3. Результаты морфологического и гистологического исследования.....	112
3.3.1. Состояние ран к исходу 3-х суток исследования.....	112
3.3.2. Состояние ран к исходу 7-х суток исследования.....	131
3.3.3. Состояние ран к исходу 14-ти суток исследования.....	155
3.3.4. Корреляционный анализ показателей микрогемоциркуляции и морфометрии.....	173
Заключение	175
Выводы	188
Практические рекомендации.....	191
Список сокращений и условных обозначений	192
Опубликованные по теме диссертации научные работы	193
Список литературы	195

Введение

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 [Архинов Д.В. и соавт., 2019; Дас М. и Бейкер А., 2016; Морозов С.Г. и соавт., 2020; 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, включая экссудацию и пролиферацию, идущие при участии лейкоцитарных клеток, образования грануляционной ткани, пролиферации фибробластов с формированием

межклеточного матрикса, что должно заканчиваться эпителизацией [Алексеева Н.Т., 2015; Королькова Т.Н. и соавт., 2019; Морозов С.Г. и соавт., 2020; 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.

Степень разработанности темы

В последнее десятилетие фармакопроизводители столкнулись с проблемой создания новых, более эффективных лекарственных средств и, как результат, количество новых субстанций с доказанной эффективностью на рынке прогрессивно сокращается [Baron J.M. et al, 2020; Garraud O. et al, 2017]. Наметилось несколько новых подходов. Во-первых, многообещающим стал возврат от химически синтезированных препаратов к веществам, содержащим биоактивные молекулы в растительном и животном сырье, но исследуемым на новом технологическом и научном уровне [Maver T. et al, 2015; Walton E.W., 2014]. В последнее время перспективными считаются многокомпонентные перевязочные средства на основе полимерных [Бежин А.И. и соавт., 2019; Kaygusuz H. et al., 2017; Masood N. et al., 2019; Rasool A. et al., 2019; Kalantari K. et al., 2020; Koivuniemi R., 2020, Li X.X. et al., 2020; Sulaeva I. 2020] и клеточных технологий [Паюшина О.В. и соавт., 2018; Петров Ю.П. и соавт., 2018; Kurita M, 2018; Ahmadi A.R. et al., 2019; Silina E., 2020]. Стали накапливаться данные исследований о положительной роли 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]. Во-вторых, подает большие надежды введение в лекарственные средства наночастиц других веществ, которые изменяют характеристики уже 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]. Оказалось, что диоксид церия способен в клеточной культуре или ране проявлять антиоксидантные свойства за счет способности менять свою

валентность и стабилизировать pH межклеточной и раневой среды [Charbgo F. et al., 2017; Dutta D. et al., 2016; Nelson B.C. et al., 2016; Rather H.A. et al., 2017]. В последние годы появились работы ученых разных стран, которые продемонстрировали эффективность применения наночастиц иоксида церия (CeO_2) для заживления кожных ран [Davan R. et al., 2012; Nethi S. et al., 2019; Xiaomin M. et al., 2019; Xue Huang. et al., 2017; Zgheib C. et al., 2019]. Однако это новое направления пока не имеет работ, соответствующих всем требованиям доказательной медицины в связи с раздробленностью поисковых исследований, проводимых с малым числом животных в экспериментах с разным размером и тяжестью ран, длительностью наблюдения и ограниченностью методов контроля за заживлением. Наконец, сравнительные эффекты многообещающего применения мезенхимальных прогениторных клеток и их производных в сочетании с лекарствами новых типов еще никто не изучал.

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 и 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 прогенеторных 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), мезенхимальных стволовых клеток 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 мезенхимальных стволовых клеток.

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 диоксометил-тетрагидропиримидин + 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.

Методология и методы исследования

Теоретической основой исследования явились данные отечественной и зарубежной научной литературы, посвященные механизмам регенерации, а также механизмам влияния биологических объектов, таких как мезенхимальные стволовые клетки и биополимерные средства на основе хитозана и целлюлозы на механизмы заживления острых кожных ран. Особое внимание уделено этапам разработки и результатам пилотных исследований, посвященных разработке нового перевязочного материала на основе биополимеров и наномолекул диоксида церия.

Методологически была выбрана модель острой кожной раны как прототип небольших операций, выполняемых под местной анестезией в хирургии и косметологии, которые по численности превосходят все другие хирургические вмешательства.

Объектом исследования явились крысы пострепродуктивного возраста, поскольку проблемы ран и хирургических вмешательств наиболее актуальна для людей во второй половине жизни.

Акцент в исследовании сделан на первых этапах регенерации от успешности которых зависит станет ли рана хронической или произойдет исцеление. Это обосновывает выбор сроков наблюдения.

Исследование сфокусировано на изучении влияния мезенхимальных стволовых клеток и полимерного средства на основе хитозана и целлюлозы с интегрированными в состав наночастицами диоксида церия на механизмы заживления острых кожных ран. В качестве сравнения лекарственных средств были выбраны разные по механизмам действия и способам применения формы, большинство из них биологического происхождения, а их эффективность в

отношении лечения ран ранее уже была доказана в ходе клинических и экспериментальных исследований.

При выполнении работы применялись визуальные, инструментальные, гистоморфометрические, статистические и другие методы исследования, которые подробно описаны в главе «Материалы и методы».

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 объективным прогнозом оценки заживления кожных ран.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность и обоснованность результатов научно-квалификационной работы (диссертации), научные положения и сформулированные автором практические рекомендации основаны на изучении большого объема экспериментальных данных (моделировано 224 раны на спине крыс Wistar) с применением разных обоснованных клинико-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 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM, США) с применением стандартных параметрических и непараметрических критериев. 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. Все это позволило сформулировать объективные выводы, которые определены высокой точностью результатов, обосновать научную и практическую значимость работы.

Материалы диссертации доложены на XLVI международной научно-практической конференции «Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования» (г. Москва, 2021), XXXI International scientific conference «European Research».

Основные положения и результаты диссертации были обсуждены 26 ноября 2021 года на объединенной научной конференции кафедр патологии человека ФГАОУ ВО Первый московский государственный медицинский университет имени 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.

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

Личный вклад автора

Роль автора в работе является определяющей и заключается в личном участии на всех этапах ее выполнения: от выбора направления исследования до написания научных статей и докладов. Автор выполнил анализ мировой литературы по теме исследования и самостоятельно подготовил обзор по теме диссертации. Часть экспериментальных исследований на животных выполнялась совместно с сотрудниками ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет Минздрава России по договору гранта ФГБУ Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере. При этом соискатель принимал активное участие на всех этапах исследования, освоил все используемые в работе методы. Компьютерные базы данных и обработка полученных результатов, микрофотографии гистологических препаратов выполнены лично автором. Автор провел статистический анализ полученных результатов с использованием современных методов статистической обработки данных с использованием программы SPSS 23.0. Полученные фактические данные автор обобщил, осуществил формулировку и научное обоснование результатов диссертационного исследования, включая оформление научных данных (текст, таблицы, рисунки, графики), сформулировал выводы и практические рекомендации.

Соответствие диссертации паспорту научных специальностей

Диссертационная работа 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 теме диссертации

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.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 224 страницах, иллюстрирована 65 рисунками и содержит 35 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы «материалы и методы исследования», трех глав собственных результатов исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка условных обозначений и списка использованной литературы, который включает 318 источников, включая 119 ссылок на русскоязычные работы и публикации в российских журналах, а также 198 ссылки на англоязычные работы и зарубежные публикации.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ (актуальность и перспективные направления в разработке средств для заживления ран)

Лечение кожных ран - это комплексная междисциплинарная проблема, требующая адекватного состояния множества физиологических и иммунологических процессов, а также физических, а в случае хронизации и социальных факторов, содружественно отвечающих за успех закрытия раневого дефекта [Алексеева Н.Т., 2015; Архипов Д.В., 2019; Дас М. и Бейкер А., 2016; Дибиров М.Д., 2017- 2019; Моторина ИГ, 2018; Ниязов БС, 2016; Пешиков О.В., 2016; Ступин В.А., 2017- 2019; Хан Дж., 2017; Baron J.M. et al., 2020; Ribeiro D.M.L. et al., 2019].

Заживление ран – эволюционно выработанный жизненно необходимый процесс. Изучение клеточных и молекулярных механизмов, лежащих в основе заживления ран, позволяющих эффективно ускорять процесс регенерации, занимает исследователей и клиницистов много лет, и интерес этот не ослабевает, так как раны являются самым частым состоянием, с которым обращаются к специалистам хирургического профиля. Это относится для всех категорий ран, острых и хронических, микрохирургических и в случае обширной потери тканей с патологическим рубцеванием.

В клинической практике раны принято делить на острые и хронические [Толстых А.Д., 2012; Хан Дж., 2017]. Острая рана - это внезапное повреждение кожи, включая хирургические вмешательства. Хронические раны длительно не заживают (более 6 недель) и могут быть опасны для жизни вследствие присоединения кровотечения, остеомиелита и сепсиса, но всегда десоциализируют пациента (пролежни, хронические венозные язвы, синдром диабетической стопы). Количество острых ран в мире непрерывно увеличивается, что связано с ростом бытовых и военных травм, когда острая рана возникает у соматически здорового человека, а также с 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;

Nerlander M.P. et al., 2019; Rosberg H.E. et al., 2018; Wang Y. et al., 2018; Wild H. et al., 2020]. В частности, по данным Научно-исследовательского института организации здравоохранения и медицинского менеджмента Департамента Здравоохранения г. Москвы количество операций в столице увеличилось с 611940 в 2010 году до 837114 в 2018, причем операции на коже и мягких тканях возросли почти в 2 раза, с 64481 до 119380. Число людей, страдающих от хронических ран, также непрерывно увеличивается, что связано не только с ростом продолжительности жизни, а значит и увеличением коморбидных патологий [Дибиров М.Д. и соавт., 2016, 2019; Ступин В.А., 2017, 2019; Antonopoulos C.N. et al., 2019; Han G. et al., 2019; Stupin V.A. et al., 2017]. Некоторые исследователи утверждают, что в мире насчитывается около 100 млн. человек, страдающих от острых травматических ран и 300 млн. человек с хроническими ранами [Das S, Baker A.B. 2016]. Однако точных эпидемиологических данных по ранам в настоящее время нет, а имеющиеся опубликованные работы по этой теме носят раздробленный характер, касаются лишь отдельной ее проблемы, но свидетельствуют о том, что общее количество ран гораздо больше. Таким образом, вопросы заживления кожных ран различной этиологии и их эффективное лечение, несмотря на богатый арсенал имеющихся и постоянно появляющиеся и внедряющихся в практическое здравоохранение новых фармакологических средств и методов, используемых для лечения ран, продолжают оставаться в числе высоко актуальных [Архинов Д.В. и соавт, 2019; Дас М. и Бейкер А., 2016; Морозов С.Г. и соавт, 2020; Моторина И.Г. и соавт, 2018; Орлов А.Г., 2016; Ступин В.А. и соавт., 2019; Beers E.H., et al., 2019; Ennis W.J. et al., 2016; Haalboom M. et al., 2018; Shukla S.K. et al., 2019; Zielins E.R. et al., 2015]. 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].

Хотя эпидемиологические исследования, посвященные оценке числа хронических ран их эффективности и лечения, в мире немногочисленны, а опубликованные исследования показывают большие различия, попытаемся разобраться и в этом вопросе. По данным систематического обзора и метаанализа обсервационных исследований, проведенных в период 2000-2018 гг. общая распространенность среди взрослых хронических ран смешанной этиологии (всего 3 исследования) составила 2,21 на 1000 населения, а для хронических язв на нижних конечностях (9 исследований) - 1,51 на 1000 взрослого населения [Martinengo L, 2019]. По данным эпидемиологического исследования пациентов с хроническими ранами, проведенного в Германии по анализу данных обязательного медицинского страхования с участием 9 миллионов застрахованных лиц в течение 3 лет, лечение ран было проведено у 0,43% пациентов, причем распространенность и заболеваемость хронических ран увеличились за 3 года в 1,3 раза [Heyer K, 2016]. Исследование, проведенное в одном из городов Великобритании (население 751485 человек, обследовано 1103 человека) показало, что распространенность хронических ран составила 1,47 на 1000 населения (95% ДИ: 1,38–1,56), выше она была среди женщин, чем у мужчин (1,63 и 1,28 на 1000, соответственно) и существенно увеличивалась с возрастом, достигая максимума у людей в возрасте 90 лет и старше (22,88 на 1000); самыми частыми были трофические язвы на ногах и пролежни (0,44 и 0,31 на 1000 населения, соответственно) [Hall J, 2014].

Среди хронических длительно незаживающих ран (син.: трофические язвы) сосудистого происхождения наиболее распространёнными являются язвы венозного происхождения, на их долю выпадает 50-70% [Тараско А.Д. и соавт., 2016; Толстых П.И., 2012; Abbade LP 2005; Martinengo L, 2019; Trent J.T. 2016; van Gent W.B 2010]. Хронические раны, развившиеся вследствие артериальной недостаточности, составляют, по данным ряда авторов, 5-25% от общего числа длительно незаживающих язв, а на долю смешанных артериально-венозных язв выпадает 10-20% [Толстых П.И., 2012; Abbade LP 2005; Bonham P.A., 2003; Hafner J, 2018; Kavros SJ, 2016, Martinengo L, 2019;]. Остальные трофические раны

обусловлены множеством других патологий. Особую проблему составляют прогрессивно увеличивающиеся длительно незаживающие раны при сахарном диабете (синдром диабетической стопы), которые не входили в статистику вышеприведенных исследований. По данным систематического обзора глобальная мировая распространенность синдрома диабетической стопы составляет 6,3% [Zhang P., Lu J., 2017], колеблясь по разным оценкам в пределах 4-8%, то есть не менее 50 млн жителей планеты [Дибиров М.Д., 2019; Зайцева Е.Л., 2016; Силина Е.В., 2018; Ступин В.А., 2017-2019, 2019; Peter-Riesch B, 2016; Ricco JB, 2013; Van Battum P., 2011].

Лечение ран у этих пациентов является мероприятием дорогостоящим. Единых точных данных о затратах в мире нет. Имеется лишь анализ по отдельным видам ран в отдельных популяциях. Так, на лечение хронических ран в США ежегодно тратятся около 20 миллиардов долларов, а в Великобритании - около 184 миллионов фунтов стерлингов [Frykberg R.G., 2015; Schmidtchen A., 2017; Aderibigbe B.A., 2018]. Имеются и другие данные о том, что на лечение только венозных ран нижних конечностей в небольшом по населению городе Англии (г. Лидс) тратится от 300 до 600 миллионов фунтов стерлингов в год [Hall J, 2014]. Десять лет назад американские страховщики опубликовали финансовую сторону ведения больных с синдромом диабетической стопы сообщив о том, что на уход за диабетической стопой ежегодно тратится не менее 18 млрд. долларов США, а 11,7 млрд. долларов расходуются на ампутации нижних конечностей в связи с безуспешностью лечения [Rogers L.C., 2008].

Таким образом, в связи с ростом проблемы кожных ран, лечение которых несет существенные экономические затраты, актуализируется необходимость в разработке доступных эффективных средств и методов лечения ран, способствующих максимально эффективно использовать биологические механизмы, заложенные в регенерации тканей кожи. Очевидно, что актуальным и перспективным является фундаментальное изучение процессов регенерации и механизмов действия стимулирующих заживление ран лекарственных средств, что

совместно с развитием персонализированной медицины будет способствовать наиболее эффективному и безопасному лечению.

Фазы заживления ран

Успех применения тех или иных лекарственных средств, медицинских изделий и повязок зависит и от фазы заживления ран, в которой это средство было применено. Поэтому остановимся на этом вопросе подробнее.

Заживление ран - это закономерный эволюционно выработанный процесс, проходящий несколько последовательных стадий, из которых наиболее важными считают четыре: гемостаз, воспаление, пролиферация клеток и ремоделирование вновь образованного внеклеточного матрикса [Алексеева Н.Т., 2015-2016; Власов А.П., 2017; Елисеев В.И., 2017; Еськова А.Ю., 2018; Кананыхина Е.Ю., 2017; Образцова А.Е., 2021; Cañedo-Dorantes L. 2019; Landén N.X., 2016; Reinke J.M., 2012; Richardson R., 2013; Seifert AW, 2012; Serra M.B. 2017; Sorg H. 2017; Velnar T., 2009]. Первая стадия – гемостаз, развивается быстро, сразу после травмы, и проявляется ограничивающей кровотоков вазоконстрикцией, формированием тромбоцитарного сгустка, останавливающего кровотечение. Продолжительность этой стадии не превышает нескольких часов после травмы. Все причины, вызывающие нарушение заживления ран на этой стадии, не являлись предметом представленного исследования. Вторая стадия процесса заживления ран – воспаление. Ее продолжительность варьирует в пределах 3-7 суток в случае отсутствия бактериальных осложнений, сниженного иммунного статуса пациента или сосудистых нарушений. При этом короткая фаза альтерации при воспалении переходит в фазу экссудации, которая потом сменяется пролиферацией. Стадия пролиферации процесса заживления, характеризующаяся исчезновением активных макрофагов и появлением новых клеточных и неклеточных элементов, продолжается обычно до 3-4 недель после травмы и заканчивается (в норме) полной эпителизацией поверхности раны. Последняя стадия – ремоделирование ран, длится до одного года и относится не столько к заживлению ран, сколько к

формированию и преобразованию рубцовой деформации. Таким образом, одним из ключевых этапов заживления ран является воспаление, обеспечивающее взаимосвязь процессов между стадиями гемостаза и пролиферации процесса заживления ран, то есть время от момента повреждения до восстановления барьерной и других функций кожи [Cañedo-Dorantes L. 2019; Landén N.X., 2016; Serra M.B. 2017; Sorg H., 2017].

Воспаление – эволюционно выработанный процесс защиты организма при повреждении его тканей и органов. Процесс воспаления в ранах необходим вначале для оптимального завершения гемостаза, а потом – для обнаружения и элиминации патогенных микроорганизмов, удаления поврежденных тканей и очистки раны [Атяшкин ДА, 2017; Митряшов К.В., 2016; Ярец Ю.И., 2018; Eming S.A., 2014; Reinke J.M., 2012; Serra M.B., 2017; Wilgus T.A., 2016]. Эти процессы реализуются с участием лейкоцитов, которые мигрируют из кровеносного русла в очаг повреждения с последующим образованием и активацией цитокинов, активных форм кислорода, фагоцитоза [Алексеева Н.Т., 2015; Еськова А.Ю., 2018; Копасов А.Е. 2019; Носенко М.А., 2019; Силина Е.В., 2020; Яглова Н.В., 2012; Dovi J.V. 2004; Eming S.A. 2014; Patel S. 2019; Schafer M., 2008; Vestweber D. 2015; Wilgus T.A., 2016]. При очищении раны, удалении бактерий нейтрофилами, активными формами кислорода и протеазами, которые высвобождаются фагоцитарными клетками, в ране формируется подходящая для процесса заживления среда. Как элементы врожденного иммунитета именно лейкоциты обеспечивают эффективность первой линии защиты, выполняя функции пока еще не образовавшихся эпидермиса и дермы. Кроме того, именно лейкоциты (главным образом, макрофаги) выполняют своевременную и адекватную подготовку тканей раны к пролиферации [Башкина О.А., 2019; Носенко М.А., 2019; Образцова А.Е., 2021; Шановалова Е.Ю., 2017; Ярец Ю.И., 2017; Hesketh M 2017; Kim SY 2019; Koh TJ 2011; Lucas T 2010; Strbo N 2014]. Известно, что при оптимальном процессе заживления ран и отсутствии их инфицирования, нейтрофилы, преобладающие в ране в течение первых 2-5 суток и наиболее активно в нее мигрирующие по

градиенту хемокинов в первые 3 суток, после завершения фагоцитоза элиминируются из раны вместе с некротическими тканями, осуществляя ее очищение. Таким образом, в нормальных условиях гемостаз и острая воспалительная фаза вместе продолжаются 3-5 дней, но не более 7 дней при обширных поражениях [Konasov A.E., Morozov S.G., 2019; Сунильников А.А., 2018; Cañedo-Dorantes L. 2019; Lucas T. 2010; Wang P. 2018]. На смену активной нейтрофильной инфильтрации раны в среднем на 3-5 сутки после травмы в рану рекрутируют моноциты (мононуклеары), которые дифференцируются в макрофаги - важный участник перехода фазы активного воспаления в пролиферативную фазу процесса заживления [Dovi JV 2004; Kim SY 2019; Koh TJ 2011; Ridiandries A 2018; Rodrigues M 2019; Strbo N 2014].

В процессе пролиферативной фазы происходит закрытие раневого дефекта с образованием грануляционной ткани в месте повреждения, соединительной ткани, новых кровеносных сосудов [Абземелева Р.А., 2016; Ярец Ю.И., 2017; Шестакова В.Г., 2016; Babaei S., 2013; Su W.H., 2010]. Первоначально сформированный сгусток фибрина и мертвых тканей заменяет внеклеточный матрикс, включающий протеогликаны, эластин, гиалуроновую кислоту и коллаген, которые и образуют собственно грануляционную ткань. Нарастание микрокапиллярной сети обеспечивает питание новых тканей и создание среды для нормальной жизнедеятельности клеток, восстанавливающих функции поврежденного органа [Давыдав Б.А., 2016; Шестакова В.Г., 2016; Bi H., 2019; Miscianinov V., 2018; Velnar T., 2018]. Неоангиогенез регулирует переход от воспаления к формированию внеклеточного каркаса заживающей раны, то есть он ответственен за функционирование фибробластов, число которых существенно увеличивается в ране в фазе пролиферации [Блинова М.И., 2017; Хилова Ю.К., 2018; Шурыгина И.А., 2012; Bi H., 2019; Lynch M.D., 2018; Miscianinov V., 2018; Velnar T., 2018]. Присутствие в ране фибробластов, их размножение и созревание до стадии зрелой клетки, которая обладает богатым цитоплазматическим аппаратом, необходимо для синтеза межклеточных белков, включая коллаген I типа [Силина Е.В., 2017;

Ступин В.А., 2019; Bainbridge P. 2013; Stupin V.A., 2018; Sun M., 2018, Stunova A. 2018; Thulabandu V. 2018]. В свою очередь, популяция дермальных фибробластов участвует в регуляции пролиферации клеток, в том числе эндотелиальных клеток, через прямое межклеточное взаимодействие или аутокринное и паракринное взаимодействие [*Морозов С.Г., Конасов А.Е., 2020; Шурыгина И.А., 2012; Velnar T 2018, Stunova A 2018*]. Фаза пролиферации обычно длится от нескольких дней до недель в зависимости от исходного объема повреждения и общего состояния пациента, включая его коморбидный статус. Однако если в сроки до 6 недель рана не эпителизируется, то такая рана является предтечей хронизации процесса регенерации, что значительно ухудшает прогноз.

Завершающим этапом процесса заживления ран является фаза ремоделирования. Коллаген реконструируется путем сшивания, что обеспечивает сокращение толщины рубца при полном закрытии раны. Кроме того, на этой фазе происходит апоптоз и элиминация клеток, которые участвовали в заживлении раны, исчерпали свои возможности или более не используются. Если процесс заживления раны не смог адекватно прогрессировать до этой стадии, рана становится хронической, может длиться годами [*Кананыхина Е.Ю., 2016; Мантурова Н.Е., 2018; Образцова А.Е., 2021; Ступин В.А., 2018-2019; Шаповалова Е.Ю., 2017; Alven S., 2020; Diegelmann R.F., 2004; Hart J. 2002; Plikus M.V., 2017*].

Таким образом, ключевым этапом в заживлении ран является адекватность воспаления по его интенсивности и длительности, а также своевременный переход экссудативной его фазы в пролиферативную. Если процесс острого воспаления неадекватен по силе и затягивается (продолжается 7 и более суток), то такое воспаление считается патогенным и сопряжено с нарушением взаимодействий между разными типами клеток (в т.ч. фибробластами, кератиноцитами, обеспечивающими образование новых слоев кожи) [*Костяков Д.В., 2017; Ярец Ю.И., 2018; Cañedo-Dorantes L, 2019; Landén NX 2016; Mustoe T.A., 2006*]. Это может привести к нарушению заживления ран с их бактериальной колонизацией, повторяющимися эпизодами ишемическо-реперфузионного повреждения,

развитием клеточной и системной дистресс-реакции, потенцирующих хронизацию раневого процесса [Блинова М.И., 2017; Миханов В.А., 2019; Ступин В.А., 2018-2019; Hesketh M., 2017; Mustoe T.A., 2006; Zhao R., 2016]. Неадекватно выраженное гипервоспаление приводит к формированию избыточного и патологического рубца по окончании фазы ремоделирования раны [Кананыхина Е.Ю., 2017; Образцова А.Е., 2021; Hart J. 2002; Karppinen S.M. 2019; Ogawa R., 2017; Xue M., 2015]. Это сопряжено с функциональными, косметическими, психологическими, а также экономическими последствиями. Ежегодный рынок наружных препаратов для коррекции течения хронических ран превышает 25 миллиардов долларов, а рубцовой деформации - 12 миллиардов долларов [Sen C.K., 2009].

В то же время известно, что результат заживления ран на коже отличается у разных биологических видов. Например, некоторые позвоночные, в том числе рыбы (данио) и земноводные (аксолотли и ксенопусы), обладают способностью идеально восстанавливать кожу; после моделирования ран на всю толщину кожи у лягушек *Xenopus* и аксолотлей наблюдается полное восстановление всех слоев кожи, включая ее секреторные придатки [Seifert A. 2012; Yokoyama H. 2011]. Во время этого процесса может быть полностью восстановлен даже паттерн пигментации кожи [Seifert A. 2012]. Кожа рыб данио может восстанавливать свой полосатый рисунок пигментации после ранения, а также регенерировать подкожные адипоциты и чешуйки в процессе заживления, что делает регенерированную кожу неотличимой от исходной [Richardson R. 2013]. У взрослых млекопитающих, включая человека, такой эффективной регенерации нет. При повреждении дермы в результате операций, травм, ожогов, даже быстрое и успешное заживление ран у взрослых млекопитающих приводит к образованию рубцовой ткани, не имеющей кожных придатков, которые являются неотъемлемой частью биологической и физиологической функции кожи. Интересно, что зарегистрированы случаи эффективного заживления ран у плода млекопитающих, которым внутриутробно были нанесены обширные раны, а у взрослого

экспериментального животного заживление этих ран происходило без рубцовой деформации на коже и регенерации придатков кожи, то есть признаков этих ран не обнаруживалось [Takeo M, Lee 2015]. Модели, использованные в исследованиях, посвященных механизмам безрубцового заживления ран [Шевелева О.Н., 2016; Шмакова Т.В., 2019; Takeo M, 2015] предложили новую платформу для исследования клеточных и молекулярных механизмов, лежащих в основе заживления ран и регенерации кожи у млекопитающих, включая человека.

Лечение ран

За последние десятилетия было создано множество продуктов для лечения ран, влияющих на различные механизмы и процессы заживления, которые могут быть нарушены вследствие разных местных и системных факторов. Поскольку пока не разработано универсального регенерирующего средства, целесообразным остается персонализированный подход к выбору средства и метода лечения ран в соответствии с факторами, препятствующими или способствующими их заживлению. Однако опубликованные обзоры разными учеными разных стран свидетельствуют о нерешенности данной проблемы [Валиев Т.М., 2019; Кошелева Н.В., 2019; Ниязов Б.С., 2016; Нурмаков Д.А., 2016; Третьяков А.А., 2016; 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].

В настоящее время имеется множество фармакологических средств, способных влиять на экссудативное воспаление и пролиферативную фазу заживления ран. Классическим примером успешно применяющихся противовоспалительных лекарственных средств являются препараты для лечения ревматических заболеваний, коллагенозов и т.п. Существуют также препараты для лечения ран, способные влиять на воспаление и тормозить его переход в фазу пролиферации прямо или опосредованно. В связи с этим важно объективизировать пользу и вред применения разных лекарственных средств, способных и не

способных изменять воспалительный ответ и ускорять переход экссудации к пролиферации.

Самым распространенным является применение перевязочного материала для лечения ран, который изготавливают в различных формах, таких как гидрогели, пленки, нановолокна, пены, составы для местного применения, пластыри, повязки [Афигенов Г.Е., 2016; Бордаков В.Н., 2014; Быстров С.А., 2017; Григорьян А.Ю., 2019; Еськова А.Ю., 2018; Каторкин С.Е., 2019; Морозов А.М., 2020; Пешиков О.В., 2016]. Среди них общепринятыми для использования сегодня являются гидрогелевые повязки. Zhang L. et al. (2019) провели систематический обзор и метаанализ с оценкой клинической эффективности и безопасности медицинских гидрогелевых повязок, используемых при лечении кожных ран на основе данных PubMed / Medline (1980–2019), Кокрановской библиотеки (1980–2019) и других научных баз, включающих публикации по этому вопросу за последние 40 лет [Zhang L. et al., 2019]. Авторами было найдено 43 исследования, анализ которых установил эффективность гидрогелевых повязок (по сравнению с негидрогелевыми), что выражалось в ускорении заживления ожоговых ран II степени (поверхностных и глубоких), язв диабетической стопы, травматических повреждений кожи, радиоактивных повреждений кожи, укусов собак и язв на поверхности тела, а также показано положительное их влияние на купирование болевого синдрома. В то же время не было получено значительных различий между гидрогелевыми и негидрогелевыми повязками по времени и характеру заживления хирургических ран, пролежней и венозных трофических язв [Zhang L. et al., 2019].

Успехи хирургического лечения ран ограничены, как правило, множеством соматических факторов. В систематическом обзоре и метаанализе 11 исследований хирургического лечения ран в сравнении с консервативной терапией сделан вывод о том, что хирургическое вмешательство может улучшить заживление венозных язв, однако качество имеющихся доказательств является недостаточным по причине низкого уровня выполненных исследований [Mauck K.F. et al., 2014].

Кохрейновский обзор, выполненный Norman G. et al. (2016) с целью оценить эффективность системных и местных антибиотиков, а также местных антисептиков при лечении хирургических ран вторичным натяжением (включено 11 исследований, в которых приняли участие 886 человек), показал отсутствие убедительных доказательств относительной эффективности каких-либо антисептических, антибиотических и/или антибактериальных препаратов, используемых для заживления хирургических ран вторичным натяжением [Norman G. et al., 2016]. Доказательства возможных эффектов классифицированы как доказательства среднего или низкого качества, так как основывались они на отдельных исследованиях с небольшим числом участников, что означает необходимость проведения дальнейших исследований [Norman G. et al., 2016].

Эти же авторы, Norman G. et al. (2018), провели метаанализ и систематический обзор 78 рандомизированных клинических исследований (7014 участников) для оценки эффективности повязок и местных средств, применяемых для заживления венозных язв нижних конечностей на разных этапах оказания медицинской помощи. В итоге авторы пришли к заключению о необходимости дальнейших исследований в связи низкой достоверностью выполненных в работах сравнений. Ранжировать методы лечения в порядке их эффективности и качества доказательств авторам не удалось [Norman G, 2018].

Webster J. et al. (2019) провели систематический обзор 25 исследований (2957 участников) для оценки влияния терапии ран отрицательным давлением на предотвращение инфицирования области хирургического вмешательства при заживлении ран путем первичного закрытия. Авторы тоже получили доказательства низкой достоверности и сделали вывод об отсутствии значимого влияния терапии ран отрицательным давлением по сравнению со стандартным лечением ран на частоту таких важных исходов, как смертность, расхождение краев ран, серома, при этом стоимость такого лечения существенно увеличивалась [Webster J. u Liu, 2019].

Westby M.J. et al. (2017) провели мета-анализ 39 исследований, оценивающих 21 тип лекарственных повязок и местные средства для лечения пролежней, и пришли к заключению о немногочисленности таких исследований, проводимых на должном уровне, а имеющиеся доказательства имеют низкую или очень низкую достоверность, что преимущественно связано с высоким риском систематической ошибки [Westby M.J. et al., 2017].

Таким образом, несмотря на широкий арсенал средств и методов, используемых для лечения ран, проблема их заживления до сих не решена. Многие из используемых в настоящее время консервативных средств и перевязочных материалов имеют ряд ограничений, таких как недостаточное противомикробное действие, слабые механические характеристики, плохой газообмен между раной и окружающей средой, трудности при удалении, индукция аллергических реакций, низкая абсорбция раневого экссудата и их неспособность поддерживать влажную среду для ускоренного заживления ран [Alven S., 2020; Dhivya S., 2015; Mehrabani G.M., 2018] и многое другое. В данной связи чрезвычайно перспективным является разработка совершенных и экономичных средств для лечения ран, основанных на патогенетически обоснованных механизмах регенерации.

Мезенхимальные стволовые клетки для лечения ран.

Интерес к практическому использованию в медицине и ветеринарии стволовых клеток продолжает оставаться очень высоким, так как сама биологическая идея подкупает своей логичностью. Количество работ на тему мезенхимальных стволовых клеток (МСК) по данным PubMed/Medline продолжает увеличиваться, число таких публикаций превышает 7000 в год в течение последних 3 лет. За последние 5 лет было опубликовано 240 систематических обзоров, 96 мета-анализов (только в 2019 году – 64 систематических обзора, 26 мета-анализов), посвященных МСК. Однако, как это часто бывает, вопросов меньше не становится. Выводы авторов, выполняющих анализы доклинических работ, кажутся обнадеживающими. Так, L. Liu et al. (2019) в мета-анализ доклинических

исследований, посвященных применению МСК для лечения ревматоидного артрита, включили 48 исследований и 94 группы лечения, заключив, что МСК улучшили результаты [Liu L., 2019]. A.R. Ahmadi et al. (2019) в систематический обзор на тему применения МСК для заживления ожоговых ран, включили 15 экспериментальных и 2 клинических исследования, сделав вывод о положительном влиянии МСК при ожогах [Ahmadi A.R. et al., 2019]. S.A. Muhammad et al. (2020) для выполнения систематического обзора и метаанализа отобрали 23 исследования на животных и подтвердили терапевтическую эффективность МСК при легочной артериальной гипертензии [Muhammad et al., 2020]. Однако выводы клинических систематических обзоров и мета-анализов не являются очень обнадеживающими. Так, S. Novello et al. (2020), изучавшие эффективность применения МСК при регенерации тканей пародонта, заключили, что терапия МСК может оказать небольшое влияние на регенерацию пародонта. Однако из-за низкого качества проведенных исследований (всего 15 исследований) и малого числа слепых рандомизированных контролируемых исследования (РКИ) (всего 2 небольших моноцентровых РКИ), эти результаты не могут быть окончательными [Novello S. et al., 2020]. L. Bernardi et al. (2019) изучали опубликованные в период 2008-2018 гг. статьи, посвященные применению МСК при болезни Крона. Из 13 отобранных исследований авторы выявили только одну работу достаточного качества, при этом в остальных работах количество и методика введения МСК были переменными, что является недостаточным для формулирования выводов [Bernardi L. et al., 2019]. S.F. Abdul Wahid et al. (2019) в Cochrane Database опубликовали обзор, в котором сделали вывод об отсутствии убедительных доказательств для практического использования клеточной терапии для лечения бокового амиотрофического склероза [Abdul Wahid S.F., 2019]. J. Aziz et al. (2019) выполняли систематический обзор контролируемых клинических исследований с использованием пуповинной крови для регенеративной терапии, включая лечение церебрального паралича - 4 исследования, диабета 1 типа - 3 исследования, и 9 других заболеваний. Однако доказать новые показания для применения МСК авторам не удалось из-за разных

протоколов, методов и подходов к лечению с использованием МСК [Aziz J. et al., 2019].

Таким образом, красота культуральных исследований пока не послужила основой для прорыва в практической медицине. Возможно, это вызвано не только сложностью самих механизмов регулирования жизни клетки, но и трудностями в моделировании соматических заболеваний. Практически все работы, выполненные на животных, не используют этиопатогенетические модели заболеваний человека. Генно-модифицированные животные в счет не идут, так как сама основа заболевания достоверно связана непосредственно с нарушениями в геноме, а не с филогенезом. Пожалуй, единственной точной биологической моделью для исследований является модель острой раны – ситуации, с которой в процессе жизни сталкиваются все живые существа и над решением которой эволюция трудится более 800 миллионов лет.

Несмотря на множество проведенных исследований на животных, в которых применяли МСК для заживления кожных ран [Паюшина О.В., 2018; Петров Ю.П., 2018; Silina E. et al., 2020; Jackson W.M. et al., 2012; Kanji S. et al, 2014; Kanji S. et al 2017; Kurita M, 2018; Nie C. et al, 2011], систематических обзоров или мета-анализов, доказавших однозначно высокую качественную эффективность применения МСК, в настоящее время нет, что связано с рядом обстоятельств. Помимо невозможности точного отбора пациентов с унифицированным патогенезом ран, проблемой является стандартизация клеточных культур, а также отсутствие общепринятой методики введения МСК, даже на этапах доклинических исследований на животных. Кроме того, несмотря на то, что проблема заживления ран наиболее характерна для пожилых и старых, в выше приведенных работах в основном раны были моделированы на молодых мышах, которым локально вводили стволовые клетки, при этом внимание исследователей было сосредоточено на описании результатов конкретного случая.

Известно, что процессы регенерации во второй половине жизни начинают ослабевать [Абрамян Ш.М., Морозов С.Г., 2017; Мантурова Н.Е. и соавт., 2018;

Силина Е.В. и соавт., 2020; Gibon E. et al, 2016, Oh J. et al, 2014; Josephson A.M. et al, 2019; Manturona N.E. et al, 2018]. Это касается как костной системы, так и мягких тканей. Воспалительные и микрососудистые изменения в старых тканях приводят к нарушению заживления ран. Именно поэтому в эксперименте целесообразно использовать животных зрелого возраста во второй половине их жизни.

Вместе с тем, стволовые клетки предполагают многообещающий подход в геронтологии за счет опосредованного через цитокины и факторы роста противовоспалительного эффекта и стимуляцию неоангиогенеза, что особенно важно именно на первом (воспалительном) этапе заживления ран [*Duscher D. et al, 2016; Kanji S. et al, 2014; Matthay M.A. et al, 2017; Nie C. et al, 2011*].

Полимерные изделия для лечения ран.

После исторически длительного перерыва, все чаще перевязочные средства создаются из природных и синтетических полимеров. Биополимеры получают из природных источников: растительных, животных и даже микробных [*Дас С. 2017; Sell S. et al, 2010; Tabata Y. et al, 2009*]. Синтетические полимеры производятся технологически выгодным химическим (в т.ч. фармакологическим) путем.

Для изготовления перевязочных материалов на основе биополимеров наиболее часто используют хитозан, целлюлозу, гиалуроновую кислоту, альгинат, эластин, декстран, фибрин, пектин, коллаген и др. [*Аль З., 2016; Байкулов АК, 2016; Бежин А.И., 2019; Габитов В.Х., 2019; Игнатьева Ю.А., 2015; Кокорина О.В., 2016; Олтаржевская Н.Д., 2019; Alven S. et al, 2020; Hussain Z. et al, 2017*], среди которых наиболее часто применяющимся полимером является хитозан и, особенно, целлюлоза. Целлюлоза - основной структурный компонент клеточных стенок растений, являясь линейным органическим полимером, целлюлоза и ее производные обладают хорошей биосовместимостью [*Sannino A., 2009*]. Резорбции целлюлозы в клетках не происходит в связи с неспособностью животными клетками производить ферменты целлюлозы [*Helenius G., 2006*]. Эффективность целлюлозы для заживления ран является результатом ее способности ускорять

процесс заживления за счет высвобождения и поддержания в месте раны некоторых факторов роста (фактор роста фибробластов, фактор роста эпидермиса и др.), которые способствуют миграции и разрастанию дермальных фибробластов и подавляют размножение бактерий в ране [Dac C., 2017, Alven S., 2020; Cullen M.B., 2010]. Хитозан выделяют из хитина - ключевой компонент экзоскелета ракообразных. Этот биополимер и его производные хорошо известны своей гетерогенной функциональностью, нетоксичностью, инертностью, неантигенностью, биоадгезивностью, биосовместимостью, биоразлагаемостью, гемостатическими и антимикробными свойствами [Dai T. 2011; Huang S., 2010; Pérez R. 2013]. Кроме того, хитозан очень универсален и обладает способностью образовывать множество функционализированных производных путем химической модификации гидроксильных и аминогрупп.

К настоящему времени накоплен достаточно большой банк научных разработок, демонстрирующих перспективность использования гидрогелей полимеров на основе хитозана и целлюлозы для лечения ран. Рассмотрим новые, разработанные в 2019–2020 гг., из хитозана и целлюлозы гидрогелевые полимеры для лечения ран.

Так, опубликованы результаты исследований, демонстрирующих эффективность применения гидрогелей на основе целлюлозы для лечения ран [Erdagi S.I. 2020; Fan X. 2019; Gupta A., 2020; Hettegger H., Joorabloo A..2019; Koivuniemi R., 2020, Li X.X., 2020; Sadeghi S. 2020; Sulaeva I. 2020; Yang H., 2019].

X.Fan и соавт. (2019) разработали pH-чувствительные гидрогели на основе целлюлозы. Исследования *in vitro* установили резорбцию изделия в слабокислой среде и высвобождение в этих условиях интегрированного в полимер лекарства. Исследование *in vivo* показало повышение частоты и ускорение закрытия эпителием экспериментальных ран [Fan X., 2019].

H.Yang и соавт. (2019) создали биосовместимые и стабильные гидрогелевые композиты на основе диальдегидкарбоксилметилцеллюлозы, поперечно сшитой коллагеном, что обеспечивало эластические характеристики изделия, а множество

ковалентных связей улучшили вязкоупругие свойства, устойчивость к ферментативному разложению и термической стабильности этого гидрогеля [Yang H., 2019].

S.Sadeghi и соавт. (2020) разработали гидрогели карбоксиметилцеллюлозы и кератина человеческих волос и исследовали возможность контролируемого высвобождения клиндамицина при лечении экспериментальных ран [Sadeghi S., 2020]. Установлено, что высвобождения лекарственного средства *in vitro* в физиологических условиях в течение первых 4-х часов было резкое с последующим медленным профилем высвобождения клиндамицина. Общее количество высвобожденного клиндамицина после 7 дней инкубации в фосфатно-солевом буферном растворе составило $91,5 \pm 3,1\%$, при добавлении кератина оно было уменьшено, что может быть связано с гидрофильностью при увеличении кератина и снижении водопоглощения. Ученые предположили, что поглощение воды системой доставки лекарственного средства влияет на кинетику высвобождения гидрофильного клиндамицина. Антимикробная активность этого гидрогеля *in vitro* против *S. aureus* составила 99,66% [Sadeghi S., 2020].

R.Koivuniemi и соавт. (2020) опубликовали результаты пилотного исследования применения биополимерных средств для лечения ран при участии 24 пациентов, которым требовалась пересадка кожи. Выполнено сравнение эффективности нанофибриллярной целлюлозы (FibDex® от UPM-Kymmene Corporation) с сополимерной повязкой на основе полилактида. Результаты исследования продемонстрировали благотворное влияние повязки с нанофибриллярной целлюлозой на улучшение эластичности кожи, уменьшение боли, донорская кожа не потребовалась [Koivuniemi R., 2020].

В последние годы все больше ученых публикуют результаты исследований, демонстрирующих эффективность применения новых разработанных гидрогелей на основе хитозана для лечения ран со значимым улучшением результатов регенерации [Аль З., 2016; Байкулов АК, 2016; Бежсин А.И., 2019; Габитов В.Х., 2019; Кокорина О.В., 2016; Bagher Z., 2020; Ehterami A., 2019; Qi W. 2020; Kalantari

K., 2020; Khorasani T.M. 2019; Masood N., 2019; Rasool A., 2019; Xue H. 2019; Zhang C., Yang X., 2020].

Так, A.Rasool и соавт. (2019) разработали термически стабильные (по сравнению со свободными полимерами) гидрогели на основе хитозана, которые были биоразлагаемы и чувствительны к pH, максимальная степень набухания достигалась при росте pH, а при нейтральном pH набухание уменьшалось [Rasool A., 2019]. Антимикробную активность образцов гидрогелей авторы исследовали методом дисковой диффузии, гидрогели на основе хитозана обладали антибактериальной эффективностью в отношении грамотрицательных бактерий *E.coli*. Молекулы хитозана имеют положительно заряженные группы NH_3^+ , а внешнее покрытие *E.coli* состоит из липополисахаридов, которые влияют на значительный отрицательный заряд бактериальной поверхности. Кроме того, хитозан связывается с бактериальной ДНК, тем самым ингибируя транскрипцию и трансляцию. Результаты исследований *in vitro* нового гидрогелевого средства, содержащего антибиотика и сульфадиазин серебра, показали, что гидрогели на основе хитозана являются потенциально перспективными каркасами для лечения ожоговых ран [Rasool A., 2019].

M.Hamdi и соавт. (2020) тоже показали pH-зависимый механизм действия полимерных гидрогелей, разработанных на основе хитозана голубого краба, обогащенного каротиноидами. Высвобождение каротиноидов увеличивалось при pH 7,4 по сравнению с pH 4,0, что коррелировало с ускорением заживления и полной эпителизацией острых ран у крыс [Hamdi M. et al., 2020].

H.Xue и соавт. (2019) опубликовали экспериментальные результаты применения разработанных ими гидрогелей хитозан-матригель-полиакриламид, имеющих пористую морфологию с размером пор от 10 до 30 мкм, что может поддерживать влажную среду в ране, полезную для миграции, адгезии и жизнеспособности клеток [Xue H. et al., 2019]. Эти гидрогели показали хорошие механические свойства: хорошее сжатие, прочность на разрыв (118,3 кПа) и упругость. Сила адгезии гидрогелей к коже свиньи составила 1,3 кПа, что

указывает на то, что их можно легко удалить с поверхности раны, не вызывая дальнейших травм раневой поверхности. Способность гидрогелей к набуханию достигла состояния равновесия примерно 1200% через два дня. Антибактериальная активность гидрогелей показала значительно лучшее ингибирование роста против штаммов *S.aureus*, *E.coli* и *S.epidermidis* по сравнению с использованием канамицина. Гидрогели значительно снижали объем кровопотери при кровотечении из печени мыши. Способность гидрогелей к заживлению ран *in vivo* показала хорошее сокращение раны на 5-й день по сравнению с тремя контрольными группами [Xue H. *et al.*, 2019].

W.Qi и соавт. (2020) разработали хитозан-гепариновый гидрогель, который показал эффективность заживления ран эндометрия на модели мышей. Результаты Вестерн-блоттинга, окрашивания гематоксилин-эозином и трихромом по Массону, иммунофлуоресцентного, иммуногистохимического окрашивания продемонстрировали, что эндогенные c-kit-положительные стволовые клетки были фиксированы в ране и стимулировали процесс ее заживления. Профиль высвобождения лекарства *in vitro* DF-1 α из гидрогеля составлял 5% в 1-й час и увеличивался до 18 и 53% через 24 и 102 часа соответственно, что указывает на механизм медленного и контролируемого высвобождения [Qi W. *et al.*, 2020].

C.Zhang и соавт. (2020) исследовали *in vitro* композитные гидрогели карбоксиметилхитозана с оценкой развития фибробластов кожи человека NS-FB и клеток гипертрофических рубцовых фибробластов человека (HS-FB). Самый высокий коэффициент набухания гидрогеля составил 581% при хорошей способности удерживать воду. Скорость гемолиза гидрогеля составила 0,81–2,67%, что свидетельствует о хорошей совместимости с кровью. Выживаемость клеток NS-FB, культивируемых с использованием экстракта гидрогеля, превышала 93%, что свидетельствует о хорошей цитосовместимости и их способности индуцировать пролиферацию клеток [Zhang C., Yang X., 2020]. Кроме того, гидрогели на основе хитозана продемонстрировали модулирующую катионность хитозана, что способствовало усилению пролиферации и дифференцировки

фибробластов кожи человека с образованием внеклеточного матрикса в ране, а также способностью подавлять развитие гипертрофических рубцов в процессе заживления ран [Zhang N., Gao T., 2020].

Опубликованы также результаты исследований новых гидрогелевых полимеров на основе альгината и хитозана, продемонстрировавших улучшение заживления острых ран у крыс. Эти изделия характеризовались пористостью на уровне 89-91% с взаимосвязанными порами, способностью к набуханию и биоразложению (потеря 80% массы через 2 недели) [Bagher Z. 2020, Ehterami A 2019].

Особенно интересным и перспективным представляется комбинация хитозановых гидрогелей с оксидами металлов, особенно с их наночастицами. Наиболее часто авторы используют наночастицы серебра, реже – церия.

Т.М. Khorasani и соавт. (2019) использовали метод замораживания-оттаивания и разработали состав гидрогелей хитозан + поливинил (спирт) + оксид цинка. Гидрогели были пористыми (размер пор $13,7 \pm 5,9$ мкм), водопоглощение варьировало от 680% до 850%. Механические свойства хитозановых гидрогелей показали снижение модуля упругости и прочности на разрыв с увеличением удлинения в точке разрыва. Исследование антибактериальной эффективности показало самую высокую зону ингибирования у *S.aureus* по сравнению со штаммом *E.coli*. Эксперименты по заживлению ран *in vitro* приготовленных гидрогелей не показали токсичности, при этом регистрировали ускорение заживления ран [Khorasani T.M., 2019].

N. Masood и соавт. (2019) разработали гидрогель хитозан-полиэтиленгликоль (ПЭГ) с наночастицами серебра (средний размер частиц $99,1 \pm 2,3$ нм), который характеризовался высокой пористостью (72,2%) с хорошим уровнем проникновения кислорода и абсорбции экссудата, а экспериментально показано ускорение заживления ран у кроликов на модели сахарного диабета: через 4 дня в экспериментальной группе раны сократились в среднем на 47,7%, в то время как в контроле результат был скромнее, в среднем 12,6% [Masood N., 2019]. Механизм

высвобождения наночастиц из гидрогелей на основе хитозана *in vitro* был медленным и поддерживался при 37°C. Оценка антимикробной активности показала существенный антимикробный эффект по сравнению с простыми гидрогелями.

А.И. Бежин и соавт. (2019) также в эксперименте на 50 крысах показали эффективность и безопасность приименения хитозан-коллагенового комплекса с нано-частицами серебра и химотрипсином в лечении гнойно-некротических экспериментальных ран. К 21 суткам площадь ран сократилась на 98,8% [Бежин А.И., 2019; Григорьян А.Ю., 2019].

Н. Kaygusuz и соавт. (2017) показали, что альгинатные пленки, сшитые ионами церия и хитозаном, обладают антибактериальной активностью против грамотрицательных (*Escherichia coli*) и грамположительных (*Staphylococcus aureus*) бактерий, при этом установлена высокая устойчивость к упругой деформации пленок альгинат-хитозан-церия, их гибкость, что позволило ученым предположить перспективность их применения в клинической практике в качестве антибактериального перевязочного материала [Kaygusuz H., 2017].

К. Kalantari и соавт. (2020) создали гидрогель, содержащий поливиниловый спирт, хитозан и наночастицы диоксида церия (CeO_2). Исследования показали, что этот гидрогель повышает эффективность заживления ран, при этом он нетоксичен для фибробластов кожи человека [Kalantari K., 2020].

А. Joorabloo и соавт. (2019) разработали гидрогели на основе карбоксиметилцеллюлозы, нагруженные гепаринизированными наночастицами оксида цинка (16-36 нм) с помощью метода замораживания-оттаивания для применения в качестве перевязочных материалов и лечения ран [Joorabloo A., 2019]. Профиль высвобождения лекарственного средства *in vitro* в физиологических условиях представлял собой вначале взрывное высвобождение гепаринизированных наночастиц из гидрогеля, потом, наоборот, высвобождение лекарственного средства было невысоким, но длительным. В работе ученых также показано влияние наночастиц на повышение механической прочности

гидрогелей. Установлена нетоксичность изделия и хорошая способность к заживлению моделированной раны уже через 24 часа. Антибактериальная активность гидрогелей с использованием метода дисковой диффузии продемонстрировала значительную бактерицидную эффективность в отношении *S. aureus* и *E. coli* [Joorabloo A., 2019].

A. Gupta и соавт. (2020) интегрировали наночастицы серебра в гидрогель бактериальной целлюлозы и показали стабильный уровень сохранения влажной среды на фоне высокой цитосовместимости изделия, что обеспечило противомикробный эффект в отношении *Candida auris*, *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* при лечении экспериментальных ран [Gupta A., 2020].

X. Li и соавт. (2020) разработали биополимер на основе карбоксиметилцеллюлозы, каррагинана, оксида графена, обогащенный наночастицами серебра. Гидрогель показал хорошую антибактериальную активность, биосовместимость и ускоренное заживление раны с активацией фибробластов и ускорением эпителизации ран на модели экспериментальных животных [Li X.X., 2020].

Таким образом, разработка и исследования эффективности применения биополимерных гидрогелей на основе целлюлозы и хитозана является актуальным и перспективным направлением. Гидрогели, сшитые синтетическими полимерами, показали интересные механические свойства (эластичность, гибкость), которые оказались полезны при лечении ран. Такие раневые повязки обладали антибактериальной эффективностью, особенно те, которые содержат антибиотики или наночастицы. Использование гидрогелей на основе биополимеров для лечения ран позволило ускорить реэпителизацию, развитие грануляционной ткани. Сочетание нанотехнологий с медициной возможно открывает большие перспективы для доступных раневых повязок. Включение наночастиц металлов и антибактериальных агентов в хитозановую и/или целлюлозную матрицу по мнению большинства ученых способствовало устойчивой антимикробной

активности, не влияя на нормальную жизнеспособность клеток. Механизм действия наночастиц на основе металлов зависел от pH и заключается в образовании свободных радикалов. Хотя гидрогели на основе биополимеров демонстрируют интересные особенности в серии исследований *in vitro* и *in vivo*, посвященных лечению ран, очень немногие из них достигли клинических испытаний. Следовательно, существует растущая потребность в разработке усовершенствованных перевязочных материалов с улучшенными свойствами, и они должны пройти доклинические испытания для обеспечения безопасности.

Одной из задач нашей работы было изучение эффективности гидрогелевого комплексного биополимера, содержащего не только целлюлозу и хитозан, но и наночастицы диоксида церия. При разработке лекарственного средства для заживления ран выбор пал на нанокристаллический CeO_2 , потому что результаты предыдущих исследований показали, что он обладает низкой токсичностью и высокой биосовместимостью, а также способностью в зависимости от меняющегося pH раны обеспечивать перенос электронов путем перехода с Ce^{3+} на Ce^{4+} валентности и обратно [Baldim V. 2018; Johnston-Peck A.C., 2018; Reed K. 2019; Römer I. 2019]. Это делает CeO_2 перспективным для применения в наномедицине [Das S. 2013; Estevez A.Y. 2019; Heckman K.L., 2013; Golyshkin D., 2016; Naz S., 2017; Tapeinos C., 2018]. В частности, это позволяет стабилизировать раневую среду, нейтрализуя активные формы кислорода и иные свободные радикалы, оказывая антиоксидантное, антибактериальное и противовоспалительное действие [Correia A.T., 2019; Lukin A.V., 2019; Reed K., 2014]. Эффект переноса электронов может многократно повторяться по мере проникновения раневого отделяемого через полисахаридную гидрогелевую структуру непосредственно к наночастицам CeO_2 или смены раневой флоры. Теоретически все это должно создавать условия для скорейшего и максимально эффективного заживления ран.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Представленный материал 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 Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации и общество с ограниченной ответственностью "ИНТЭКОС", что позволило реализовать ослепленное исследование и повысить доказательность полученных результатов.

2.1. Материал исследования

Экспериментальное доклиническое рандомизированное контрольно-сравнительное исследование выполнено на 112 белых крысах линии Wistar одного пола (самцы). Учитывая поставленные задачи, в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России были закуплены животные в зрелом пострепродуктивном возрасте весом не менее 350 грамм (масса тела в день моделирования ран $424 \pm 55,5/3,4$ грамм, $M_e = 410$ г при межквартильном интервале 380:460 г).

Рандомизацию животных одного пола и возраста (9-месячные самцы) проводили по весу за сутки до начала проведения эксперимента. Каждой крысе присваивался номер серии (всего 4 серии) и день выведения (3, 7 или 14 сутки). Это обеспечило исходную сопоставимость всех групп. Маркировку каждого животного

по сериям эксперимента и срокам выведения выполняли, нанося на хвосте крысы цифровую и буквенную несмываемые метки.

Моделирование кожных ран выполняли в области спины животного. Операцию выполняли в нестерильных условиях под общей анестезией (хлоралгидрат 300 мг/кг внутривбрюшинно). На выбритой коже спины на одинаковом расстоянии по обе стороны от позвоночника формировали квадратные раны типовых одинаковых размеров (задана длина каждой стороны 11 мм, глубина ран – до достижения фасции) с помощью специального устройства, позволяющего создавать кожные раны стандартизированного размера у экспериментальных животных (Patent RF №79701/10.01.2009). Таким образом, был удален фрагмент кожи, включающей все слои эпидермиса и дермы, в общей сложности (обе раны) занимающий $3,3 \pm 0,2\%$ поверхности спины животного. Всего было смоделировано 224 раны. Площадь ран по оценкам через 20 минут после их моделирования в среднем у всех крыс составила $132 \pm 13 \text{ мм}^2$ (медиана $128,8 \text{ мм}^2$), глубина ран – до достижения фасции).

Группы животных и их маркировка

В работе представлены результаты лечения 4 серий животных, каждая из которых включала по 2 лекарственные группы. Всего в исследовании изучены результаты заживления ран в 8 группах (таблица 1).

Таблица 1 - Маркировка животных по сериям и группам

	Рана 1 (слева)	Рана 2 (справа)
Серия 1	Контроль_0	Контроль_фр
Серия 2	Контроль_мск	МСК
Серия 3	ПСДЦ	ПСДЦ+МСК
Серия 4	Левомеколь	Актовегин

До начала эксперимента выполнена рандомизация ран на 8 групп, отличающиеся по лечению:

- Группа Контроль_0 (K0) – интактные раны, заживающие под струпом без воздействия лекарственных средств, которые моделировали естественные процессы заживления.
- Группа Контроль_фр (Кфр) - в края ран этой группы животных в день моделирования инъекционно вводили изотонический физиологический раствор натрия хлорида (0,9% NaCl), это позволило оценивать результат введения жидкости в околораневое пространство, которое сопровождает местную анестезию по типу «лимонной корочки» выполняемую хирургами во время операции или введение лекарственных средств при пролонгированном лечении ран.
- Группа Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) - в края ран этой группы крыс в день моделирования инъекционно вводили взвесь культуры мультипотентных прогениторных мезенхимальных стволовых клеток, культивированных из пуповины человека в концентрации $0,5 \times 10^6$ (всего 100.000 МСК в рану).
- Группа Контроль_мск – интактные контралатеральные раны группы МСК, на противоположной стороне тела, без непосредственного лекарственного воздействия; суть группы – оценка системного эффекта инъекционного введения МСК по интактным ранам, заживающим под струпом, гипотетически эти раны могли получать продуцируемые МСК биологически активные вещества через общий кровоток.
- Группа ПСДЦ - в края ран этой группы на 0, 1, 3, 7 сутки наружно на поверхность раны наносили биопрепарат, содержащий биосовместимые наночастицы диоксида церия (CeO_2), интегрированные в гидрогелевую матрицу, включающую природные и синтетические полимеры структурообразующих полисахаридов.
- ПСДЦ+МСК - на 0, 1, 3, 7 сутки наружно наносили биопрепарат, содержащий ПСДЦ и МСК (концентрация МСК составляла 50000 клеток на рану).

- Группа ДХ - в раны этой группы на 0, 1, 3, 7 сутки наружно наносили комбинированную противомикробную мазь, содержащую Диоксометилтетрагидропиримидин + Хлорамфеникол (препарат Левомеколь®). Согласно инструкции, в 1 грамме мази Левомеколь содержатся 7,5 мг хлорамфеникола и 40 мг диоксометилтетрагидропиримидина.
- Группа ДГКТ - в края ран на 0 сутки вводили депротеинизированный гемодериват крови телят (препарат Актовегин® в концентрации 40 мг/мл). Кроме 0-х суток, препарат вводили дополнительно на 1 и 3 сутки внутримышечно в дозе 0,2 мл.

В качестве групп сравнения в работе применялись широко используемые ранозаживляющие средства. Препарат Левомеколь® относится к фармакологической группе проотивомикробных комбинированных средств. В состав мази входят два основных действующих вещества: 1. Диоксометилтетрагидропиримидин – иммуностимулирующее средство, ускоряющее процессы клеточной регенерации в ранах, показания к его применению включают множество поражений кожи, в т.ч. острые и хронические раны. 2. Хлорамфеникол (Левомецетин) - антибактериальное средство. Препарат Актовегин® относится к фармако-терапевтической группе стимуляторы регенерации тканей, а также к клинико-фармакологической группе препаратов, активизирующих обмен веществ в тканях и стимулирующих процесс регенерации.

Таким образом, среди 8 групп 3 были с инъекционным введением лекарственных средств в края раны (Кфр, МСК, ДГКТ), 3 – с наружным нанесением лекарства (ПСДЦ, ПСДЦ+МСК, ДХ), 2 группы ран были интактными, заживающими под струпом (К0 и Контроль_мск). При этом методика и объем введения препаратов во всех ранах инъекционных и наружных средств была однотипной и выполнялась в стандартных условиях (комнатная температура 21-23°C; влажность воздуха 50%±5%). Однотипным было и содержание животных.

Инъекционное введение лекарственных средств (изотонический раствор натрия хлорида, МСК, ДГКТ) выполняли через единый однократный прокол

тонкой иглой в сутки 0 в нижне-латеральный угол каждой раны всех указанных групп ран. С помощью одноразового шприца вводили всего по 0,2 мл раствора каждого препарата (по 0,1 мл в латеральный и 0,1 мл в каудальный край с однократным проколом).

Наружное местное нанесение ПСДЦ, ПСДЦ+МСК и ДХ осуществляли на 0, 1, 3, 7 сутки в объеме 1 мл (из расчета 1 мл на см², что соответствует площади исходной раны). Препарат экстрагировали в безигольный шприц, имеющий градации по объему. Из шприца мазь или гель переносили аккуратно на рану таким образом, чтобы краев или дна раны касался только гель.

Исходно было по 28 животных в каждой группе, каждой контрольной точки выведения было по 7 животных. В каждой экспериментальной серии были также запасные животные на случай незапланированного выхода животного (преждевременного отхода) из эксперимента.

Технология получения мезенхимальных стволовых клеток

Используемые в работе МСК были выделены из пуповины человека, полученной после нормальных родов на сроке 38-40 недель гестации. Обязательными условиями были здоровая обследованная мать, нормальное течение беременности, у новорожденного не ниже 8 баллов по шкале Апгар, наличие информированного согласия донора.

Технология на получение и культивирование клеточного материала из пуповины человека состояла из следующих последовательных этапов. (1) Перед родами проводили тестирование донора (на вирусы гепатита, иммунодефицита человека, герпеса 1, 2 и 6 типов, Эпштейна-Барра, цитомегаловируса, *Toxoplasma Gondii*, сифилиса) и подписание информированного согласия. (2) Забор фрагмента пуповины осуществляли в первые 10 минут от момента перевязки и перерезания пуповины. Биоматериал, включающий не менее 10 мл цельной крови (для последующего тестирования) укладывается в стерильный контейнер, заполненный раствором Хенкса с добавлением антибактериальных средств. (3) Транспортировку биоматериала в этом контейнере выполняли в максимально короткие сроки, но не

более 24 часов от момента перевязки пуповины, при этом до и во время транспортировки он хранился при температуре от +2 до +8⁰С. (4) Выделение и культивирование клеточной культуры выполняли по описанной и апробированной ранее методике [Suzdal'tseva Y.G., 2007; Yarygin K.N 2006]. В итоге клетки были стандартной морфологической структуры, выращенной в среде культивирования α-MEM (Lonsa), StemPro™ MSC (Gibco, USA) в концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток в 1 мл. (5) Типирование клеточной культуры выполняли посредством микроскопии неокрашенных препаратов и с помощью детекции специфических белков-маркеров цитофенотипов методами иммуноцитохимии и проточной цитофлуорометрии. Полученную культуру клеток исследовали на наличие антигенов гистосовместимости (HLA-ABC, HLA-DR), а также поверхностных белков-маркеров мезенхимальных стволовых клеток: CD34, CD44 (HCAM), CD45, CD49b ($\alpha_2\beta_1$ -интегрин), CD54 (ICAM), CD90 (Thy-1), CD105 (эндоглин), CD106, CD117 (c-kit). (6). Кроме того, тестировали полученную культуру клеток из пуповины (вирусологическое и бактериологическое тестирование) на наличие микрофлоры, маркеров вирусов гепатитов В и С, ВИЧ, вируса простого герпеса 1, 2 и 6 типов, Эпштейна-Барр, цитомегаловируса, токсоплазмоза (иммуноферментный анализ и микроскопически).

Полимерные биопрепараты для наружного применения

В работе изучали эффективность применения двух новых перспективных средств: биопрепарат на основе природных и синтетических полимеров (ПСДЦ) и интеграция первого с раствором культуры мезенхимальных прогениторных стволовых клеток (ПСДЦ+МСК).

1). В качестве лечебного средства ПСДЦ мы использовали биосовместимые цитрат-стабилизированные наночастицы диоксида церия (CeO_2), которые были интегрированы в гидрогелевую матрицу, содержащую природные и синтетические полимеры структурообразующих полисахаридных гидрогелевых полимеров (пектин, альгинат, хитозан, агар-агар, водорастворимые производные целлюлозы, в т.ч. карбоксиметил целлюлоза). При разработке лекарственного средства для

заживления ран выбор пал на нанокристаллический CeO_2 , потому что он обладает низкой токсичностью и высокой биосовместимостью, а также способностью в зависимости от меняющегося pH-раны обеспечивать перенос электронов путем перехода с Ce^{3+} на Ce^{4+} валентности и обратно [Antonopoulos SN, 2019; Han G., 2017; Rosberg, H.E. 2018; Stupin V.A. 2018]. Это делает CeO_2 перспективным для применения в наномедицине [Ermakov, A.M. 2019; Ivanov, V.K., 2010; Shcherbakov, A.B. 2012]. В частности, это позволяет стабилизировать раневую среду, нейтрализуя активные формы кислорода и иные свободные радикалы, оказывая антиоксидантное, антибактериальное и противовоспалительное действие, что считается сегодня важным для восстановления любых, даже самых сложных, тканевых структур [de Munter J., Morozov S., 2021; Rosberg, H.E. 2018; Reed K., 2019 Römer, I., 2019; Silina, E.V., 2019]. Эффект переноса электронов может многократно повторяться по мере проникновения раневого отделяемого через полисахаридную гидрогелевую структуру непосредственно к наночастицам диоксида церия или, что особенно важно с точки зрения практического использования, смены раневой флоры. Разработанная полисахаридная гидрогелевая матрица позволяет не только обеспечить удобное нанесение препарата на кожные покровы, но и способна обеспечить пролонгированный эффект наночастиц CeO_2 из матрицы гидрогеля в зону повреждения, уменьшая воспаление и предотвращая развитие инфекций, при этом стимулируя пролиферативную активность фибробластов. Теоретически все это должно создавать условия для скорейшего и максимально эффективного заживления ран.

Для приготовления гидрогелевой основы биопрепарата ПСДЦ в 975 мл H_2O добавляли сухую навеску карбоксиметилцеллюлозы 20 г, пектина (Sigma Aldrich) 2 г, хитозана (Sigma Aldrich) 0,2 г, агар-агара (Roepert) 2 г и альгината натрия (Sigma Aldrich) 1 г. Далее в 25 мл приготовленной гелевой матрицы при постоянном перемешивании по каплям добавляли коллоидный золь с концентрацией оксида церия 0,004 г/л. В итоге концентрация веществ в гелевой основе матрицы составляла (в массовых процентах): carboxymethyl cellulose - 1,0; Пектин – 0,1;

Хитозан - 0,01; Агар - 0.1; альгинат натрия – 0,05; оксид церия в форме коллоидного золя наночастиц – 0,0002.

2). В разработанный нами биопрепарат на основе природных и синтетических полимеров (ПСДЦ) была добавлена культура прогениторных мезенхимальных стволовых клеток, приготовленных по описанной выше технологии. Гидрогелевая основа препарата, содержащая хитозан, альгинат, агар, пектин, сконструирована таким образом, чтобы обеспечить нахождение в ней МСК в активном состоянии, а также обеспечить постепенный выход клеток и синтезируемых ими биологически активных веществ из геля в рану. Для изготовления медицинского изделия ПСДЦ+МСК смешивание ПСДЦ и МСК выполняли в стандартных условиях. В гелевую композицию из флакона емкостью 10 мл вводили суспензию стволовых клеток по каплям объемом 1 мл при комнатной температуре и перемешивании на магнитной мешалке на малых оборотах в течение 15 минут.

В течение 10 минут поверхность ран, обработанных ПСДЦ и ПСДЦ+МСК, трансформировалась в пленку, надежно герметизирующую рану. Это предохраняло рану от внешних факторов и одновременно создавало благоприятную среду для сохранения стволовых клеток в ране.

Содержание животных. Весь период исследования животные содержались в стандартных условиях вивария при световом режиме 12/12 со свободным доступом к пище и воде. Кормление крыс осуществляли полнорационным брикетированным кормом из расчета 10 грамм корма на 100 грамм веса крысы, но не более 50 г корма на одну крысу в сутки, заменялись поилки с водой. Раздача корма производилась ежедневно один раз в сутки в одно и то же время одновременно всем животным. Одновременно с раздачей кормов заменялись поилки с водой.

До начала эксперимента животных выдерживали в течение 2-недель в стандартных условиях вивария (карантинный период). После этого выполняли рандомизацию животных по весу и маркировали крыс на хвосте. Сразу после рандомизации (за сутки до моделирования ран) животные содержались по 1 в клетке для исключения возможности влияния на раны со стороны других крыс и

предотвращения конфликтных ситуаций между животными. Далее моделировали кожные раны в области спины (день 0). После этого изучали динамику их заживления (2 недели).

Этические аспекты

Эксперимент проведен в соответствии с этическими принципами обращения с лабораторными животными и соблюдением положений «European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. CETS 123» и приказа Минздрава России №199н от 01.04.2016 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Исследование на животных одобрено Региональным этическим комитетом Курского государственного медицинского университета Минздрава России (протокол №5 от 02.11.17 г.), на базе которого была выполнена экспериментальная часть работы, а также одобрено Университетской комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Локальном этическом комитете ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (выписка из протокола от 11.05.2021 г.).

2.2. Методы исследования

Исследование выполнено с использованием визуального, инструментального и лабораторного контроля современных методов оценки действия препаратов в соответствии с разработанным Федеральным государственным учреждением «Научный центр экспертизы средств медицинского назначения», Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ».

Визуальный осмотр животных проводился ежедневно. При осмотре обращали внимание на общее состояние животного, его двигательную активность, на состояние кожных покровов и раневых поверхностей. Оценка показателей с фиксацией результатов проводилась после взвешивания крыс.

Вес животного оценивали до начала любых манипуляций на каждой контрольной точке исследования. Крысу аккуратно, стараясь не вызвать беспокойство или причинить боль, перемещали из клетки в металлическую чашу весов Supra BSS-4095 с погрешностью до 1 г.

В динамике изучали комплекс разных показателей, включая изменение размеров ран (0, 1, 3, 7, 14 сутки), состояние микрогемодикуляции по краю ран (у наркотизированных крыс на 0, 3, 7, 14 сутки, дважды у каждого животного - в день моделирования и в день вывода), выполняли световую микроскопию гистологических срезов, окрашенных по разным методикам с раздельным анализом состояния центра и края ран, а также морфометрию с подсчетом на единице площади фибробластных и лейкоцитарных клеток при выведении животных (3, 7, 14 сутки).

Контрольные точки исследования. Определены 6 контрольных точек исследования: 0 сутки (моделирование ран, измерения, лечение) и оценка динамики заживления ран на 1, 3, 5, 7, 14 сутки (выполняли осмотр, взвешивание и оценку динамики размеров и состояния ран). Дни выведения: 3, 7, 14 сутки. В эти дни у наркотизированных животных дополнительно к стандартным измерениям проводили исследование состояния микрогемодикуляции. Далее выполняли эвтаназию под общей анестезией (хлоралгидрат 300 мг/кг внутривентрально) путем быстрого обескровливания крысы при вскрытии правого желудочка сердца. Впоследствии выполняли подготовку ран для последующего гистологического исследования и морфометрии.

2.2.1. Методы измерения размеров ран

Измерение размеров ран выполняли на всех контрольных точках исследования: на 0, 1, 3, 5, 7 и 14 сутки. В работе представлен анализ следующих показателей, характеризующих размер ран: площадь ран, длина и ширина ран, а также показатели изменения площади ран относительно первоначального размера, регистрируемого через 20 минут от момента моделирования ран.

Методика измерения размеров ран состояла из нескольких последовательных этапов. Сначала визуальный осмотр животного сопровождался линейным измерением ран с фотодокументированием. Фотографирование ран выполняли с помощью фотоштатива Manfrotto 055 (Manfrotto, Италия), штативной головки Manfrotto MHXPRO-BHQ6 (Manfrotto, Италия) и цифрового фотоаппарата Canon EOS550D (Canon, Япония) с объективом Canon EF-S18-55, закреплённом на штативе, при одинаковом ракурсе и расстоянии до раны в 30 см $\pm 10\%$ вместе с одной и той же миллиметровой линейкой, используемой на всех точках эксперимента у всех крыс. Формат цифрового изображения Jpeg. Освещение объекта съёмки выполняли светодиодным прожектором Эра-50-6500К-М (Россия) мощность 50 Вт со световым потоком 3500 Лм и цветовой температурой 6500К, расстояние до объекта - 1 метр. Во время съёмки животное располагалось таким образом, чтобы фотографируемая рана оказалась в фокальной плоскости по центру кадра. Рядом с раной в поле кадра позиционировали линейку с миллиметровыми делениями для определения размеров ран (Рисунок 1).



Рисунок 1 - Фотодокументирование одной и той же раны в динамике (представлены 0, 3, 7 и 14 сутки).

Площадь раны (в мм²), точно ограниченная ее краями, рассчитывалась по фотографиям с помощью программы JMicroVision 1.2.7 (free download; Nicolas Roduit University of Geneva, Швейцария), выражая конечный результат в мм².

Показатели изменения площади ран относительно первоначального размера вычисляли путем вычитания $S_x - S_0 = \Delta S$, выражая конечный результат в мм², где S_0 – площадь раны в день моделирования (на 0 сутки), S_x – площадь раны в контрольной точке исследования на 1, 3, 5, 7 или 14 сутки. Положительное значение говорило об увеличении площади ран, отрицательное – о ее сокращении. На 14 сутки исследования определяли качественные итоги заживления ран в 3-х качественных вариантах: хороший результат (≤ 10 мм²), удовлетворительный (11-20 мм²), неудовлетворительный плохой результат (более 20 мм²).

В день 0 площадь всех ран составила в среднем (Me) 129 мм² (132±13 мм²). Статистически по показателю площадь ран в день моделирования группы не отличались друг от друга (группа Контроль_фр – 118 мм² при интерквартильном интервале [106 : 131] мм², группа Контроль_0 – 131 [113 : 148] мм², группа Контроль_мск – 135 [119 : 151] мм², группа МСК - 134 [122 : 156] мм², группа ПСДЦ - 141 мм² [117 : 154] мм², группа ПСДЦ+МСК - 142 мм² [126 : 157] мм², группа ДХ – 119 мм² [105 : 135] мм², группа ДГКТ – 116 мм² [110 : 127] мм²). Исходная сопоставимость групп по показателю площадь раны обуславливает корректность дальнейшего сравнительного статистического анализа этого показателя в динамике.

2.2.2. Методы оценки микрогемоциркуляции

Исследование состояния микрогемоциркуляции изучали по краю ран (отступая на 1,5-2 мм от края раны) у наркотизированных крыс, т.е. всем животным в день 0 и в день вывода из исследования на 3, 7 и 14 сутки. Применяя аппаратно-программный комплекс для электрофизиологических исследований MP150 (BIOPAC Systems, Inc, США), который включает модуль для лазер-доплеровской флоуметрии LDF100C, датчик игольчатый для лазер-доплеровской флоуметрии

TSD145 и программное обеспечение AcqKnowledge version 4.4.1. Комплекс фиксирует наличие сдвига частоты отраженного сигнала и, в соответствии с алгоритмом программной обработки сигнала, переводит их в перфузионные единицы (Blood Perfusion Units, BPU). Для каждой раны в каждой точке исследования измерение проводили в 4 точках, расположенных на коже по центру каждой из 4 сторон стандартной квадратной раны. Игольчатый датчик устанавливали при помощи держателя перпендикулярно коже на 1,5-2 мм снаружи по всем краям квадратной раны. Итоговый показатель микроперфузии ткани вокруг раны представлял собой усредненную величину BPU, полученную со всех 4-х сторон каждой раны (рисунок 2).

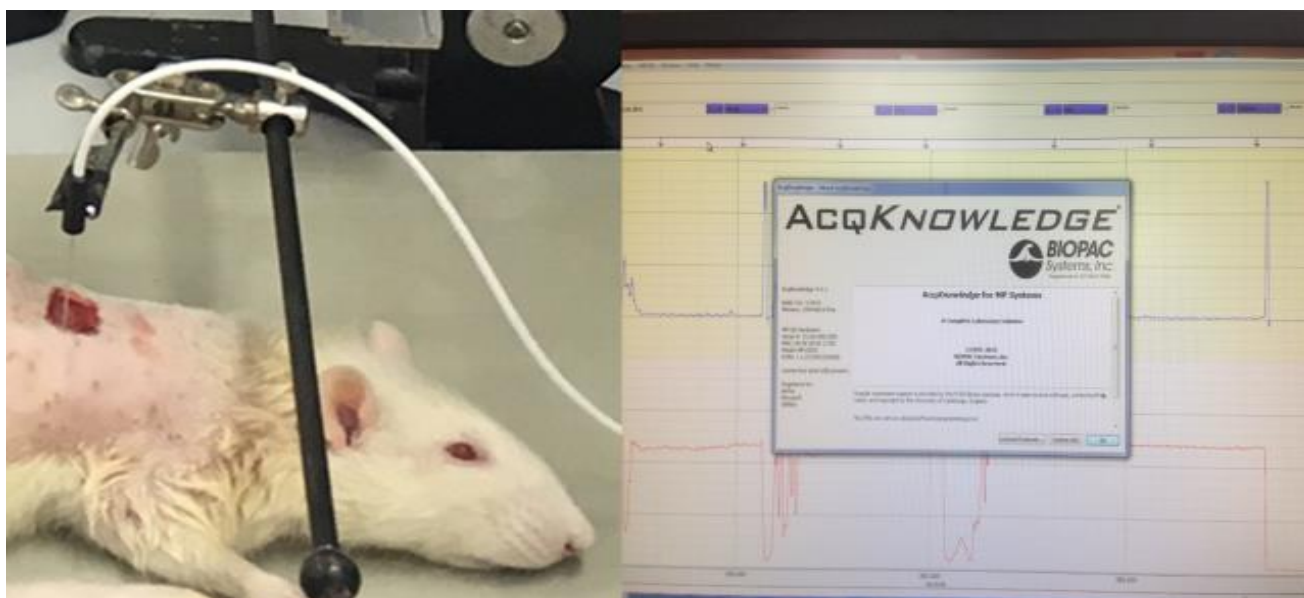


Рисунок 2 - Исследования микрогемоциркуляции на коже края раны на 0 сутки исследования у крысы, находящейся под общей анестезией.

Суть метода состоит в том, что лазерный луч (с определенной длиной волны) из световода датчика падает на живую ткань, пронизанную капиллярами, по которым движется кровь. Длина волны лазерного излучения подобрана таким образом, что этот луч отражается в основном от эритроцитов, при этом в соответствии с эффектом Доплера, если эритроцит будет двигаться, т.е. приближаться или удаляться от источника излучения, наблюдается изменение частоты отраженного сигнала относительно исходного. Комплекс MP150 фиксирует наличие сдвига частоты отраженного сигнала и в соответствии с

разработанными производителем прибора алгоритмами программной обработки сигнала переводит их в количественную форму, в перфузионные единицы (BPU = Blood Perfusion Units).

В работе представлен анализ показателя объема микрогемоперфузии в разных группах на всех контрольных точках исследования, а также сравнительный анализ динамики микрогемоперфузии по связанным выборкам, то есть у животных, выведенных из эксперимента на данной контрольной точке в сравнении с исходным показателем, измеренным на 0 сутки.

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 [95ДИ 67-207 BPU]. Значение показателя микрогемоперфузии на 0 сутки в исследуемых группах при ранжировании по контрольным точкам выведения было статистически неразличимым.

2.2.3. Методы гистологического и морфологического исследования

Для гистологического исследования парафиновые блоки иссеченных фрагментов ран кожи (с обязательным захватом раны и края раневой поверхности с макроскопически неизменной кожей и сохранными производными эпидермиса) резали при помощи микротомы МЗП-01 (КБ Технорм, Россия). Изготавливали срезы кожи толщиной 5 мкм, которые монтировали на предметные стекла. После окраски срезы заключали в среду Bio Mount НМ (BioOptica, Италия) под покровное стекло.

Для каждой раны делали не менее трех последовательных срезов (препаратов), которые окрашивали несколькими способами: гематоксилин-эозином (для описательной световой микроскопии), только гематоксилином (для обработки в программе Image-J с количественным анализом числа клеток в 1 мм²), по Ван-Гизону (для исследования и оценки коллагенизации раны, включая локацию

коллагена, объем и степень его зрелости, соотношение зрелого и молодого коллагена, окрашенного оксифильно).

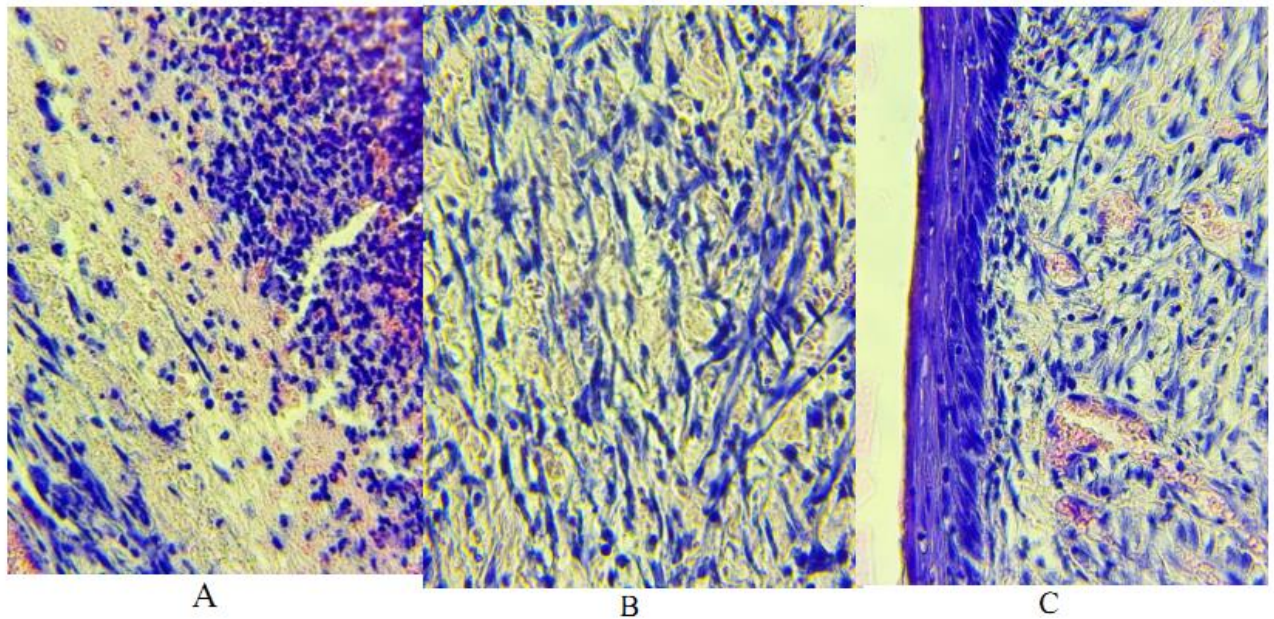
В последующем выполняли световую микроскопию при увеличениях $\times 40$, $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$, $\times 800$ выполняли с использованием микроскопов Leica CME (Германия) и Levenhuk D740 (США). При этом морфологи не знали какую из групп представляют срезы раны (слепое исследование).

При проведении микроскопии все препараты делилась на три области (центр ран и два их противоположных края). Каждая область занимала 33,3% от всего поперечного размера раны. Край раны определялся по сохраненной тканевой структуре, включая зрелые коллагеновые волокна и интактную кожу.

При оценке стадии заживления учитывали состояние заполненности раневого кратера, формирование краевого эпителиального вала, количество слоев эпидермиса и степень покрытия им стенок раневого кратера и грануляций. Кроме того, на гистологических препаратах определяли наличие отека, стаза крови в кровеносных сосудах, выраженность лейкоцитарного инфильтрата, а также наличие, степень зрелости и пространственной организации коллагеновых волокон. Особое внимание уделяли оценке эпителизации раны, определяя наличие и выраженность слоев эпидермиса, покрывающего новообразованную межуточную ткань, протяженность эпителизации по всем 3 участкам раны (центр и два края).

При морфометрии выполняли с оценкой ран на каждой точке исследования (3, 7, 14 сутки) каждой группы ран. Особое внимание уделяли подсчету плотности в толще слоев грануляций клеток резидентов (общее количество фибробластов), остальные клетки были нерезидентными (общее количество лейкоцитов (гранулоцитов, макрофагов, лимфоцитов и моноцитов), рекрутированных в очаг воспаления). Определяли число клеток, их морфологические характеристики в слоях грануляции в центре и краях ран. Для этого использовали пакет для морфометрии Image-J (National Institutes of Health, USA), хорошо известного и широко используемого морфологами для анализа и обработки изображений.

Программа написана на языке Java и позволяет определить плотность, число клеток на единице площади, в том числе с дискретизацией клеток по их общепринятым морфометрическим визуальным признакам, основанным на размере, форме клеток и их ядер. В итоге получено число двух основных типов клеток: фибробласты (резидентные клетки, образованные в этой ткани) и лейкоциты (нерезидентные клетки, которые мигрировали в поврежденные ткани из сосудистого русла) (Рисунок 3).



А. 3 сутки, центр раны группы Контроль_мск. Поверхностные слои грануляций с обширной инфильтрацией лейкоцитами (круглые клетки). На дне раны имеются фибробласты (продолговатые клетки с вытянутыми ядрами). Видно, что лейкоцитов значительно больше, чем фибробластов.

В. 7 сутки, центр раны группы Контроль_0. Превалируют фибробласты (клетки с вытянутыми ядрами) над лейкоцитами (клетки круглой формы меньше по размеру).

С. 14 сутки, центр раны группы МСК. Поверхность раны полностью закрыта многослойным плоским ороговевающим эпителием. В слоях дермы визуализируются новообразованные сосуды и межклеточный матрикс. Количество клеток (лейкоциты и фибробласты) уменьшилось по сравнению с 7 сутками. Фибробластов больше, чем лейкоцитов.

Рисунок 3 - Микрофотографии гистологических препаратов ран на 3, 7, 14 сутки. Центральный фрагмент ран. Окраска гематоксилин-эозин, увеличение $\times 400$.

Анализировали их абсолютное число (количество клеток на мм^2), процентное содержание, а также соотношение числа фибробластных и лейкоцитарных клеток

(клеточный индекс = фибробласты / лейкоциты), что позволяло сделать заключение о фазе и процессе заживления ран. В работе проведен анализ показателей числа, процентного содержания и отношения фибробластных и лейкоцитарных клеток отдельно по краям и центру раны. Кроме того, изучали показатели общего числа и концентрации клеток на единицу площади раны, для этого все результаты по краям ран и центру суммировали и усредняли.

2.2.4. Статистические методы

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программы SPSS 23.0 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM, США) с применением параметрических и непараметрических критериев в соответствии с общепринятыми принципами статистического анализа. Различия признавали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Описательная статистика непрерывных количественных данных представлена в виде медианы (Me), значений нижнего (25%, Q_1) и верхнего (75%, Q_2) квартилей, рассчитанных с учетом сгибов Тьюки, а также и 95%-доверительный интервал (95ДИ) при $n > 20$ (число ран в группе более 20). Нормальность распределения количественных выборок оценивали по критерию Колмогорова-Смирнова. Для сравнения двух независимых непараметрических выборок использовали критерий Манна-Уитни (Mann–Whitney U test). Для сравнения более двух независимых выборок применяли критерий Крускала-Уоллиса (Kruskal - Wallis test). При одновременном сравнении количественного показателя у всех исследуемых в работе групп применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA (Analysis of Variation). При получении значимости $p < 0,05$ проводили дальнейшее множественное сравнение по каждой из групп с проведением апостериорных тестов (Бонферрони, НЗР, Дункан, Т-критерий Даннета для сравнения с контрольной группой). Это позволило выявить значимые отличия каждой из групп по анализируемым признакам от всех исследуемых в работе групп, а также

выстроить их последовательность. Для сравнения двух зависимых непараметрических выборок использовали критерий Уилкоксона (Wilcoxon test). Качественные данные в работе представлены в абсолютных значениях и в процентах, их сравнительный анализ осуществляли по критерию χ^2 (хи-квадрат, анализ таблиц сопряженности). Для определения взаимосвязи показателей был выполнен корреляционный анализ по методам Пирсона и Спирмана.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Настоящая глава состоит из трех основных рубрик, которые посвящены анализу результатов динамики размеров ран, микрогемоциркуляции и гистологической картины с морфометрией краевых и центральных отделов ран исследуемых групп животных.

3.1. Результаты оценки динамики размеров ран

Анализ результатов динамики размера ран был выполнен поэтапно с учетом серии животных. Поэтому данный раздел диссертационной работы представлен следующими последовательными рубриками: 1. Результаты динамики размеров контрольных ран, заживающих под струпом (К0 и Кфр), со сравнительным анализом разных размеров интактных ран группы К0 и ран с дополнительной травматизацией (Кфр) на всех точках исследования; 2. Результаты оценки динамики размеров ран при использовании широко применяющихся в клинической практике препаратов Левомеколь (группа ДХ) и Актовегин (группа ДГКТ), с проведением сравнительного анализа полученных результатов не только в этих группах, но и с группами К0 и Кфр. 3. Результаты оценки динамики размеров ран при применении прогениторных стволовых клеток местно инъекционно (группа МСК) и системно (интактные раны на противоположной стороне тела, группа Контроль_мск), с проведением сравнительного анализа полученных результатов не только в этих группах, но и с группами К0 и Кфр. 4. Результаты оценки динамики размеров ран при применении нового полимерного средства с диоксидом церия (группа ПСДЦ) и комбинации ПСДЦ с прогениторными клетками (ПСДЦ+МСК), тоже с проведением сравнительного анализа полученных результатов не только в этих группах, но и с группами К0 и Кфр. После этого был выполнен общий анализ результатов измерения площади ран во всех 8 группах одновременно, с этой целью

был выполнен однофакторный дисперсионный анализ, ANOVA, с последующим множественным сравнением с применением апостериорных тестов.

3.1.1. Заживление под струпом контрольных ран (интактные раны и при использовании инъекции в края раны 0,9% раствора NaCl)

Установлено, что площадь интактных ран при отсутствии лечения (группа Контроль_0, K0) увеличивалась за 24 часа от момента моделирования в среднем в 1,21 раза до 158,3 мм² ($p < 0,05$), и вернулась к первоначальным значениям на 3-и сутки (статистически неотличимым от показателя площадь на 0 сутки), составив в среднем (медиана) 132,1 мм². Начиная с 5-х суток площадь интактных ран достоверно сокращалась, различие от первоначальной площади составило в среднем 1,10 раза на 5 сутки ($p < 0,05$), 1,32 раза на 7 сутки ($p < 0,01$), 5,94 раза на 14 сутки эксперимента ($p < 0,01$) (Рисунок 4). Таким образом, в интактных ранах у пожилых животных за 2 недели площадь глубокой и широкой кожной раны сокращалась почти в 6 раз, при этом воспалительный период, сопровождающийся увеличением размера ран, длился до 3 суток, а позитивные изменения были заметны начиная с 5 суток.

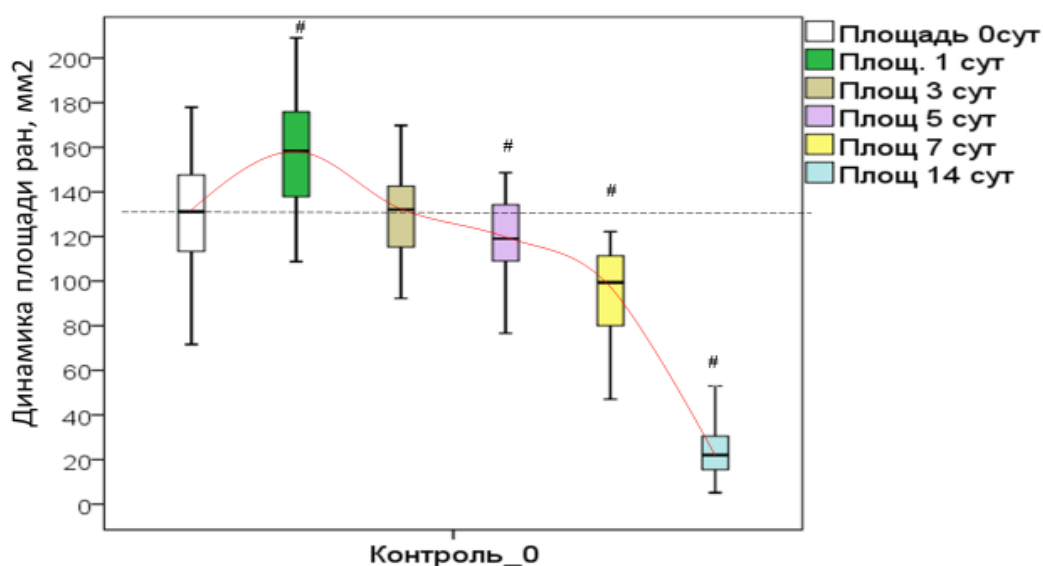


Рисунок 4 - Динамика площади ран группы Контроль_0 в период с 0 до 14 суток исследования (# - различие связанного показателя относительно дня 0 при $p < 0,05$; критерий Вилкоксона).

При дополнительной травматизации краев контрольных ран инъекционным введением физиологического раствора (группа Контроль_фр, Кфр) динамика показателя площадь ран была хуже, что выражалось в более продолжительном периоде расширения площади ран вплоть до 7 суток и, как следствие, в худшем результате заживления на 7 и 14 сутки исследования. Удлинение периода расширения ран в группе Кфр могло быть вызвано дополнительным разрушением межклеточного матрикса из-за инфильтрации краев раны физиологическим раствором.

Так, на 1-е сутки площадь ран группы Кфр значимо в 1,29 раза увеличились в среднем (Me) до 151,8 мм² ($p < 0,05$), сохраняя максимальный размер на статистически значимо более высоком уровне относительно 0-го дня уровня к 3 суткам (Me = 145,3 мм²; $p < 0,05$) и к 5 суткам эксперимента (Me = 135,4 мм²; $p < 0,05$). Лишь начиная с 7 суток площадь ран группы Кфр уменьшалась до 115,9 мм² и достигла исходных значений (это на 4 дня позже, чем в группе Контроль_0, в которой площадь ран вернулась к первоначальному уровню уже на 3 сутки). Значимое заживление ран группы Кфр было зарегистрировано только на 14 сутки исследования, когда площадь ран регрессировала в среднем в 4,56 раза относительно исходных значений (Me = 25,9 мм²; $p < 0,05$) (Рисунок 5).

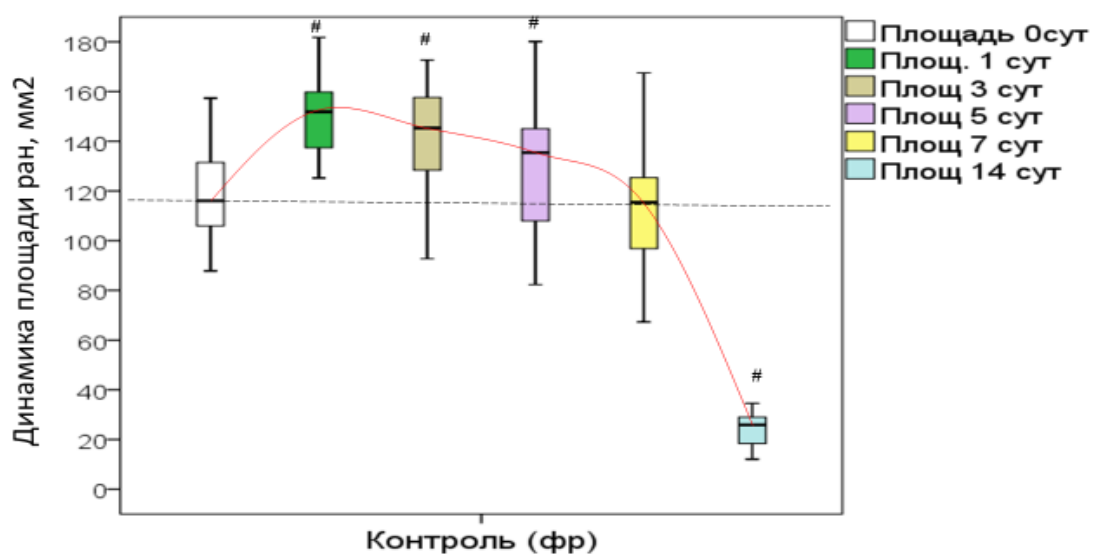


Рисунок 5 - Динамика площади ран группы Контроль_фр в период с 0 до 14 суток исследования (# - различие связанного показателя относительно дня 0 при $p < 0,05$; критерий Вилкоксона).

Выявлены тенденции к более выраженному повреждению инъекциями 0,9% раствора NaCl ран группы Кфр, площадь которых на 3, 5, 7 и 14 сутки была в среднем больше в 1,10 раза, 1,14 раза, 1,16 раза и 1,17 раза соответственно по сравнению с группой К0. Однако статистически значимых различий абсолютного показателя площадь ран в динамике в обеих контрольных ранах выявлено не было ($p>0,05$). Различие касалось более пролонгированного расширения ран относительно исходных размеров (в группе К0 увеличение площади ран было зафиксировано только на 1 сутки, в Кфр – на 1-3-5 сутки), а также сроков заживления (в группе К0 статистически значимый регресс площади ран был установлен на 5-7-14 сутки, в группе Кфр – только на 14 сутки) (таблица 2).

Таблица 2 - Динамика площади контрольных ран, животные 1 серии (мм²)

Сутки	Контроль_0	Контроль_фр	p (кр.Манна-Уитни)
0	131,2 113,1/ 147,6	118,1 105,9/ 131,4	0,098
1	158,3 137,9/175,9 ##	151,8 137,4/ 159,8 ##	0,195
3	132,1 115,3/ 142,6	145,3 128,4/ 157,7 ##	0,095
5	119,0 109,0/ 134,3 #	135,4 107,9/ 145,0 #	0,116
7	99,4 80,0/ 111,4###	115,4 96,8/ 125,3	0,163
14	22,1 15,5/ 30,6 ##	25,9 18,4/ 29,0 ##	0,551
Примечание: в таблице представлены данные в виде медианы (1я строка), нижнего / верхнего квартилей (2я строка). # - различие динамики связанного показателя в пределах отдельной группы относительно дня 0 при $p<0,05$; ## - при $p<0,01$ (критерий Вилкоксона).			

В то же время оценка изменений площади контрольных ран в динамике, относительно 0-х суток (в мм²) показала, что в группе Кфр заживления ран хуже (таблица 3).

Таблица 3 - Изменение площади контрольных ран в динамике относительно 0-х суток (мм²)

	Контроль_0	Контроль_фр	p
К 1 суткам	26,5 15,6/39,3	36,5 6,1/39,6	0,184
К 3 суткам	-0,9 -8,8 / 13,3	28,3 5,3/ 35,8	0,001 *
К 5 суткам	-10,9 -22,3 / -0,8	26,9 -10,6/ 39,5	0,005 *
К 7 суткам	-27,6 -41,8/ -0,6	-2,2 -23,9 / 12,4	0,015 *
К 14 суткам	-107,4 -120,9/-86,4	-86,4 -101,2 / -75,8	0,089
Примечание: в таблице представлены данные в виде медианы (1я строка), нижнего / верхнего квартилей (2я строка).			
* - различие между группами при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).			

Так, к концу 1-х суток в группе К0 площадь ран расширилась в среднем на 26,5 мм² (при межквартильном интервале 15,6 : 39,3), то есть в среднем на 20,2% (26,5/131,2х100%). В группе Кфр раны увеличились в среднем на 36,5 мм² (при межквартильном интервале 6,1 : 39,6), то есть на 30,9% по сравнению с сутками 0. Следовательно, в группе Кфр за первые 24 часа после нанесения травмы раны расширялись в 1,5 раза больше (или в среднем на 10 мм², на 10,7%), чем раны группы К0. Однако статистического различия по этому показателю к исходу первых суток определено не было.

На 3 сутки площадь ран группы К0 несколько сократилась в среднем на 0,9 мм² относительно 0-х суток. В группе Кфр на 3 сутки площадь ран была больше первоначальной в среднем на 28,3 мм² или на 25% больше, чем в группе К0, и это является статистически достоверным ($p < 0,01$).

На 5-е сутки площадь ран группы К0 уменьшалась в среднем на 10,9 мм² относительно 0-х суток (или на 8,3%). В группе Кфр на 5-е сутки площадь ран была больше первоначальной в среднем на 26,9 мм² или на 22,8%. Это на 31% больше, чем в группе К0, разница между группами является статистически достоверной ($p < 0,01$).

На 7-е сутки площадь ран группы К0 уменьшалась в среднем на 27,6 мм² от исходного (на 21,0%). В группе Кфр на 7-е сутки площадь ран незначительно

сократилась в среднем на 2,2 мм² относительно 0-х суток (на 1,9%), т.е. в группе К0 на 7 сутки площадь ран сократилась лучше, чем в группе Кфр на 25,4 мм² или на 19% ($p<0,05$).

К исходу 14-х суток исследования площадь ран группы К0 уменьшалась в среднем на 107,4 мм² (или на 81,9%). В группе Кфр к 14-м суткам площадь ран визуально сократилась в среднем на 86,4 мм² или на 73,2% (на 21 мм² или на 13,2% меньше, $p>0,05$).

Таким образом, при дополнительной травматизации ран с введением в них 0,9% раствора NaCl в день моделирования вплоть до 7-х суток сохраняется значимое различие в динамике площади ран на 19-30% (3 сутки - 25%, 5 сутки – 30%, 7 сутки – 19%), то есть в среднем на 25% нарушается регенерация ран группы Кфр по сравнению с ранами группы К0. Это ставит вопрос о целесообразности лечения острых ран инъекционными формами лекарственных средств, а также инфильтративной анестезии при их первичной обработке без соответствующих показаний и объективной оценки риск/польза.

Анализ качественного показателя увеличение или уменьшение площади ран относительно исходного размера установил, что к концу 1-х суток эксперимента к группе Кфр 100% ран расширились относительно исходных данных, в группе К0 – 96,4% ($p>0,05$). К 3-м суткам увеличение площади ран было зарегистрировано в 89,3% ($n=25$) случаев группы Кфр и в 50,0% ($n=14$) случаев в группе К0 ($p<0,01$), к 5-м суткам – в 42,9% ($n=9$) и 71,4% ($n=15$) случаев соответственно ($p=0,062$), к 7-м суткам – 19,0% ($n=4$) и 38,1% ($n=8$) соответственно ($p>0,05$) (Рисунок 6).

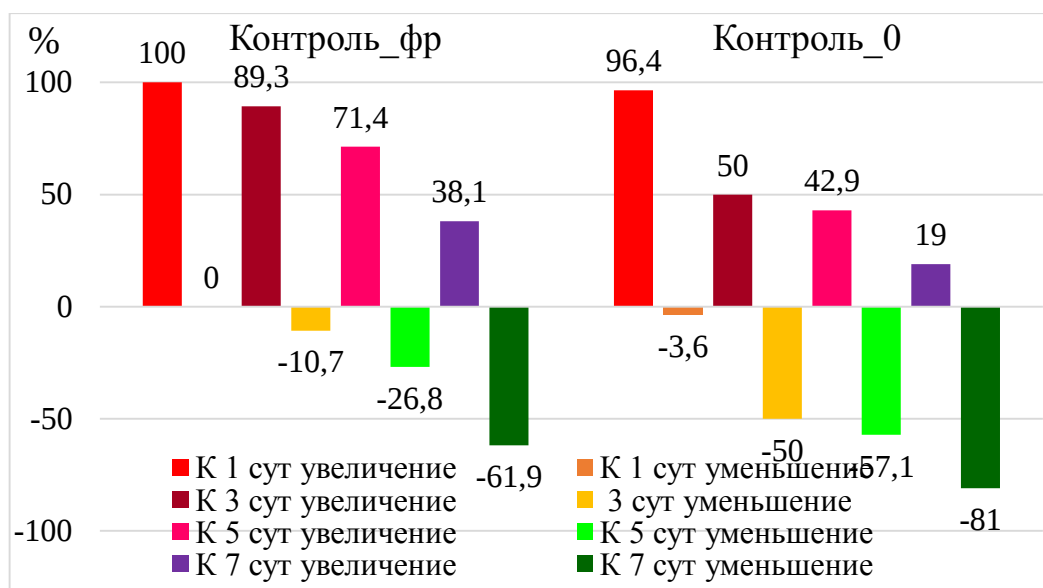


Рисунок 6 - Динамика изменений площади ран относительно дня моделирования (% увеличения и уменьшения).

К исходу 14 суток хороший исход (площадь раны до 10 мм²) был установлен в 14,3% случаев в группе К0, в группе Кфр таких случаев не было. Удовлетворительный исход (раны площадью 10-20 мм²) были зарегистрированы в 35,7% случаев в группе К0 и в 28,6% в группе Кфр; неудовлетворительный исход (более 20 мм²) – 50% и 71,4% соответственно (таблица 4).

Таблица 4 - Итог заживления по площади контрольных ран на 14 сутки

	Менее 10 мм ²	10-20 мм ²	Более 20 мм ²	р
Контроль_0	2 (14,3%)	5 (35,7%)	7 (50,0%)	0,268
Контроль_фр	0	4 (28,6%)	10 (71,4%)	

Анализ качественных вариантов размеров ран к концу 2-й недели исследования различий между контрольными группами не определил, однако выявлена тенденция к увеличению частоты хороших и удовлетворительных исходов в интактных ранах группы К0 в 1,75 раза по сравнению с группами животных, получивших инъекцию изотонического раствора хлористого натрия.

Таким образом, анализ результатов динамики размеров ран показал, что у крыс зрелого пострепродуктивного возраста за 2 недели площадь интактных ран

(K0) сокращалась в 5,94 раза (на 82%), при этом визуальные признаки воспаления регистрировались менее 3 суток, а позитивные изменения с уменьшением размеров ран были заметны, начиная с 5 суток. В группе Кфр наблюдали значимое увеличение площади ран до 5 суток с возвращением исходных размеров на 7 сутки, при этом в период 3-5-7 сутки площадь ран группы Кфр была на 20-30% больше, чем в группе K0. То есть дополнительная травматизация ран инфильтрацией 0,9% раствора NaCl приводила к пролонгации воспалительного периода и задержке начала регенерации до 5-7 дней. В итоге к 14 суткам площадь ран группы Кфр сократилась лишь в 4,56 раза (в группе K0 регресс был в 1,3 раза больше). Эти различия, вероятно, связаны с тем, что тугая инфильтрация приводила к дополнительному повреждению прямых межклеточных связей и микроциркуляторного русла. Но для оценки такой гипотезы необходимо сравнить эффективность лечебного действия препаратов, которые вводятся непосредственно в раны, что было выполнено и представлено в последующих разделах нашего исследования.

Полученные данные ставят вопрос о целесообразности преимущественного лечения инъекционными формами лекарственных средств, а также инфильтративной анестезии в ходе хирургических операций или инвазивных манипуляций без соответствующих показаний и проведения оценки риск-польза.

Таким образом, исследование динамики размеров экспериментальных контрольных ран групп K0 и Кфр показало важность начальных фаз раневого процесса, способствующих значимому увеличению ран, сохраняющемуся до 3 суток в интактных ранах и вплоть до 7 суток при дополнительной инъекционной травматизации ран. Эти процессы, протекающие во всех слоях кожи, определяют скорость, результат и характер заживления.

3.1.2. Динамика размеров ран при применении наружных ранозаживляющих противомикробных средств

Анализ динамики площади ран, для лечения которых использовали мазь Левомеколь® (Диоксометилтетрагидропиримидин + Хлорамфеникол, ДХ), установил статистически значимое увеличение ран на 1 и 3 сутки с возвращением к исходному уровню на 5 сутки исследования, а также сокращение площади ран только на 14 сутки в группе ДХ (таблица 5).

Таблица 5 - Динамика площади ран, для лечения которых применяли диоксометил-тетрагидропиримидин с хлорамфениколом, в сравнении с контрольными ранами (мм²)

Сутки	Контроль_0	Контроль_фр	Диоксометил-тетрагидро-пиримидин с хлорамфениколом (ДХ)	p (K0/Дх)	p (Кфр /Дх)
0	131,2 113,1/ 147,6	118,1 105,9/ 131,4	118,7 105,1/ 134,5	0,185	0,774
1	158,3 137,9/175,9 ##	151,8 137,4/ 159,8 ##	155,4 138,2/ 174,9 ##	0,706	0,363
3	132,1 115,3/ 142,6	145,3 128,4/ 157,7 ##	139,4 130,3/ 154,4 ##	0,105	0,629
5	119,0 109,0/ 134,3 #	135,4 107,9/ 145,0 #	139,0 108,4/ 149,1	0,064	0,910
7	99,4 80,0/ 111,4 ##	115,4 96,8/ 125,3	107,7 97,7/ 139,9	0,122	0,564
14	22,1 15,5/ 30,6 ##	25,9 18,4/ 29,0 ##	17,7 11,1/ 24,7 ##	0,129	0,005*

Примечание: в таблице представлены данные в виде медианы (1я строка), нижнего / верхнего квартилей (2я строка).

Сравнение групп: p (K0/ДХ) – Контроль_0 и ДХ, p (Кфр/ДХ) – Контроль_фр и ДХ.

* - различие между вышеперечисленными группами при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).

- различие динамики связанного показателя в пределах отдельной группы относительно дня 0 при $p < 0,05$; ## - при $p < 0,01$ (критерий Вилкоксона).

На следующий после моделирования день площадь ран группы ДХ увеличилась в размерах, сопоставимо с контролем, в среднем до 155,4 мм² (в 1,31 раза), не отличаясь ни от ран группы K0, ни от группы Кфр ($p > 0.05$).

Подобные результаты были определены при анализе ран на 3 сутки исследования, когда площадь ран составила в среднем в группе ДХ 139,4 мм², не отличаясь от контрольных ран ($p>0,05$). Но отметим тенденцию к увеличению ран группы ДХ относительно группы К0 в среднем в 1,06 раза ($p>0,05$). Но при травмировании краев ран группы Кфр показатель площадь ран на 3 сутки был незначительно выше, чем в группе ДХ (всего в среднем в 1,04 раза, $p>0,05$).

На 5 сутки площадь ран в группе ДХ не отличалась от исходной и в среднем составила 139,0 мм². В группе ДХ площадь ран на 5 день была в 1,17 раза шире по сравнению с группой К0 ($p>0,05$) и даже была больше в среднем в 1,03 раза ($p>0,05$) относительно группы Кфр. То есть в этот период регистрировали наибольшую площадь в группе ДХ.

Таким образом, до 5-х суток исследования, в наиболее важный для заживления ран инициативный период, значимых межгрупповых различий леченных и нелеченых животных установлено не было, что не позволяет говорить об эффективных преимуществах местных противомикробных средств, применяемых для лечения ран в этот период.

К 7 суткам площадь экспериментальных ран регрессировала в среднем до 107,7 мм², что статистически не отличалось от размера ран на 0 день, хотя он и был в среднем в 1,10 раза меньше ($p>0,05$). Статистически значимого различия по показателю площадь ран между группами ДХ и Кфр на 7 сутки установлено не было ($p>0,05$). Кроме того, при использовании ДХ раны на 7 сутки исследования были в 1,08 раза больше, чем в группе Контроль_0 ($p>0,05$). То есть интактные раны были как минимум не хуже леченых мазями.

К 14 суткам площадь леченных с помощью ДХ ран сократилась относительно первоначальных размеров в среднем в 6,71 раза до 17,7 мм² или на 85% ($p<0,01$). Площадь всех контрольных ран в среднем была больше, чем в группе ДХ. Но несмотря на то, что площадь ран группы К0 была в среднем в 1,25 раза больше, чем в группе ДХ, статистически значимого различия между этими группами на 14-е сутки установлено не было. Различие было установлено только при сравнении

показателя с группой инъекционного введения физиологического раствора, площадь ран группы ДХ на 14 сутки значимо отличалась от группы Кфр в 1,46 раза ($p < 0,05$) (Рисунок 7).

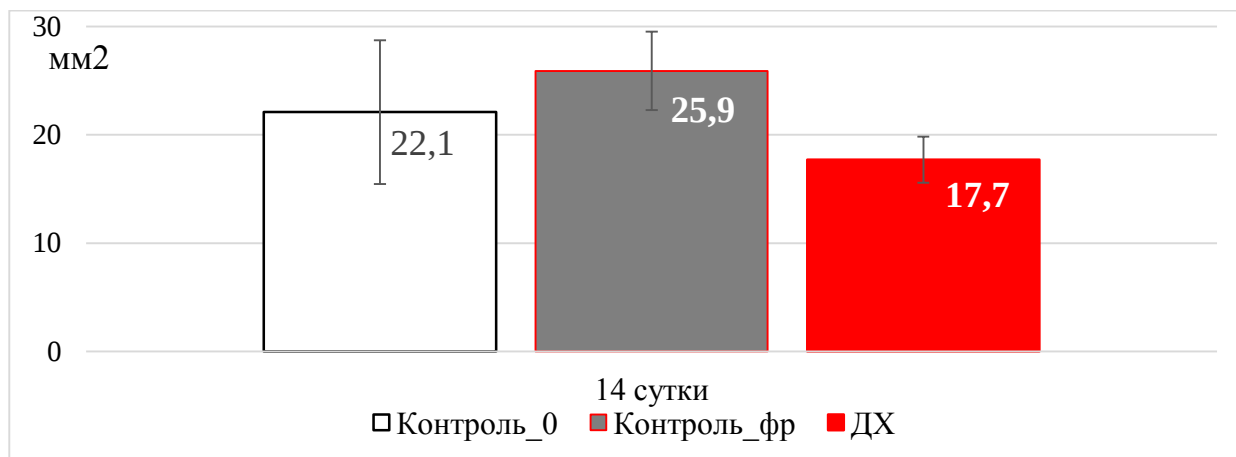


Рисунок 7 - Показатель площадь ран, для лечения которых применяли мазь ДХ в сравнении с контрольными ранами на 14-е сутки исследования (* - отличие от групп К0 и Кфр при $p < 0,05$; тест Манна-Уитни).

Следовательно, эффективность ДХ в отношении сокращения размеров острых ран не получила доказательств (Рисунок 8).

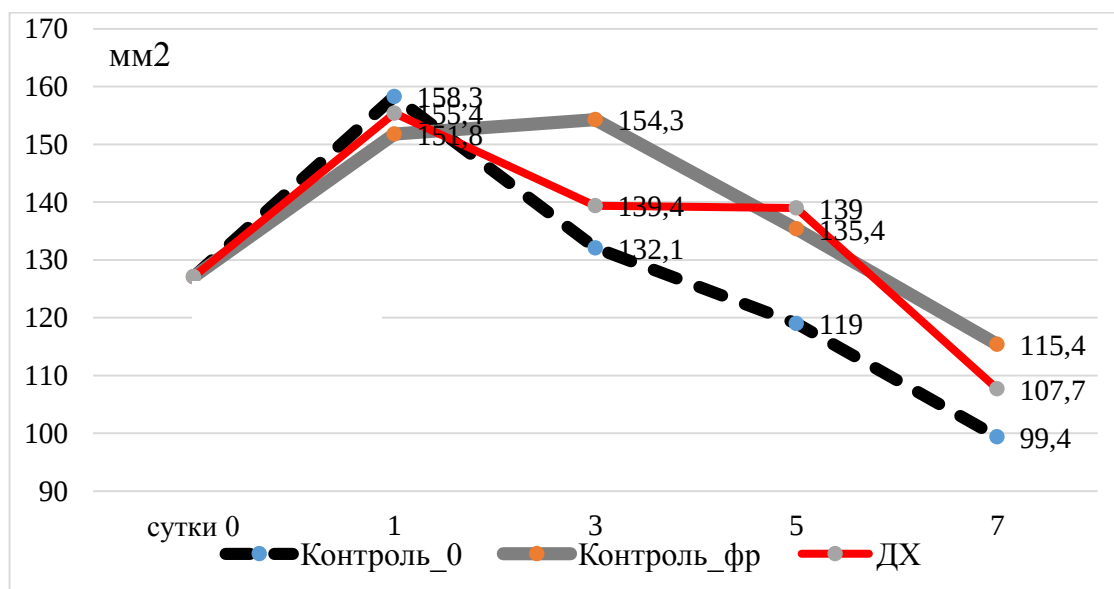


Рисунок 8 - Динамика площади ран группы ДХ в сравнении с ранами групп К0 и Кфр.

Анализ показателя частоты увеличения и уменьшения площади ран относительно ее площади в день 0 установил, что применение мази ДХ негативно отражается на размерах ран и на 3 сутки частота расширения площади ран в группе ДХ была достоверно выше, чем в интактных ранах группы К0, возможно, за счет

отсутствия сформированного раневого струпа, сближающего края ран. В группе ДХ на 1-е сутки исследования увеличились 92,6% ран (как и в контроле), к 3-м суткам - в 78,6% случаев (в 1,64 раза чаще, чем в интактных ранах группы К0, $p < 0,05$), к 5-м – в 61,9% (в 1,44 раза чаще, чем в группе К0, $p > 0,05$), 7-м суткам – 42,9% случаев (в 2,26 раза чаще, $p = 0,096$) (таблица 6).

Таблица 6 - Частота увеличения и уменьшения площади ран на 1, 3, 5 и 7 сутки исследования относительно ее площади в день моделирования в исследуемых группах

Срок	Изменения	Контроль_0	ДХ	p
К 1 суткам	Уменьшение	1 (3,6%)	2 (7,1%)	0,553
	Увеличение	27 (96,4%)	26 (92,9%)	
К 3 суткам	Уменьшение	14 (50%)	6 (21,4%)	0,026*
	Увеличение	14 (50%)	22 (78,6%)	
К 5 суткам	Уменьшение	12 (57,1%)	8 (38,1%)	0,217
	Увеличение	9 (42,9%)	13 (61,9%)	
К 7 суткам	Уменьшение	17 (81,0%)	12 (57,1%)	0,096
	Увеличение	4 (19,0%)	9 (42,9%)	

Частотный анализ размеров ран к концу 2-й недели исследования, представленный в таблице 7, статистически значимых различий между группами не определил, но была определена тенденция к уменьшению неблагоприятного исхода при лечении ран ДХ.

Таблица 7 - Итог заживления по площади ран на 14 сутки в разных группах

	Менее 10 мм ²	10-20 мм ²	более 20 мм ²	p (от ДХ)
ДХ	2 (14,3%)	6 (42,9%)	6 (42,9%)	-
Контроль_0	2 (14,3%)	5 (35,7%)	7 (50,0%)	0,920
Контроль_фр	0	4 (28,6%)	10 (71,4%)	0,183

Хороший исход (площадь раны до 10 мм²) к 14 дню был установлен в 14,3% случаев в группе ДХ (как и в группе Контроль_0. Удовлетворительный исход (раны площадью 10-20 мм²) был зарегистрирован в 42,9% в группе ДХ. Неудовлетворительный исход (раны площадью 20-30 мм²) были зарегистрированы в 42,9% в группе ДХ (в 2 раза больше, чем в К0). Плохого исхода при лечении ран ДХ не было. Впрочем, и отличного исхода (менее 5 мм²) также к 14 дню зарегистрировано не было.

Таким образом, применение ДХ сопровождалось тенденцией к замедлению заживления ран вплоть до 7 суток исследования. Применение мази ДХ сопровождалось более стойким увеличением размеров ран. Площадь ран вернулась к начальному уровню на 2 дня позже, в то время как в группе К0 площадь ран на 5 сутки уже значимо сократилась.

Полученные в ходе эксперимента данные ставят под сомнение целесообразность раннего применения противомикробных мазей во всех случаях лечения острых ран, не имеющих в первые сутки признаков бактериальной обсемененности. Более того, применение ДХ сопровождалось тенденцией к нарушению заживления ран (на 5-е сутки площадь ран группы ДХ была в 1,17 раза больше, чем в группе Контроль_0, а на 7-е сутки – в 1,09 раза больше; $p>0,05$).

Полученные результаты демонстрируют то, что по сравнению с интактными ранами, заживающими под струпом (К0) эффект ДХ в отношении сроков и скорости регенерации ран оговоренных размеров, отсутствовал.

3.1.3. Динамика размеров ран, для лечения которых применяли инъекционный стимулятор регенерации тканей (депротеинизированный гемодериват крови телят)

Анализ динамики площади ран установил некоторую эффективность применения ДГКТ в отношении более быстрого сокращения площади ран (таблица 8).

Площадь ран, для лечения которых в день моделирования использовали ДГКТ, была значимо больше относительно 0 дня на 1 сутки исследования (в среднем в 1,30 раза, увеличившись до $150,4 \text{ мм}^2$; $p<0,001$) и на 3 сутки (в среднем в 1,12 раза, $129,6 \text{ мм}^2$; $p<0,05$). К 5 суткам эксперимента площадь ран составила в среднем $125,3 \text{ мм}^2$, что было незначимо в 1,08 раза больше по сравнению с первоначальным размером ($p>0,05$). С 7 суток площадь ран группы ДГКТ значимо регрессировала в

1,27 раза, составив в среднем 91,1 мм² ($p < 0,05$), а к 14 дню раны этой группы отличались от исходных размеров в 7,68 раза или на 87% ($p < 0,01$).

На 1, 3, 5 и 7 сутки эксперимента статистически значимых отличий показателя площадь ран группы ДГКТ от разных контрольных групп определено не было ($p > 0,05$). К 14 суткам площадь ран группы Кфр по сравнению с группой ДГКТ была в 1,72 раза больше ($p < 0,05$), указывая на имеющуюся эффективность инъекционного введения ДГКТ для лечения острых ран. Однако при сравнении с группой К0 значимых различий определено не было, несмотря на то, что медиана показателя площадь ран группы К0 на 14 сутки была в 1,46 раза больше, чем в группе ДГКТ ($p > 0,05$). Следовательно, заживление острой раны под струпом происходит по меньшей мере не хуже, чем после инъекционного введения ДГКТ.

Таблица 8 - Динамика площади ран, для лечения которых применяли гемодериват крови телят в сравнении с контрольными ранами (мм²)

Сутки	Контроль_фр (Кфр)	Контроль_0 (К0)	Депротеинизирован ный гемодериват крови (ДГКТ)	p (Кфр/ ДГКТ)	p (К0/ ДГКТ)
0	118,1 105,9/ 131,4	131,2 113,1/ 147,6	116,0 109,9/ 126,5	0,640	0,108
1	151,8 137,4/ 159,8 ##	158,3 137,9/175,9##	150,4 129,6/ 169,0 ##	0,948	0,201
3	145,3 128,4/ 157,7 ##	132,1 115,3/ 142,6	129,6 109,7/ 146,6 #	0,076	0,694
5	135,4 107,9/ 145,0 #	119,0 109,0/ 134,3 #	125,3 106,4/ 114,2	0,345	0,772
7	115,4 96,8/ 125,3	99,4 80,0/ 111,4 ##	91,1 70,3/ 111,9 #	0,099	0,489
14	25,9 18,4/ 29,0 ##	22,1 15,5/ 30,6 ##	15,1 11,7/ 25,7 ##	0,024*	0,182

Примечание: представлены данные в виде медианы (1я строка), нижнего / верхнего квартилей (2я строка).

* - различие между группами при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).

- различие динамики связанного показателя в пределах отдельной группы относительно дня 0 при $p < 0,05$; ## - при $p < 0,01$ (критерий Вилкоксона).

По частотному показателю случаев увеличения и уменьшения площади ран не были зарегистрированы значимые различия по критерию X² между группами

ДГКТ и Кфр, что также позволяет сомневаться в эффективности применения данного лекарственного средства для лечения используемых моделей острых ран (таблица 9).

Таблица 9 - Частота увеличения и уменьшения площади ран на 1, 3, 5 и 7 сутки исследования относительно ее площади в день моделирования в обеих контрольных группах и при использовании ДГКТ

Сутки	Группа	Уменьшение	Увеличение	p ДГКТ
1	Контроль_фр	0	28 (100%)	0,313
	Контроль_0	1 (3,6%)	27 (96,4%)	1,0
	ДГКТ	1 (3,6%)	27 (96,4%)	-
3	Контроль_фр	3 (10,7%)	25 (89,3%)	0,446
	Контроль_0	14 (50%)	14 (50%)	0,011
	ДГКТ	5 (17,9%)	23 (82,1%)	-
5	Контроль_фр	6 (28,6%)	15 (71,4%)	0,062
	Контроль_0	12 (57,1%)	9 (42,9%)	0,062
	ДГКТ	6 (28,6%)	15 (71,4%)	-
7	Контроль_фр	13 (61,9%)	8 (38,1%)	0,317
	Контроль_0	17 (81,0%)	4 (19,0%)	0,707
	ДГКТ	16 (76,2%)	5 (23,8%)	-

Площадь ран группы ДГКТ на 1 сутки уменьшилась относительно 0-го дня только в 3,6% случаев, а расширилась в 96,4% случаев. Соотношение уменьшение: увеличение площади раны в группе ДГКТ на 1 сутки соответствовало контрольным ранам и составило 1:27.

Частота сокращения площади ран группы ДГКТ на 3 сутки составила 17,9%, увеличения – 82,1% (соотношение 1 : 4,6), это статистически не отличалось от группы Кфр, но значимо отличалось от группы К0, где частота случаев расширения площади ран была в 1,64 раза меньше ($p=0,011$). То есть заживление под струпом и без дополнительной травматизации острой раны может быть лучше, чем при лечении ее ДГКТ, что заметно уже начиная с 3 суток.

На 5-е сутки исследования площадь ран группы ДГКТ уменьшилась относительно 0-го дня только в 28,6% случаев, а расширилась в 71,4% случаев, что аналогично группе Кфр ($p>0,05$). Соотношение уменьшение : увеличение площади раны в группе ДГКТ на 1 сутки соответствовало контрольным ранам и составило 1:2,5.

На 7-е сутки эксперимента частота случаев уменьшения и увеличения площади ран относительно исходных размеров в группе ДГКТ составила 76,2% и 23,8% соответственно (3,2 к 1).

К исходу 14-х суток хороший исход (размер ран менее 10 мм²) в группе ДГКТ был зарегистрирован всего в 7,1% случаев (в группе К0 в 2 раза больше, а в группе Кфр хороших исходов установлено не было). Удовлетворительных исходов (10-20 мм²) было по 64,3% в группе ДГКТ, в контрольных группах таких результатов было в 1,8-2,3 раза меньше. Неудовлетворительных исходов (≥ 20 мм²) в группе ДГКТ было 28,6% случаев, что было меньше, чем в контрольных группах, особенно в группе К0 (различие в 2,5 раза), однако это было статистически не достоверным (таблица 10).

Таблица 10 - Итог заживления: площадь ран на 14 сутки в группах ДГКТ, Кфр и К0

	Менее 10 мм ²	10-20 мм ²	более 20 мм ²	p (от ДГКТ)
ДГКТ	1 (7,1%)	9 (64,3%)	4 (28,6%)	-
Контроль_фр	0	4 (28,6%)	10 (71,4%)	0,065
Контроль_0	2 (14,3%)	5 (35,7%)	7 (50,0%)	0,318

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии доказанного эффекта (положительного или отрицательного) ДГКТ при качественной оценке исходов заживления острых ран к 7 и 14 суткам.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что назначение ДГКТ оказалось мало эффективным, хотя и сопровождалось лучшим сокращением площади ран (только по сравнению с группой Контроль_фр), но значимым лишь на 14 день эксперимента. Площадь ран этой группы сокращалась за 2 недели в 7,68 раза (на 87%), это в 1,68 раза выше, чем в группе Кфр и в 1,29 раза больше, чем в группе К0. В группе ДГКТ наблюдали значимое увеличение площади ран до 3 суток с возвращением к исходным размерам на 5 сутки, при этом вплоть до 5-7 суток размер ран не отличался от группы Контроль_фр, а от группы Контроль_0 – до 7-14 суток. Следовательно, применение ДГКТ не имело каких-либо преимуществ по динамике размеров ран на протяжении 1-й недели исследования.

Неожиданно низкая эффективность ДГКТ, возможно вызвана отсутствием ишемии в области раны, так как известно, что в ряде клинических исследований с хорошим результатом, изучались заболевания, сопровождающиеся органной ишемией. Отсутствие принятых биологических моделей такого состояния не позволяет подтвердить или отвергнуть эту гипотезу.

3.1.4. Динамика размеров острых ран при применении прогениторных мезенхимальных стволовых клеток

Сравнительный анализ показателя площадь ран, обработанных МСК, а также контралатеральных контрольных ран статистически значимых различий между группами не определил, демонстрируя одинаковый системный и локальный эффект МСК (таблица 11; Рисунок 9).

Таблица 11 - Динамика площади ран, для лечения которых были использованы мезенхимальные стволовые клетки, а также в контрольных ранах (в мм²)

Сутки	1. Контроль_мск	2. МСК	$p_{(K_мск)}^{(МСК)}$	Контроль_0	$p_{(K0/МСК)}$	$p_{(0/K_мск)}$	Контроль_фр	$p_{(Kфр/МСК)}$	$p_{(Kфр/Кск)}$
0	134,8 119,3/151,5	133,9 122,1/156,4	0,540	131,2 113,3/147,6	0,204	0,361	118,1 105,9/ 131,4	0,074	0,061
1	140,7 127,9/147,1	138,7 127,4/149,1	0,969	158,3 ## 137,9/175,9	0,003*	0,003*	151,8 ## 137,4/ 159,8	0,007*	0,019*
3	118,8 ## 104,8/138,2	122,3 ## 106,8/136,2	0,684	132,1 115,3/142,6	0,049*	0,041*	145,3 ## 128,4/ 157,7	0,001*	0,001*
5	118,5 ## 99,3 / 130,5	123,5 ## 106,8/134,2	0,498	119,0 # 109,0/134,3	0,930	0,479	135,4 # 107,9/ 145,0	0,089*	0,034*
7	98,3 ## 82,8/128,8	99,5 ## 84,3/117,5	0,671	99,4 ## 80,0/111,4	0,624	0,671	115,4 96,8/ 125,3	0,204	0,374
14	11,3 ## 9,01/24,3	15,3 ## 10,5/21,2	0,748	22,1 ## 15,5/30,6	0,043*	0,039*	25,9 ## 18,4/ 29,0	0,001*	0,002*

Примечания. 1 строка – медиана, 2 строка – 25%/75% квантили.

* – различие между группами при $p < 0,05$ (критерий Манна Уитни)

- различие динамики связанного показателя в пределах одной группы относительно дня 0 при $p < 0,05$; ## - при $p < 0,01$ (критерий Вилкоксона).

Площадь ран, для лечения которых использовали МСК, постепенно регрессировала в среднем $Me = 133,9 \text{ мм}^2$ при интерквартильном интервале $[122.1 : 156,7]$ в день-0 до $15,3 \text{ мм}^2 [10,5 : 21,1] \text{ мм}^2$ на 14-е сутки, т.е. в день моделирования площадь раны была в 8,75 раза больше, чем через две недели лечения ($p < 0,001$).

На 1 сутки площадь раны при лечении МСК была сопоставима с размерами 0-го дня, составив в среднем $138,7 \text{ мм}^2$. По сравнению с группой К0 это было в 1,14 раза меньше ($p < 0,05$), а по сравнению с группой Кфр это было в 1,09 раза меньше ($p < 0,05$). Отсутствие периода увеличения раны наряду с достоверно меньшими размерами ран демонстрирует раннюю (заметную уже на 1 сутки) эффективность применения МСК для лечения раневых поверхностей.

В то же время системное действие МСК, которое мы оценивали по контралатеральной МСК интактной ране (группа Контроль_мск) было сопоставимо с прямым действием МСК. Раны группы Контроль_мск тоже достоверно не увеличивались в период с 0-х ($Me = 134,8 \text{ мм}^2$) по 1-е сутки ($Me = 140,7 \text{ мм}^2$, $p > 0,05$), при этом на 1 сутки исследования площадь ран этой группы была в 1,12 раза меньше, чем в группе К0 ($p < 0,05$) и в 1,08 раза меньше, чем в группе Кфр ($p < 0,05$). Сравнительный анализ показателя площадь раны в группах МСК и Контроль_мск на 1 сутки различий не выявил (рисунок 9).

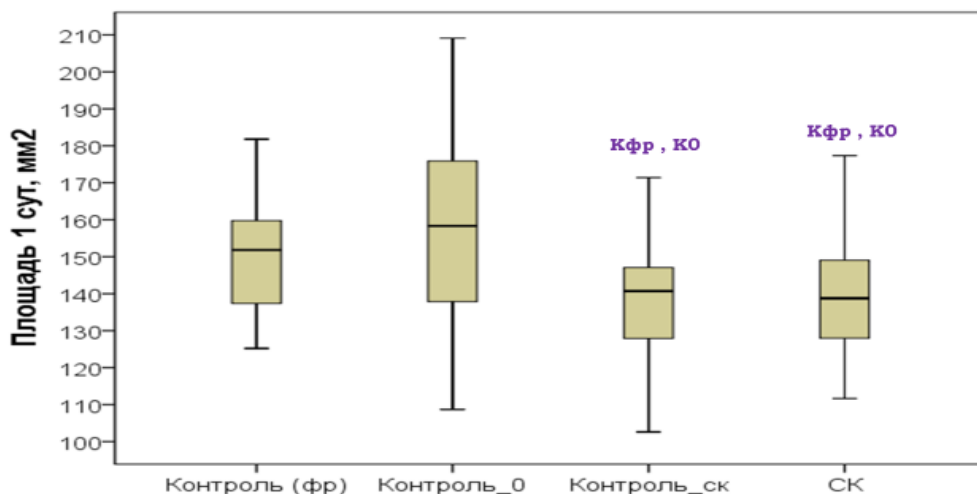


Рисунок 9 - Площадь ран, для лечения которых применяли мезенхимальные стволовые клетки в сравнении с контрольными ранами на 1-е сутки эксперимента (Кфр - отличие от группы Контроль_фр, К0 – от группы Контроль_0 при $p < 0,05$).

На 3 сутки исследования зарегистрировано достоверное сокращение площади ран в группе МСК в среднем до 122,3 мм², то есть в день моделирования она была в 1,10 раза больше ($p < 0,05$). В группе Кфр раны на 3 сутки были в 1,19 раза больше ($p < 0,01$), в группе К0 - в 1,08 раза больше ($p < 0,05$), чем в группе МСК.

Площадь ран группы Контроль_мск, как и в группе МСК, на 3 сутки достоверно уменьшилась относительно 0 суток в среднем в 1,13 раза до 118,8 мм² ($p < 0,01$). В группе Кфр раны на 3 сутки были в 1,22 раза больше ($p < 0,01$), в группе К0 - в 1,12 раза больше ($p < 0,05$), чем в группе Контроль_мск.

К 5 суткам явные преимущества МСК, зарегистрированные на 1-3 сутки исследования, утратились. Площадь ран группы МСК осталась без изменений по сравнению с 3 сутками, составив в среднем 123,5 мм², хотя и была достоверно меньше, чем в день моделирования. Однако она статистически не отличалась ни от ран группы Кфр (меньше в 1,10 раза, $p > 0,05$), ни от ран группы К0 (больше в 1,04 раза, $p > 0,05$).

Похожие изменения наблюдались на 5 сутки в группе Контроль_мск, площадь ран которой тоже осталась неизменной по сравнению с 3 днем ($M_e = 118,5$ мм²), что соответствовало площади интактных контрольных ран ($p > 0,05$). Осталось достоверное различие только с группой Контроль_фр, где раны были в 1,14 раза больше ($p < 0,05$), однако определять эффективность системного действия МСК по этому маркеру не правомочно, поскольку неправильно сравнивать интактные (Контроль_мск) раны и раны с дополнительным повреждением инъекциями 0,9% NaCl.

Сравнительный анализ показателя площадь в группах МСК и Контроль_мск на 3 и 5 сутки различий не выявил, демонстрируя одинаковую роль МСК при местном и системном введении, а также их эффективность, ограниченную в основном 3 сутками (рисунок 10). Столь короткий период пусть даже явной результативности связан с действием МСК, продуктивная жизнь которых в условиях чужого организма ограничена периодом до начала клеточной дифференцировки, 3-4 сутками.

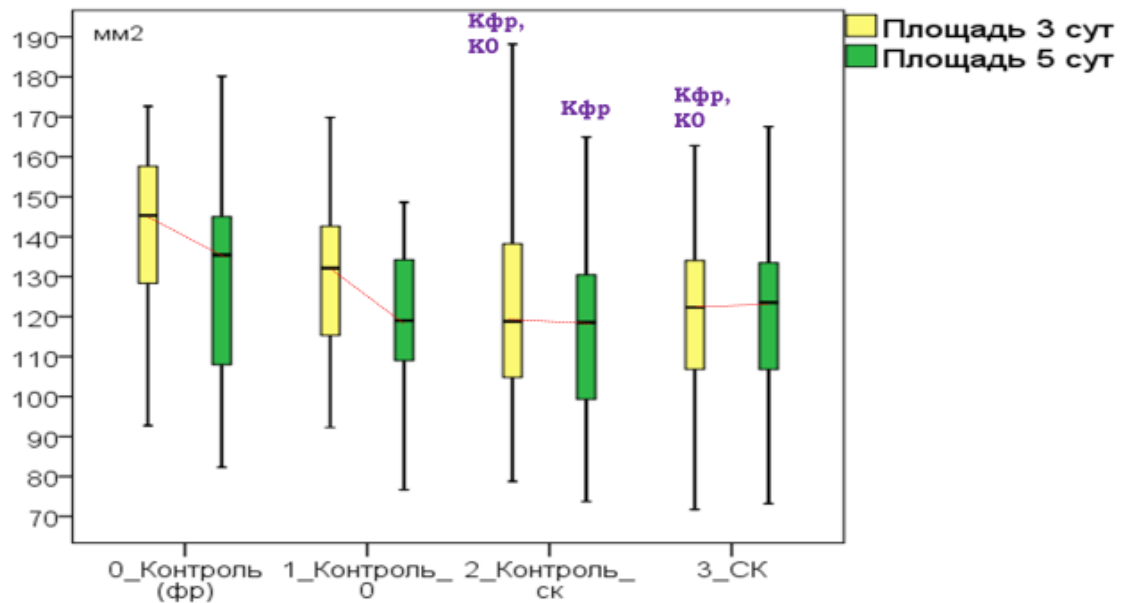


Рисунок 10 - Площадь ран, для лечения которых применяли мезенхимальные стволовые клетки в сравнении с контрольными ранами на 3 и 5 сутки эксперимента (Кфр - отличие от группы Контроль_фр, К0 – от группы Контроль_0 при $p < 0,05$).

К 7 суткам площадь ран в группе МСК и Контроль_мск статистически не отличалась от ран групп К0 и Кфр ($p > 0,05$), она составила в среднем $99,5 \text{ мм}^2$ в группе МСК (в день 0 раны этой группы были в 1,35 раза больше; $p < 0,001$) и $98,3 \text{ мм}^2$ в группе Контроль_мск (в день 0 раны были в 1,37 раза больше; $p < 0,001$). Следовательно, к 7 дню определено ослабление или отсутствие лечебного эффекта МСК, возможно вследствие однократного применения инъекций МСК у старых животных.

На 14 сутки исследования площадь ран в группе МСК составила в среднем $15,3 \text{ мм}^2$, уменьшившись по сравнению с 0 днем в 8,75 раза или на 88,6% ($p < 0,001$). Площадь ран в группе Контроль_мск на 14 сутки составила в среднем $11,3 \text{ мм}^2$, сократившись по сравнению с 0 днем в 11,93 раза или на 91% ($p < 0,001$). Несмотря на отсутствие достоверности различий показателя площади, зарегистрирована тенденция к более существенному (в среднем в 1,35 раза) сокращению площади ран при системном действии МСК без дополнительной травматизации инъекциями краев раны (рисунок 11).

Кроме того, при отсутствии отличий размера площади ран в исследуемых и контрольных группах на 5 и 7 сутки, эффективность на главных инициативных стадиях заживления (фаза воспаления - до 5 суток) привела к итоговому позитивному результату, выражающемуся в наиболее значимом сокращении площади ран (по сравнению с группой МСК, в группе Кфр на 14 сутки площадь ран была в 1,69 раза больше ($p<0,01$), в группе К0 - в 1,44 раза больше ($p<0,05$); по сравнению с группой Контроль_мск, в группе Кфр на 14 сутки площадь ран была в 2,29 раза больше ($p<0,01$), в группе К0 - в 1,96 раза больше ($p<0,05$)).

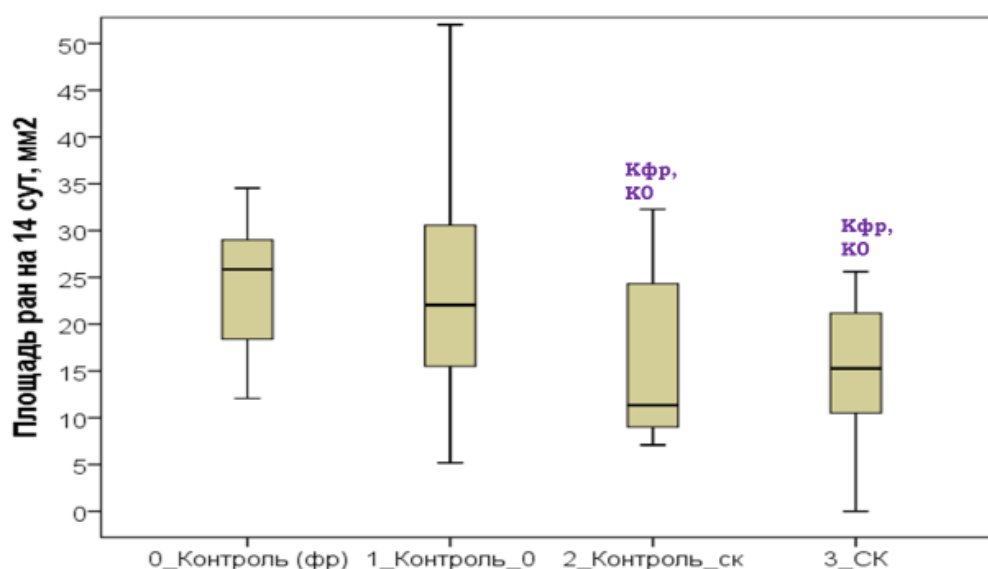


Рисунок 11 - Площадь ран, для лечения которых применяли мезенхимальные стволовые клетки в сравнении с контрольными ранами на 14 сутки эксперимента (Кфр - отличие от группы Контроль_фр, К0 – от группы Контроль_0 при $p<0,05$).

Сравнительный анализ показателя площадь ран в группах МСК и Контроль_мск по критерию Манна-Уитни различий не выявил на протяжении всего исследования. Одинаковый системный ответ подтверждает эффективность действия самих МСК по выработке биологически активных веществ, и их способность к воздействию на ткани через систему кровотока. Учитывая отсутствие маркировки использованных МСК в процессе исследования подтвердить или оспорить эффект хоуминга мы не можем.

Таким образом, применение МСК установило наиболее высокую эффективность на 1-3 сутки, демонстрируя ингибирование патофизиологических

воспалительных процессов в острейшую фазу, что в результате привело к улучшенному результату заживления ран к 14 дню исследования.

По частотному показателю случаев увеличения и уменьшения площади моделированных ран зарегистрированы значимые достоверные различия по критерию χ^2 между группами МСК и К0 на 1, 5 и 7 сутки, между группами К0 и Контроль_мск – только на 1 сутки исследования. Кроме того, установлено преимущество ран группы МСК перед Контроль_мск на 3 и 7 сутки исследования (таблица 12).

Таблица 12 - Частота увеличения и уменьшения площади ран на 1, 3, 5 и 7 сутки исследования относительно ее площади в день моделирования в обеих контрольных группах и при использовании мезенхимальных стволовых клеток

Сутки	Группа	Уменьшение	Увеличение	p (1/2)	p (0/2)	p (0/1)
1	0.Контроль_0	1 (3,6%)	27 (96,4%)	0,182	0,001	0,002
	1.Контроль_мск	11 (39,3%)	17 (60,7%)			
	2.МСК	16 (57,1%)	12 (42,9%)			
3	0.Контроль_0	14 (50%)	14 (50%)	0,050	0,002	0,175
	1.Контроль_мск	19 (67,9%)	9 (32,1%)			
	2.МСК	25 (89,3%)	3 (10,7%)			
5	0.Контроль_0	12 (57,1%)	9 (42,9%)	0,215	0,015	0,191
	1.Контроль_мск	16 (76,2%)	5 (23,8%)			
	2.МСК	19 (90,5%)	2 (9,5%)			
7	0.Контроль_0	17 (81,0%)	4 (19,0%)	0,073	0,036	0,679
	1.Контроль_мск	18 (85,7%)	3 (14,3%)			
	2.МСК	21 (100%)	0			

На 1-е сутки исследования в группе Контроль_мск площадь ран относительно 0-х суток увеличилась в большинстве (60,7%) случаев, уменьшилась – в 39,3% случаев, соотношение уменьшение : увеличение составило 1:1,54. Площадь ран, обработанных МСК на 1 сутки расширилась относительно 0-го дня в 42,9% случаев, уменьшилась в большинстве случаев (57,1%), это в 1,45 раза больше, чем в группе Контроль_мск ($p > 0,05$) и в 15,9 раза больше, чем в группе К0 ($p < 0,01$). Соотношение уменьшение : увеличение площади раны в группе МСК на 1 сутки составило 1,33:1. Сравнение таблиц сопряженности этого показателя на 1 сутки относительно контрольных ран установило достоверное различие ($p < 0,05$),

подтверждая лучшие результаты заживления ран групп МСК и Контроль_мск по сравнению с К0.

На 3 сутки исследования частота случаев уменьшения и увеличения площади ран относительно 0-х суток в группе Контроль_мск составила 67,9% и 32,1% соответственно (2,1:1), в группе МСК – 89,3% и 10,7% соответственно (8,35:1), демонстрируя наибольшую эффективность местного введения в рану МСК ($p=0,050$). Процент сокращения площади ран, обработанных МСК, на 3 сутки был в 1,31 раза больше, чем в Контроле_ск ($p=0,175$), а также в 1,79 раза выше, чем в К0 ($p<0,01$) на 3 сутки. Несмотря на то, что в группе Контроль_мск было в 1,35 раза больше случаев сокращения площади ран, чем в группе К0, статистически значимого межгруппового различия установлено не было.

На 5 сутки площадь ран в группе Контроль_мск уменьшилась в 76,2% случаев, увеличилась – в 23,8% (3,20 : 1), в группе К0 получены статистически сопоставимые результаты. Процент сокращения площади ран, после введения МСК, на 5 сутки исследования составил 90,5%, это в 1,19 раза больше, чем в группе Контроль_мск ($p>0,05$) и значимо в 1,59 раза больше, чем в группе К0 ($p<0,05$).

На 7 сутки эксперимента частота случаев уменьшения и увеличения площади ран относительно 0-х суток в группе Контроль_мск составила 85,7% и 14,3% соответственно (5,99:1), в группе МСК – все 100% ран уменьшились. Определен лучший результат в группе МСК по сравнению с группой Контроль_мск ($p=0,073$). Статистически значимые различия по этому показателю установлены между группами Контроль_0 и МСК, демонстрируя преимущества последних.

На 14-й день во всех случаях в обеих группах МСК площадь раны регрессировала.

Таким образом, инъекционное введение МСК непосредственно в рану приводит к увеличению частоты сокращения размеров ран на всех точках исследования. Системное действие клеток (Контроль_мск) показало эффективность по этому показателю только на 1 сутки. Следовательно, местное действие МСК более выражено. Наибольшая эффективность МСК при их введении

в рану по сравнению с системным эффектом может быть связана с большей концентрацией в ране МСК, а значит и с большей концентрацией биологически активных веществ, синтезируемых прогениторными мезенхимальными клетками.

Итоговая качественная оценка заживления ран к 14 суткам показала преимущество использования МСК (локально и системно) над ранами группы Контроль_фр (таблица 13). При этом инъекционное введение МСК непосредственно в рану оказалось более эффективным по сравнению с системным действием клеточной терапии лишь в первые сутки после введения МСК. Размер площади ран в группе МСК достигал 25,2 мм², а в группе Контроль_мск площадь ран варьировала в более высоких пределах – от 7,0 мм² до 32,3 мм². Кроме того, к 14 дню эксперимента единственная группа, где были зарегистрированы отличные результаты была группа МСК (14,3%), при этом полное заживление раны было в единственном случае, который был только в группе МСК (7,1%).

Таблица 13 - Итог заживления на 14 сутки: площадь ран в группах МСК и всех контрольных группах (асб., %)

	Менее 10 мм ²	10-20 мм ²	Более 20 мм ²	р (от СК)	р (от К_ск)
МСК	3 (21,4%)	6 (42,9%)	5 (35,7%)	-	0,704
Контроль_мск	5 (35,7%)	5 (35,7%)	4 (28,6%)	0,704	-
Контроль_0	2 (14,3%)	5 (35,7%)	7 (50,0%)	0,322	0,350
Контроль_фр	0	4 (28,6%)	10 (71,4%)	0,080	0,022*

Отмечено увеличение частоты благоприятного исхода в группе МСК. Только в группе МСК к концу 2-й недели исследования площадь ран не превышала 5 мм² в 14,3% случаев (включая 1 случай полной регенерации), во всех остальных группах, включая Контроль_мск, таких случаев не было. Раны площадью 5-10 мм² были зарегистрированы в 7,1% случаях в группе МСК и в 35,7% случаев в группе Контроль_мск. Таким образом, хороший исход (до 10 мм²) был в 21,4% случаев в группе МСК, в 35,7% случаев в группе Контроль_мск (это больше, чем в группе К0 – 14,3% и Кфр – 0%).

Раны площадью 10-20 мм² (удовлетворительный результат) были зарегистрированы в 42,9% случаях в группе МСК, в 35,7% случаях в Контроль_мск. Раны площадью более 20 мм² (неудовлетворительный результат) на 14 сутки были

зарегистрированы в 35,7% случаях в группе МСК и в 28,6% случаях в Контроль_мск. Причем большие раны, площадь которых к 14 дню превышала 30 мм² были зарегистрированы только в контрольных ранах: в 7,1% случаев в группе Контроль_мск, в 28,6% случаев (в 4 раза больше) в группе К0 и в 21,4% случаев в группе Кфр.

Таким образом, применение МСК приводило к лучшему исходу при лечении острых ран, что проявлялось увеличением частоты хороших результатов и сокращением частоты плохих исходов к 14 суткам.

Результаты исследования показали эффективность использования МСК для лечения ран на первом начальном этапе регенерации. Площадь ран группы МСК, как и контралатеральных интактных ран (Контроль_мск), в отличие от контрольных ран, не увеличивались в размере в первые 3 суток после моделирования, а их сокращение происходило раньше, начиная с 3 суток (в группе Кфр достоверный регресс был только на 14 сутки, в группе К0 – на 5-7-14 сутки). Наибольшая эффективность МСК была достигнута на 1 и 3 сутки по сравнению с контрольной контралатеральной интактной раной. Однако начиная с 5 суток без дополнительных инъекций МСК эффект заканчивается (на 5-7 день площадь ран по обеим сторонам от позвоночника у крыс, в одну из которых вводили в день моделирования МСК, была статистически сопоставимой с площадью ран группы К0), но за счет первоначального противовоспалительного эффекта в острой фазе к 14 дню имеется позитивный результат, выражающийся в наилучшем сокращении площади ран и лучшем итоговом заживлении ран. Это может быть следствием короткого периода активной жизнедеятельности аллогенных МСК (менее 5 суток), вводимых однократно в день моделирования в виде инъекций в рану. Поэтому в аналогичных условиях для увеличения изолированного эффекта МСК целесообразным может стать периодичность введения МСК не реже, чем каждые 4-5 дней. Подтверждением последнего является статистическая неразличимость размеров ран в динамике на протяжении всего исследования между группами МСК

и Контроль_мск, демонстрируя также одинаковый локальный и системный эффект клеточной терапии. Одинаковый системный эффект подтверждает эффективность действия самих МСК, их способность к стимуляции репаративных процессов.

3.1.5. Динамика размеров острых ран при применении полимерных биопрепаратов с наночастицами диоксида церия и с мезенхимальными стволовыми клетками

Сравнительный анализ показателей площади ран, обработанных нанополимерами ПСДЦ и ПСДЦ+МСК, установил значимые межгрупповые различия на 7 и 14 сутки исследования, демонстрируя наилучший результат заживления при применении ПСДЦ+МСК. Кроме того, по площади ран группа ПСДЦ+МСК была лучше на протяжении всего исследования (на 1, 3, 5, 7, 14 сутки) по сравнению с ранами обеих контрольных групп К0 и Кфр; площадь ран группы ПСДЦ статистически отличалась от контрольных ран в лучшую сторону по показателю площадь ран на 1, 3 и 14 сутки (Таблица 14).

На 1 сутки площадь ран группы ПСДЦ не изменилась в первые 24 часа эксперимента, составив в среднем (Me) на 0 сутки 140,9 мм², на 1-е сутки – 138,3 мм², что статистически отличалось от площади ран группы К0 в 1,14 раза ($p < 0,05$), но не отличалось от группы Кфр.

На 1 сутки площадь ран группы ПСДЦ+МСК была сопоставима с размерами 0-го дня, составив в среднем 142,2 мм² в день моделирования и 138,7 мм² на 1 сутки ($p > 0,05$). По сравнению с группой К0 площадь ран группы ПСДЦ+МСК на 1 сутки была в 1,13 раза меньше ($p < 0,01$), а по сравнению с группой Кфр это было в 1,08 раза меньше ($p < 0,01$). Отсутствие периода увеличения раны наряду с достоверно меньшими размерами ран демонстрирует раннюю (заметную уже на 1 сутки) эффективность применения ПСДЦ+МСК, повторившую эффект введения прогениторных клеток.

Таблица 14 - Динамика площади ран, для лечения которых были использованы изделия на основе полимеров, включающего в себя стволовые клетки, а также в контрольных ранах (в мм²)

Сутки	Краскела-Уоллиса	1.ПСДЦ	2. ПСДЦ+МСК	p _(1/2)	Контроль0	p _(К0/2)	p _(0/1)	Контроль_фр	p _(Кф p/2)	p _(Кф p/1)
0	0,139	140,9 117,5/154,3	142,2 126,2/156,8	0,245	131,2 113,3/147,6	0,091	0,194	118,1 105,9/ 131,4	0,071	0,079
1	0,008	138,3 126,8/167,1 (p=0,063)	140,4 121,2/151,2	0,356	158,3 137,9/175,9 (##)	0,002*	0,041*	151,8 137,4/ 159,8 (##)	0,004*	0,204
3	0,0001	117,2 95,4/143,7 (##)	113,8 107,9/128,2 (##)	0,792	132,1 115,3/142,6	0,013*	0,049*	145,3 128,4/ 157,7 (##)	0,001*	0,001*
5	0,008	113,9 97,8/137,6 (##)	105,8 93,3/110,0 (##)	0,091	119,0 109,0/134,3 (#)	0,007*	0,477	135,4 107,9/ 145,0 (#)	0,002*	0,103
7	0,0001	99,9 74,3/118,9 (##)	79,5 70,3/89,9 (##)	0,003**	99,4 80,0/111,4 (##)	0,004*	0,914	115,4 96,8/ 125,3	0,001*	0,141
14	0,0001	11,9 7,7/17,5 (##)	8,5 5,7-11,6 (##)	0,140	22,1 15,5/30,6 (##)	0,001*	0,010*	25,9 18,4/ 29,0 (##)	0,001*	0,001*

Примечания. 1я строка – медиана, 2я строка – 25%/75% квантили.

* – различие при $p < 0,05$ (критерий Манна Уитни).

- различие динамики связанного показателя в пределах одной группы относительно дня 0 при $p < 0,05$; ## - при $p < 0,01$ (критерий Вилкоксона).

Сравнительный анализ показателя площадь раны в группах ПСДЦ и ПСДЦ+МСК на 1 сутки различий не выявил (Рисунок 12). Следовательно, положительный эффект группы ПСДЦ на 1 сутки может свидетельствовать о аналогичном прогениторным клеткам влиянии ПСДЦ на раннюю экссудативную фазу заживления ран.

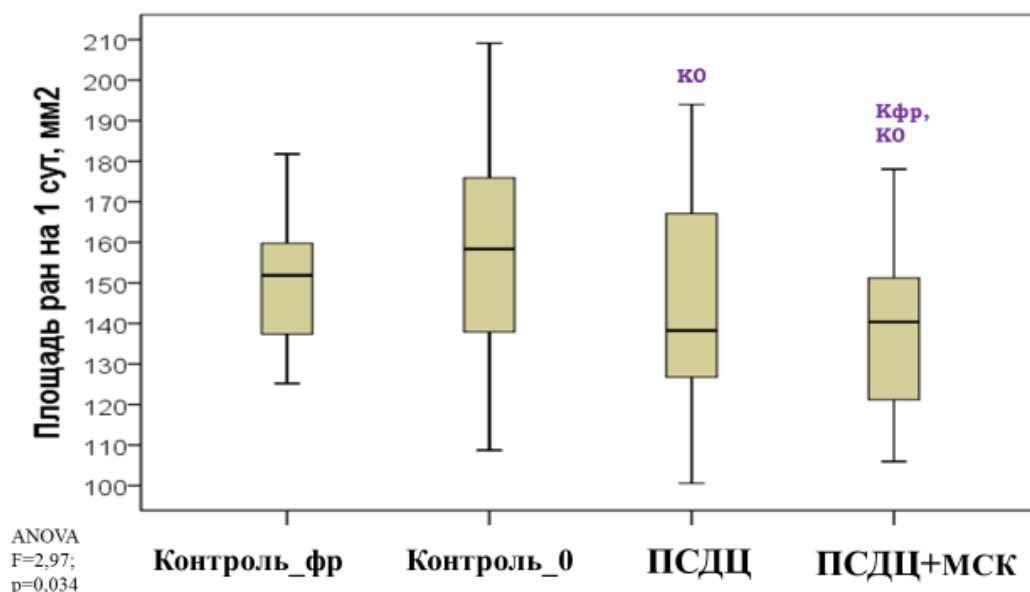


Рисунок 12 - Площадь ран, для лечения которых применяли ПСДЦ и ПСДЦ+МСК в сравнении с контрольными ранами на 1-е сутки эксперимента (Кфр - отличие от группы Контроль_фр, К0 – от группы Контроль_0 при $p < 0,05$).

На 3 сутки площадь ран группы ПСДЦ составила в среднем 117,2 мм² при межквартильном интервале [95,4 : 143,7 мм²], что значимо, в 1,20 раза отличалось от первоначального размера ($p < 0,01$). То есть можно констатировать факт сокращения размера ран при использовании ПСДЦ уже к исходу 3-х суток после моделирования острой раны. По сравнению с ранами группы ПСДЦ в группе Кфр раны на 3 сутки были в 1,24 раза больше ($p < 0,01$), в группе К0 - в 1,13 раза больше ($p < 0,05$).

На 3 сутки исследования зарегистрировано достоверное сокращение площади ран в группе ПСДЦ+МСК в среднем до 113,8 мм² при межквартильном интервале [107,9 : 128,2 мм²], то есть в день моделирования раны этой группы были в 1,25 раза больше ($p < 0,01$). По сравнению с ранами группы ПСДЦ+МСК в группе Кфр раны на 3 сутки были в 1,28 раза больше ($p < 0,01$), а в группе К0 - в 1,13 раза больше ($p < 0,05$).

Сопоставимость эффекта ПСДЦ и ПСДЦ+МСК по показателю площадь ран на 3 сутки подтверждается отсутствием значимых различий в этих группах между собой ($p > 0,05$) (Рисунок 13).

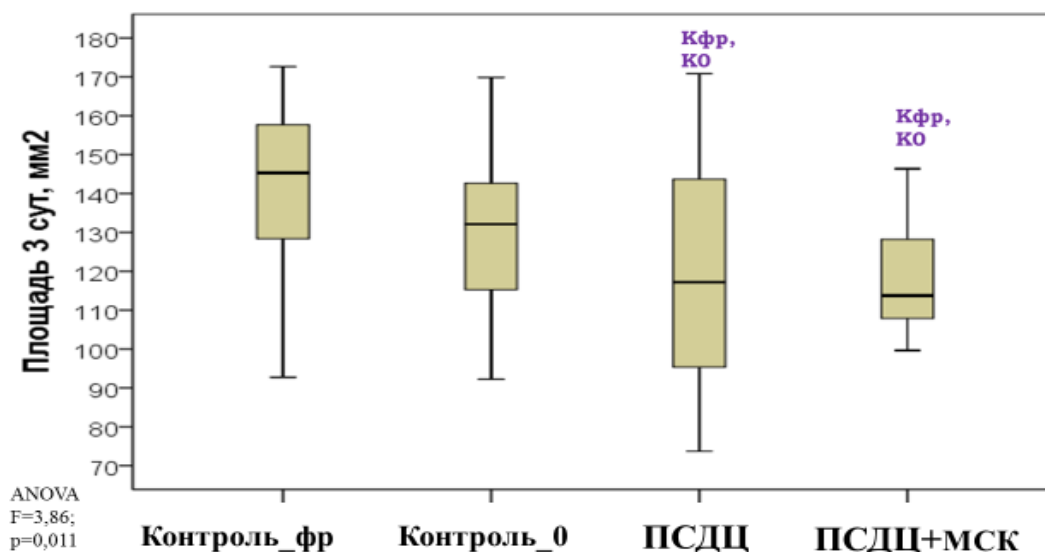


Рисунок 13 - Площадь ран, для лечения которых применяли ПСДЦ и ПСДЦ+МСК в сравнении с контрольными ранами на 3 сутки эксперимента (Кфр - отличие от группы Контроль_фр, К0 – от группы Контроль_0 при $p < 0,05$).

Площадь ран ПСДЦ+МСК на 5-е сутки составила в среднем $Me = 105,8 \text{ мм}^2$ $[93,3 : 110,0 \text{ мм}^2]$, при этом на 0 сутки площадь ран этой группы была в 1,34 раза больше ($p < 0,01$). В группе К0 площадь ран на 5 сутки была в 1,125 раза больше ($p < 0,01$), в группе Кфр - в 1,28 раза больше ($p < 0,01$), чем в группе ПСДЦ+МСК. Это говорит о продолжающемся позитивном влиянии ПСДЦск на 5 сутки исследования (в группах СК к этому времени положительного эффекта определено не было и площадь ран соответствовала контрольным группам).

На 5 сутки площадь ран группы ПСДЦ составила в среднем $113,9 \text{ мм}^2$ при межквартильном интервале $[97,8:137,6 \text{ мм}^2]$, на 0 сутки площадь этих ран была в 1,24 раза больше ($p < 0,01$). Площадь ран группы ПСДЦ на 5 сутки исследования статистически не отличалась от площади ран групп К0 и Кфр ($p > 0,05$), а также не отличалась по площади ран, обработанных ПСДЦ+МСК, несмотря на то, что в последней группе площадь ран была в 1,08 раза меньше ($p > 0,05$). При этом площадь ран группы ПСДЦ+МСК статистически значимо отличалась от ран обеих контрольных групп (Рисунок 14). Это говорит о продолжающемся на 5 день исследования позитивном влиянии ПСДЦ+МСК. Важно отметить, что в отличие от этого действие СК при их локальном и системном применении на 5 сутки завершилось и раны этих групп не отличались от контрольных.

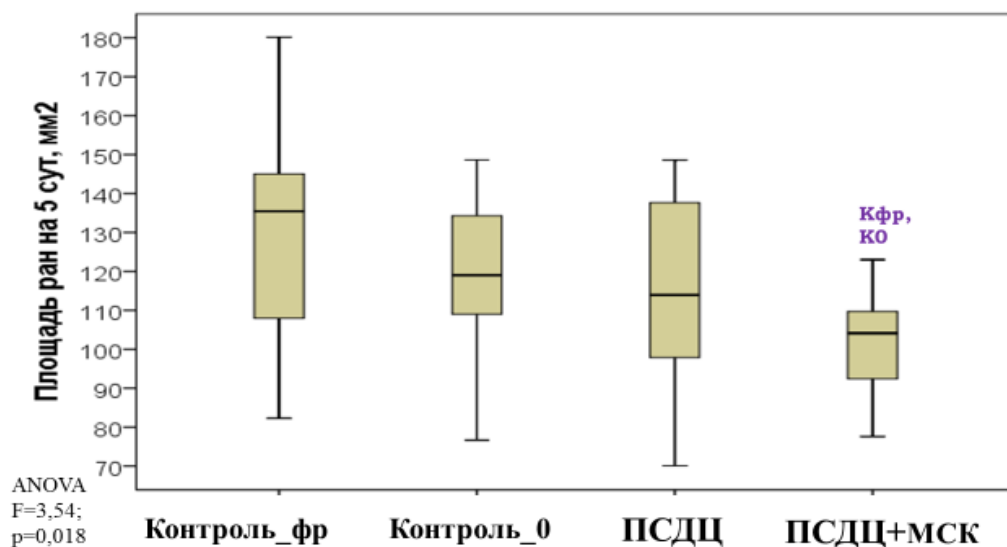


Рисунок 14 - Площадь ран, для лечения которых применяли ПСДЦ и ПСДЦ+МСК в сравнении с контрольными ранами на 5-е сутки эксперимента (Кфр - отличие от группы Контроль_фр, К0 - от группы Контроль_0 при $p < 0,05$).

К исходу 7-х суток исследования площадь ран группы ПСДЦ составила в среднем $99,9 \text{ мм}^2$ при межквартильном интервале $[74,3; 118,9 \text{ мм}^2]$, т.е. на 0 сутки площадь этих ран была в 1,41 раза больше ($p < 0,01$). Однако размер этих ран на 7 сутки статистически не различался ни с размерами ран группы К0, ни с группой Кфр ($p > 0,05$).

Площадь ран группы ПСДЦ+МСК к исходу 7-х суток составила в среднем $Me = 79,5 \text{ мм}^2$ при интерквартильном интервале $[70,3 : 89,8 \text{ мм}^2]$, то есть в день моделирования (0 сутки) раны данной группы были в 1,79 раза шире; $p < 0,01$). В группе К0 площадь ран на 7 сутки была значимо больше в среднем в 1,25 раза ($p < 0,01$), в группе Кфр - в 1,45 раза больше ($p = 0,001$), чем в группе ПСДЦ+МСК. Следовательно, к 7 дню (как и на 5 сутки) определено позитивное влияние только ПСДЦ+МСК на заживление ран.

Однако, если на 5 сутки различий между группами ПСДЦ и ПСДЦ+МСК не было установлено по показателю площадь ран, то на 7 сутки исследования сравнительный анализ показателя площадь раны установил значимое различие между этими двумя группами в среднем в 1,26 раза, демонстрирующее преимущество использования ПСДЦ+МСК (Рисунок 15).

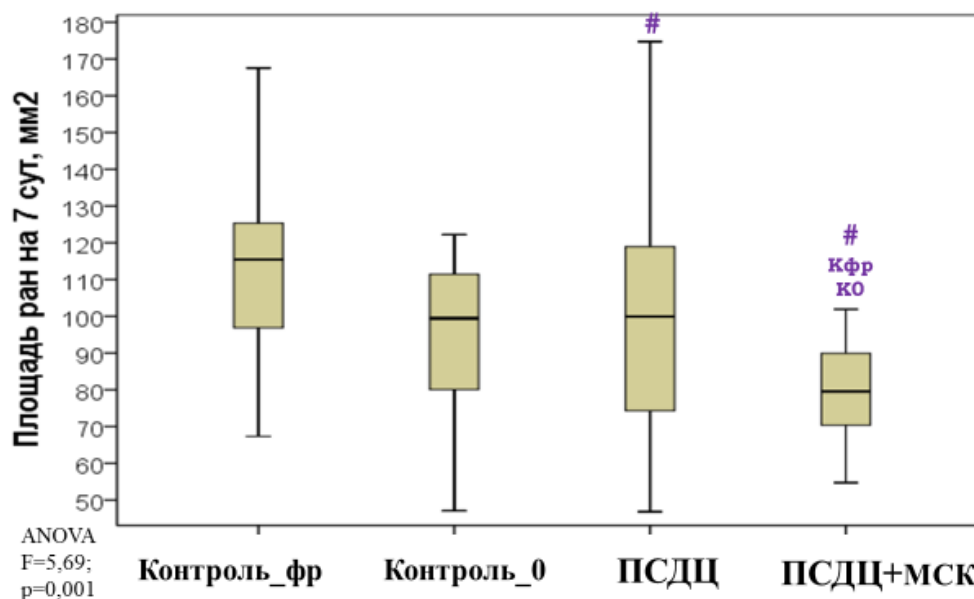


Рисунок 15 - Площадь ран, для лечения которых применяли ПСДЦ и ПСДЦ+МСК в сравнении с контрольными ранами на 7-е сутки эксперимента (Кф - отличие от группы Контроль_фр, К0 – от группы Контроль_0 при $p < 0,05$; # - отличие между группами ПСДЦ и ПСДЦ+МСК).

На 14 сутки исследования площадь ран в группе ПСДЦ составила в среднем $11,9 \text{ мм}^2$ при межквартильном интервале $[7,7; 17,5 \text{ мм}^2]$, сократившись по сравнению с 0 днем в 11,84 раза или на 91,5% ($p < 0,01$). 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 в группе ПСДЦ+МСК на 14 сутки составила в среднем $8,5 \text{ мм}^2$ при межквартильном интервале $[5,7; 11,6 \text{ мм}^2]$, уменьшившись по сравнению с 0 днем в 16,73 раза ($p < 0,001$). В группе К0 площадь ран на 14 сутки была значимо в 2,60 раза больше ($p < 0,01$), в группе Кфр - в 3,05 раза больше ($p < 0,01$), чем в группе ПСДЦ+МСК. По сравнению с раной, обработанной ПСДЦ+МСК, раны группы ПСДЦ на 14 сутки были больше в среднем в 1,40 раза, однако статистически значимого различия между группами установлено не было ($p > 0,05$) (Рисунок 16).

Таким образом, несмотря на тенденцию к большей эффективности ПСДЦ+МСК на всем протяжении исследования (площадь ран групп ПСДЦ и ПСДЦ+МСК различались в среднем на 1, 3, 5, 7, 14 сутки в 1,02 раза, 1,03 раза, 1,08 раза, 1,26 раза, 1,40 раза соответственно), статистически значимое различие между этими группами установлено только на 7 сутки исследования, демонстрирующее,

что площадь ран группы ПСДЦ была в 1,26 раза больше. Несмотря на то, что применение ПСДЦ+МСК позволило уменьшить площадь раны к 14 дню на 29% по сравнению с ранами группы ПСДЦ, статистически значимых различий установлено не было (Рисунок 17).

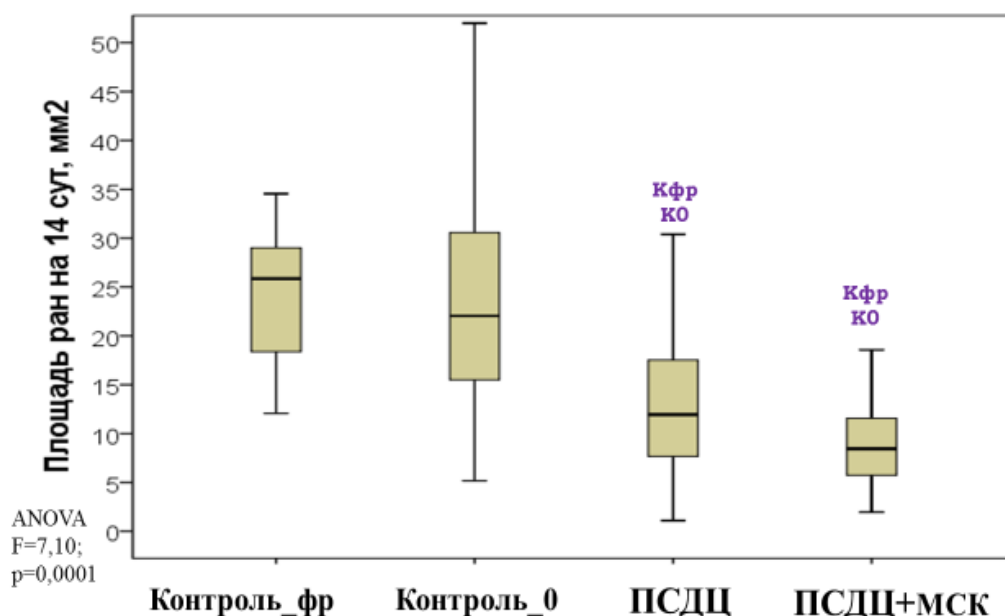


Рисунок 16 - Площадь ран, для лечения которых применяли ПСДЦ и ПСДЦ+МСК в сравнении с контрольными ранами на 14-е сутки эксперимента (Кфр - отличие от группы Контроль_фр, К0 – от группы Контроль_0 при $p < 0,05$).

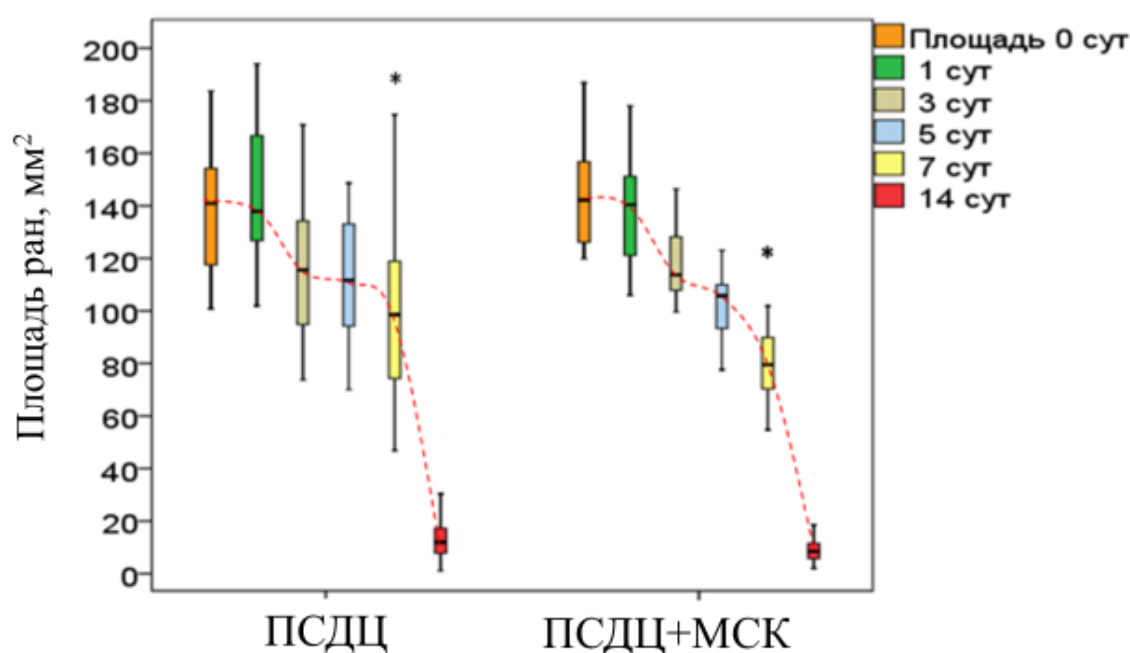


Рисунок 17 - Сравнительная динамика площади ран (в мм²) групп ПСДЦ и ПСДЦ+МСК (* - различие между группами при $p < 0,05$; критерий Манна-Уитни).

Площадь ран группы К0 была достоверно больше, чем площадь ран группы ПСДЦ в среднем на 1 сутки в 1,15 раза ($p < 0,05$), на 3 сутки – в 1,13 раза ($p < 0,05$) и на 14 сутки в 1,86 раза ($p < 0,05$) исследования, демонстрируя преимущество ПСДЦ, который способствует ингибированию ранних патофизиологических механизмов, активирующихся в контрольных ранах в первые 24 часа после моделирования острых ран. Несмотря на отсутствие различий между контрольными группами в период 5-7 сутки, первоначальный лечебный импульс системного эффекта результировал значимое сокращение площади ран группы ПСДЦ относительно ран группы К0.

Прогениторные клетки в составе ПСДЦ+МСК способствуют эффективному заживлению острых ран. Однако, если в группе СК эффект был наиболее выражен в первые 3-5 дней, ограничиваясь временем функциональной жизни стволовых клеток в несвойственной для них среде обитания, то локальное применение ПСДЦ+МСК значимо уменьшало размеры раны на протяжении всего исследования в период 1-14 сутки, при этом максимально увеличивало эффект сокращения раны за 2-недельный срок в 16,7 раза.

Наибольшее различие с ранами группы ПСДЦ, достигнутое на 7-14 сутки, демонстрирует то, что местное лечение ран комбинированным средством, соединяющим в себе и эффект нанополимеров с диоксидом церия, и прогениторные мезенхимальные клетки, уменьшает их площадь по сравнению с моно действием ПСДЦ на 19,5% на 7 сутки и на 29% на 14 сутки.

Осуществленный анализ динамики изменения относительно 0-х суток площади ран, обработанных ПСДЦ и ПСДЦ+МСК в абсолютных (в мм²) единицах, показал лечебный эффект обеих медицинских изделий, но наиболее он выражен был в группе ПСДЦ+МСК, значимые различия между группами, демонстрирующее лучшее заживление ран в группе ПСДЦ+МСК (по сравнению с ПСДЦ) на 1, 5, 7 сутки. Если в группе ПСДЦ+МСК различия от контрольных ран, заживающих под струпом, были определены на всех контрольных точках, то раны

группы ПСДЦ значимо регистрировали и отличались от контрольных на 1-3-5 и 14 сутки (на 7 день различий не было) (таблица 15).

Таблица 15 - Динамика изменения площади ран относительно 0-х суток (в мм²).

Сутки	1. ПСДЦ	2. ПСДЦ+МСК	p (1/2, Манна-Уитни)	Контроль_0 (0)	p (0/2, Манна-Уитни)	p (0/1, Манна-Уитни)	p ⁰⁻¹⁻² (Кр.Крас кела-Уоллиса)
1	10,8 -7,7 / 23,1	-2,9 -19,4 / 6,3	0,012 *	26,5 15,6/39,3	<0,001 **	0,001**	<0,001 **
3	-15,8 -40,8 / 8,1	-22,9 -38,4 / -10,9	0,106	-0,9 -8,8/13,6	<0,001 **	0,004 **	<0,001 **
5	-27,9 -46,8 / -8,2	-38,4 -49,8 / -30,1	0,039 *	-10,9 -22,2/-0,8	<0,001 **	0,038*	<0,001 **
7	-42,8 -77,6 / -21,2	-64,7 -82,2 / -47,7	0,013 *	-27,6 -41,8 / -0,6	<0,001 **	0,136	0,001**
14	-128,2 -137,9 / -100,2	-131,9 -140,3 / -117,7	0,163	-107,4 -120,9/-86,4	0,004 **	0,045*	0,022*
Примечания. 1я строка – медиана, 2я строка – Q1/Q3. * - различие между группами при p<0,05, ** - p<0,01							

Анализ динамики изменения площади ран относительно 0-х суток показал, что к исходу 1-х суток эксперимента площадь ран, обработанных ПСДЦ, увеличилась в среднем на 10,8 мм² при межквартильном интервале [-7,7 : 23,1 мм²] или на 7,6%, что говорит о том, что более, чем в половине случаев площадь ран группы ПСДЦ за первые 24 часа от момента моделирования расширилась. Однако по сравнению с ранами группы К0 был зарегистрирован существенный эффект применения ПСДЦ, выражающийся в более значимом сокращении ран на 15,7 мм² (2,43 раза), что является статистически достоверным (p<0,01).

Площадь ран группы ПСДЦ+МСК, наоборот, более чем в половине случаев сократилась к 1 суткам. В среднем площадь ран этой группы за 24 часа сократилась на 2,9 мм² при межквартильном интервале [-19,4 : 6,3 мм²] или на 2%. По сравнению с контрольными ранами применение ПСДЦ+МСК позволило лучше уменьшить размер ран, в среднем на 29,4 мм², что является статистически достоверным (p<0,01). Установлено различие изменений площади раны к исходу 1-х суток в среднем на 13,7 мм² или на 9,6% (p<0,05) и демонстрирует раннюю более высокую эффективность ПСДЦ+МСК.

К исходу 3-х суток площадь ран группы ПСДЦ сократилась в среднем на 15,8 мм² при межквартильном интервале [-40,8 : 8,1 мм²], это в 17,56 раза больше, чем в группе К0 ($p < 0,01$). Площадь ран, обработанных ПСДЦ+МСК, значительно уменьшилась к 3 суткам относительно первоначального размера в среднем на 22,9 мм² при межквартильном интервале [-38,4 : -10,9 мм²] или на 16,1%. Несмотря на то, что площадь ран группы ПСДЦ+МСК сократилась в 1,45 раза больше, чем в группе ПСДЦ, статистической достоверности определено не было ($p > 0,05$).

На 5-е сутки исследования площадь ран группы ПСДЦ сократилась в среднем на 27,9 мм² при межквартильном интервале [-46,8 : -8,2 мм²] или на 19,8%, это в 2,56 раза больше, чем в группе К0 ($p < 0,05$). Площадь ран группы ПСДЦ+МСК к 5 суткам уменьшилась в среднем относительно 0-го дня на 38,4 мм² при межквартильном интервале [-49,8 : -30,1 мм²] или на 27,0%, это в 3,52 раза лучше, чем в группе К0 ($p < 0,01$) и в 1,38 раза лучше, чем в группе ПСДЦ ($p < 0,05$).

Таким образом, применение ПСДЦ+МСК приводило к уменьшению площади ран к 5 суткам в 1,38 раза более эффективно, чем в контралатеральных ранах тех же крыс ($p < 0,05$), говоря об эффективности местного лечения ран посредством ПСДЦ+МСК.

На 7-е сутки исследования площадь ран группы ПСДЦ сократилась относительно 0 дня в среднем на 42,8 мм² при межквартильном интервале [-77,6 : -21,2 мм²] или на 30,4%. Это незначимо в 1,55 раза больше, чем в группе К0 (на 27,6 мм²) ($p > 0,05$). Площадь ран группы ПСДЦ+МСК к 7 суткам уменьшилась относительно 0 дня в среднем на 64,7 мм² (на 45,5%) при межквартильном интервале [-82,2 : -47,7 мм²], это в 2,34 раза лучше, чем в группе К0 ($p < 0,01$) и в 1,51 раза лучше, чем в группе ПСДЦ ($p < 0,05$). Таким образом, применение ПСДЦ+МСК приводило к уменьшению площади ран к 7 суткам в 1,5 раза более эффективно, чем в ранах группы ПСДЦ ($p < 0,05$), подтверждая наибольшую эффективность комбинированного лечения.

На 14-е сутки площадь ран группы ПСДЦ сократилась в среднем на 128,2 мм² (на 90%) при межквартильном интервале [-137,9 : -100,2 мм²], это в 1,28 раза

больше, чем в группе К0 ($p < 0,05$). Площадь ран группы ПСДЦ+МСК к 14 суткам уменьшилась в среднем на 131,9 мм² (на 93%) при межквартильном интервале [-140,3 : -117,7 мм²], это в 1,23 раза лучше, чем в группе К0 ($p < 0,01$) и незначимо в среднем в 1,12 раза лучше, чем в группе ПСДЦ ($p > 0,05$). Таким образом, применение ПСДЦ+МСК приводило к недостоверному уменьшению площади ран к 14 суткам по сравнению с контралатеральными контрольными ранами тех же крыс ($p > 0,05$), при этом обе экспериментальные группы существенно отличаясь от контрольных ран.

Результаты исследования динамики измерений размеров ран показали эффективность обеих полимерных средств ПСДЦ и ПСДЦ+МСК, при этом применение ПСДЦ+МСК продемонстрировало наиболее высокую эффективность по сравнению с группой ПСДЦ на 1, 5 и 7 сутки.

Анализ частоты случаев увеличения и уменьшения размеров ран относительно 0-х суток в динамике показал эффективность по сравнению с ранами группы К0 на 1-е сутки в группе ПСДЦ и на 1-3-5-7 сутки в группе ПСДЦ+МСК, причем применение ПСДЦ+МСК по данному показателю оказалось лучше, чем ПСДЦ на 3 и 5 сутки исследования (таблица 16).

Таблица 16 - Частота увеличения и уменьшения площади ран на 1, 3, 5 и 7 сутки исследования относительно ее площади в день моделирования в группах Контроль_0, ПСДЦ и ПСДЦ+МСК

Сутки	Группа	Уменьшение	Увеличение	p (1/2)	p (0/2)	p (0/1)
1	0.Контроль_0	1 (3,6%)	27 (96,4%)	0,179	0,001	0,039
	1.ПСДЦ	10 (35,7%)	18 (64,3%)			
	2.ПСДЦ+МСК	15 (53,6%)	13 (46,4%)			
3	0.Контроль_0	14 (50%)	14 (50%)	0,002	0,001	0,175
	1.ПСДЦ	19 (67,9%)	9 (32,1%)			
	2.ПСДЦ+МСК	28 (100%)	0			
5	0.Контроль_0	16 (76,2%)	5 (23,8%)	0,036	0,018	0,707
	1.ПСДЦ	17 (81,0%)	4 (19,0%)			
	2.ПСДЦ+МСК	21 (100%)	0			
7	0.Контроль_0	17 (81,0%)	4 (19,0%)	0,073	0,036	0,679
	1.ПСДЦ	18 (85,7%)	3 (14,3%)			
	2.ПСДЦ+МСК	21 (100%)	0			

На 1-е сутки исследования площадь раны в группе ПСДЦ относительно 0-х суток уменьшилась в 35,7% случаев, а увеличилась в большинстве (64,3%) случаев. Однако в группе К0 процент ран, которые относительно первоначального размера расширились был в 1,5 раза выше (96,4%, $p < 0,05$), что демонстрирует раннюю эффективность использования ПСДЦ. Площадь ран, обработанных ПСДЦ+МСК на 1 сутки была больше исходной в 46,4% случаев, а меньше, наоборот, в большинстве случаев – 53,6%, это в 1,50 раза больше, чем в группе ПСДЦ ($p > 0,05$) и в 14,9 раза больше, чем в группе К0 ($p < 0,01$). Сравнение таблиц сопряженности данного показателя на 1 сутки в обеих контрольных группах установило достоверное различие ($p < 0,05$), подтверждая лучшие результаты заживления ран при использовании для их лечения ПСДЦ, особенно ПСДЦ+МСК. Однако это тенденция, статистически значимого различия между группами ПСДЦ и ПСДЦ+МСК по данному показателю на 1 сутки установлено не было.

На 3 сутки исследования частота случаев уменьшения и увеличения площади ран относительно исходных данных на 0 сутки в группе ПСДЦ составила 67,9% и 32,1% соответственно (2,1:1). В группе ПСДЦ+МСК все 100% ран уменьшились, демонстрируя наиболее высокую эффективность применения ПСДЦ+МСК. Причем процент сокращения площади ран, обработанных ПСДЦ+МСК, на 3 сутки был в 1,47 раза больше, чем в группе ПСДЦ ($p < 0,01$), а также в 2,0 раза выше, чем в группе К0 ($p < 0,01$). Несмотря на то, что в группе ПСДЦ было в 1,36 раза больше случаев сокращения площади ран, чем в группе К0, различия между группами К0 и ПСДЦ на 3 сутки установлено не было ($p > 0,05$).

На 5 сутки площадь в группе ПСДЦ уменьшилась в 81,0% случаев, увеличилась – в 19,0% (4,26:1), это также, как и на 3 сутки, значимо отличалось от группы ПСДЦ+МСК, где 100% ран были меньше, чем в день моделирования. Процент сокращения площади ран, обработанных ПСДЦ+МСК, на 5 сутки был в 1,24 раза больше, чем в группе ПСДЦ ($p < 0,05$) и в 1,31 раза выше, чем в группе К0 ($p < 0,05$). Статистического различия между группами К0 и ПСДЦ на 7 сутки по

этому показателю не установлено, хотя частота случаев сокращения площади ран группы ПСДЦ на 5 сутки была в 1,06 раза больше, чем в группе К0 ($p>0,05$).

На 7 сутки площадь в группе ПСДЦ уменьшилась в 85,7% случаев, увеличилась – в 14,3% (6:1), это уже статистически не отличалось от группы ПСДЦ+МСК, в которой раны в 100% ран были меньше, чем в день моделирования (этот результат был только в группе ПСДЦ+МСК с 3 суток). Процент сокращения площади ран, обработанных ПСДЦ+МСК, на 7 сутки был в 1,17 раза больше, чем в группе ПСДЦ ($p>0,05$) и в 1,23 раза выше, чем в группе К0 ($p<0,05$). Различия между группами К0 и ПСДЦ на 7 сутки по этому показателю не установлено ($p>0,05$).

На 14-й день во всех случаях в обеих группах площадь раны регрессировала.

Таким образом, по частотному показателю случаев увеличения и уменьшения площади моделированных ран зарегистрированы значимые достоверные различия по критерию χ^2 между группами ПСДЦ+МСК и К0 на 1, 3, 5, 7 сутки, между группами К0 и ПСДЦ – на 1 сутки, между группами ПСДЦ+МСК и ПСДЦ на 3 и 5 сутки исследования. В группе ПСДЦ+МСК определена наилучшая эффективность, начиная уже с 3 суток все 100% ран сократились, демонстрируя ингибирующее влияние СК и ПСДЦ на воспалительные процессы.

Итоговая качественная оценка заживления ран к 14 суткам также показала преимущество использования ПСДЦ+МСК над всеми остальными группами ран (таблица 17).

Таблица 17 - Итог заживления на 14 сутки по размерам ран (3 группы исходов)

	Менее 10 мм ²	10-20 мм ²	Более 20 мм ²	p (ПСДЦ+МСК)	p (ПСДЦ)
ПСДЦ	6 (42,9%)	5 (35,7%)	3 (21,4%)	0,166	-
ПСДЦ+МСК	9 (64,3%)	5 (35,7%)	0	-	0,166
МСК	3 (21,4%)	6 (42,9%)	5 (35,7%)	0,018*	0,452
Контроль_мск	5 (35,7%)	5 (35,7%)	4 (28,6%)	0,077	0,890
Контроль_0	2 (14,3%)	5 (35,7%)	7 (50,0%)	0,004**	0,166
Контроль_фр	0	4 (28,6%)	10 (71,4%)	0,0001**	0,008**

Частотный анализ размеров площади ран к концу 2-й недели исследования показал, что площадь раны менее 10 мм² определена в 42,9% случаев в группе

ПСДЦ, в группе ПСДЦ+МСК – 64,3% (1,50 раза больше); раны площадью 10-20 мм² были зарегистрированы в 35,7% случаях в обеих группах ПСДЦ и ПСДЦ+МСК. Раны площадью 20-30 мм² и более 30 мм² к 14 суткам были зарегистрированы только в группе ПСДЦ – в 7,1% и 14,3% случаев соответственно (всего 21,4% ран было >20 мм²); в группе ПСДЦ+МСК ран такого размера на 14 сутки не было. Несмотря на увеличение частоты благоприятного исхода к 14 суткам в группе ПСДЦ+МСК в 1,5 раза и на отсутствие неудовлетворительных результатов, статистически значимого различия между группами ПСДЦ+МСК и ПСДЦ определено не было ($p>0,05$). Отмечена лишь тенденция к получению наилучшего результата заживления ран в группе ПСДЦ+МСК.

Анализ таблиц сопряженности данного показателя между группами ПСДЦ и К0 также не выявил статистически достоверных различий, хотя и определил отчетливую тенденцию к более частому получению благоприятного исхода (раны площадью менее 10 мм² в 14 суткам) в 3,0 раза, а неблагоприятного (раны площадью более 20 мм² в 14 суткам) результата было в 2,3 раза меньше в группе ПСДЦ по сравнению с группой К0. В то же время при сравнении групп Кфр и ПСДЦ установлено статистически значимое различие, демонстрирующее преимущества использования ПСДЦ перед Кфр (в группе последних не было благоприятных исходов, а в 71,4% случаев исход был неблагоприятным; $p<0,01$)

При сравнении групп ПСДЦ+МСК с контрольными группами К0, Кфр и МСК зарегистрировано значимое различие, демонстрирующее явное преимущество применения ПСДЦ+МСК для лечения острых ран ($p<0,05$).

Таким образом, применение ПСДЦск приводило к наилучшему исходу при лечении ран, что проявлялось увеличением частоты хороших результатов и сокращением частоты неудовлетворительных исходов к 14 суткам.

Результаты исследования показали эффективность использования для лечения раневых поверхностей ПСДЦ, но наилучший эффект был достигнут в ранах группы ПСДЦ+МСК.

Применение ПСДЦ+МСК продемонстрировало наиболее высокую эффективность по сравнению с группой К0, межгрупповое различие получено на протяжении всего исследования, в период 1-14 сутки. Относительно группы ПСДЦ раны, обработанные ПСДЦ+МСК, имели лучшие показатели сокращения площади ран на 1, 5 и 7 сутки.

Применение комбинированного изделия ПСДЦ+МСК для лечения острых ран максимально увеличивало эффект сокращения раны за 2-недельный срок в 16,7 раза. Наибольшее различие с контрольными ранами этой группы достигнуто на 7-14 сутки, демонстрируя то, что местное лечение ран посредством ПСДЦ+МСК уменьшает их площадь по сравнению с ПСДЦ на 19,5% на 7 сутки и на 29,2% на 14 сутки.

3.1.6. Дисперсионный анализ динамики заживления ран по показателю площадь одновременно во всех группах исследования

Выполнен сравнительный анализ площадей ран в разных группах эксперимента. Сначала был выполнен тест Левена на гомогенность дисперсий, который определяет уровень значимости различий дисперсии групп. На 0 сутки дисперсия площади показала результат $p=0,112$, (т.е. $p > 0,05$), свидетельствуя об отсутствии значимости различий дисперсии между анализируемыми группами. Следовательно, их можно рассматривать как гомогенные с возможностью корректного использование теста ANOVA для оценки динамики этого показателя.

Следующим шагом был выполнен тест Дункана. Установлено, что уже на 1 сутки исследования тест Дункана выделил по площади раны 2 гомогенные подгруппы – градации (со стандартным значением для альфа $p = 0,05$) (таблица 18). Первая градация «лучшего» результата включала группы ПСДЦ+МСК, МСК, Контроль_мск, ПСДЦ, ДГКТ. Вторая объединила в себя «худшие» значения площадей, которые в большинстве случаев увеличились к 1 дню. Это были группы Кфр, ДХ и К0. Группы ран, которые были классифицированы в обе группы (на 1

сутки к ним относились раны групп ДГКТ и Кфр), занимали промежуточное положение и на данном этапе времени не могли быть отнесены четко к одной из градаций. То есть, например, наличие группы ДГКТ говорит о схожем действии с ПСДЦ (однако который по эффекту недостоверно хуже), но при этом недостоверно лучше, чем раны групп К0 и ДХ. Полученные результаты означают, что 1-й раздел объединяет «хорошие группы» (не включая группы, градируемых во всех разделах; это группы ПСДЦ+МСК, МСК, Контроль_мск и ПСДЦ), которые уже на этом этапе эксперимента значимо отличаются от «плохих» (ДХ и К0). При этом группы ДХ и К0 не различаются.

Итоговым подтверждением наилучшего показателя площадь ран на 1 сутки исследования в группах с использованием для лечения ран прогениторных клеток (ПСДЦ+МСК, МСК, Контроль_мск, ПСДЦ), а худшего – ДХ и К0, б-26-ыли результаты проведения апостериорных тестов после получения значимости $<0,05$ по тесту ANOVA (Рисунок 18).

Таблица 18 - Площадь ран на 1 сутки исследования (Дункан тест)

Группы	Подмножество для альфа = 0.05	
	1	2
ПСДЦ+МСК	137,8061	
МСК	138,0811	
Контроль_мск	140,4985	
ПСДЦ	143,4235	
ДГКТ	148,8811	148,8811
Контроль_фр	150,5379	150,5379
ДХ		159,0796
Контроль_0		159,3075
Значимость	0,053	0,134

Выводятся средние для групп в однородных поднаборах.

Использует размер образца гармонического среднего = 31,341.

Используется среднее гармоническое размеров групп. Уровни ошибки типа I не гарантированы.

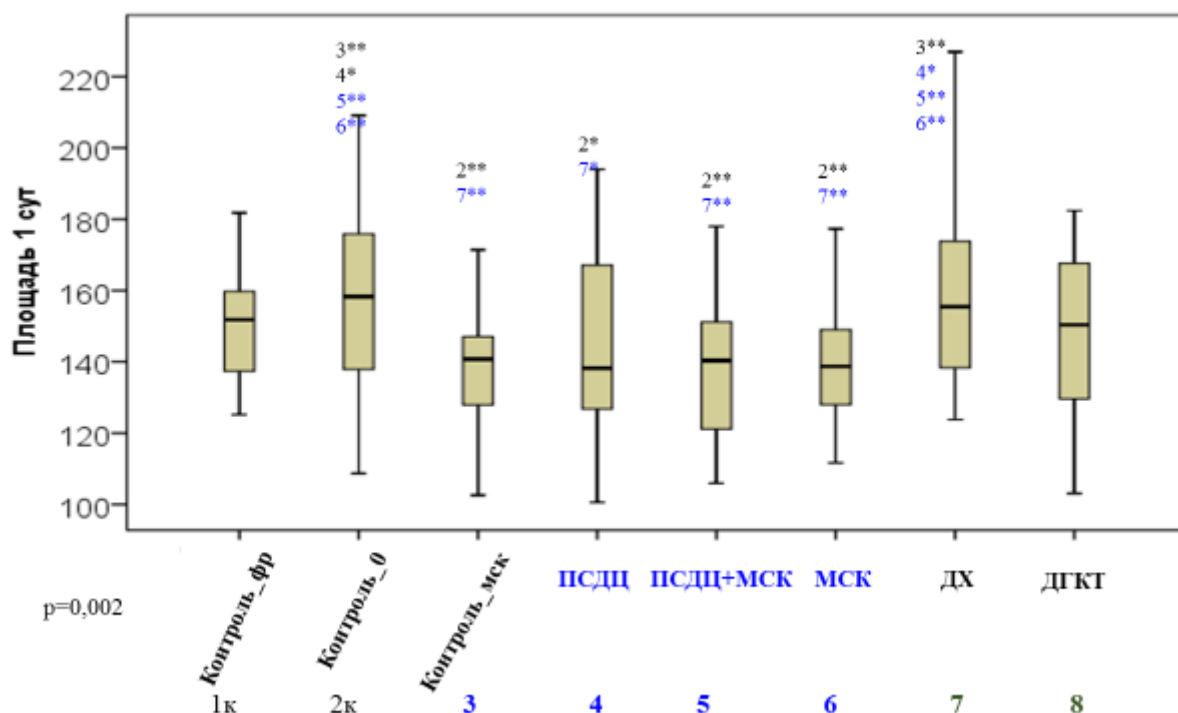


Рисунок 18 - Показатель площадь ран на к исходу 1-х суток исследования в разных группах.

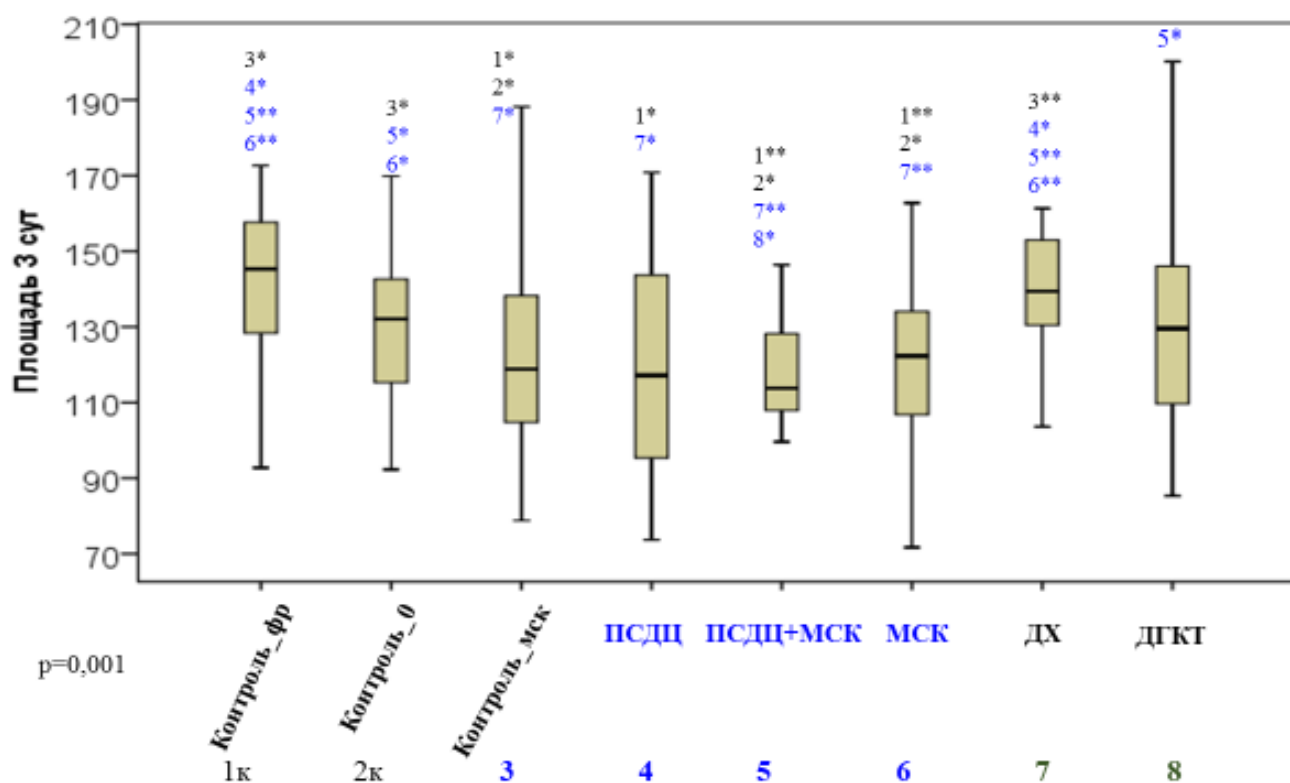
На 3 сутки исследования тест Дункана выделил по площади раны 3 гомогенные подгруппы: 1-я – «лучшая», 3-я – «худшая» и 2-я – «переходная». Лучшим образом на 3 сутки проявили себя раны тех же групп, что и на 1 сутки (ПСДЦ+МСК, Контроль_мск, МСК и ПСДЦ), однако только раны группы ПСДЦ+МСК были градируются только в эту подгруппу, остальные раны ранжированы и на «лучших» и на «средних». Поэтому раны группы ПСДЦ+МСК были по показателю площадь ран на 3 сутки значимо лучше всех групп, входящих в категорию «плохих» (3). В последовательности от наиболее к наименее худшему результаты эти группы расположились на 3 сутки так: ДХ > Кфр > К0 > ДГКТ. Группы ДГКТ и К0 были ранжированы в две подгруппы (средние и плохие результаты) (Таблица 19).

Тест ANOVA и апостериорные тесты выявили значимые множественные различия по показателю площадь ран на 3 сутки (Рисунок 19). Таким образом, на 3 сутки группы можно расположить следующим образом в последовательности (от худшего к лучшему): ДХ = Кфр > К0 > ДГКТ > ПСДЦ > Контроль_мск = МСК > ПСДЦ+МСК.

Таблица 19 - Площадь ран на 3 сутки исследования

	Подмножество для альфа = 0.05		
Группы	1	2	3
ПСДЦ+МСК	117,2354		
Контроль_мск	120,8177	120,8177	
МСК	121,1575	121,1575	
ПСДЦ	125,5867	125,5867	
ДГКТ		130,4464	130,4464
Контроль_0		135,9639	135,9639
Контроль_фр			141,6131
ДХ			142,2239
Значимость	0,092	0,052	0,125

Используется размер образца гармонического среднего = 30,897.

**Рисунок 19** - Показатель площадь ран на к исходу 3-х суток исследования в разных группах

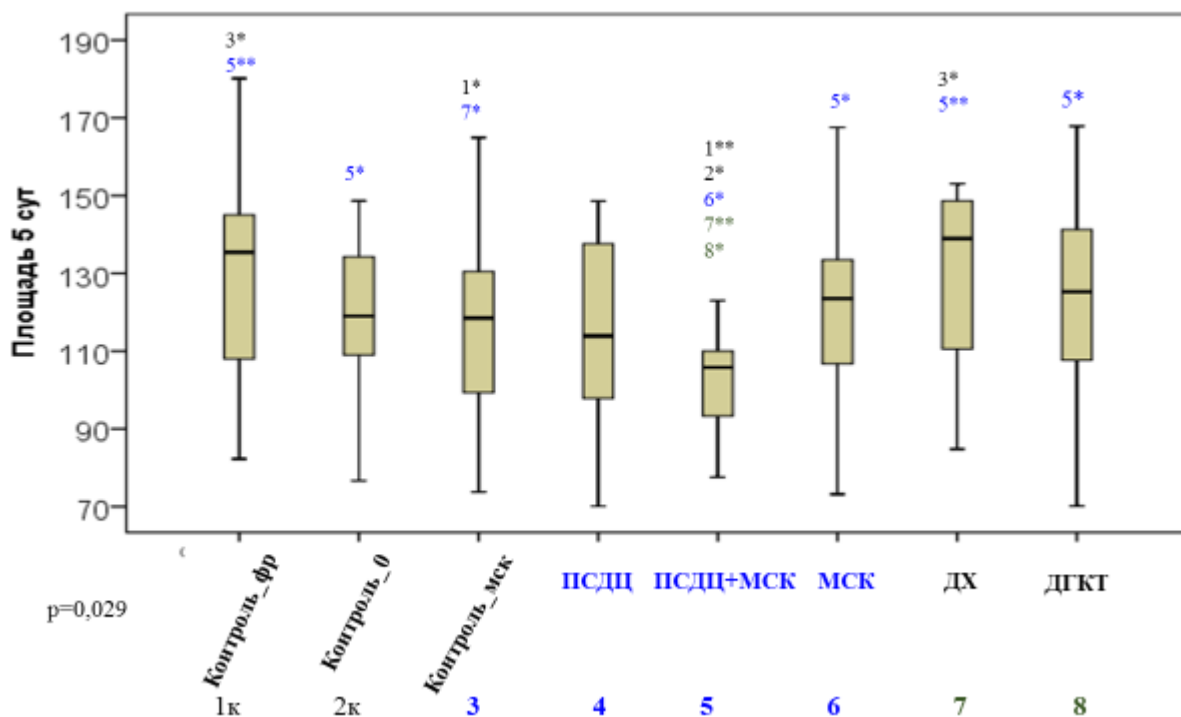
На 5 сутки исследования тест Дункана выделил по показателю площадь ран 2 гомогенные подгруппы, однако очередность групп промежуточного результата изменилась. Лучший результат остался у ран группы ПСДЦ+МСК, а худший результат был у групп Кфр, ДХ и ДГКТ. Остальные группы ран были переходными и ранжировались в обе подгруппы (Таблица 20).

Таблица 20 - Площадь ран на 5 сутки исследования

	Подмножество для альфа = 0.05	
Группы	1	2
ПСДЦ+МСК	104,5943	
Контроль_мск	115,1608	115,1608
МСК	119,7210	119,7210
Контроль_0	119,7581	119,7581
ПСДЦ	120,8968	120,8968
ДГКТ		122,2062
ДХ		130,7081
Контроль_фр		131,5973
Значимость	0,076	0,069

Использует размер образца гармонического среднего = 22,802.

Были выявлены значимые множественные различия по показателю площадь ран на 5 сутки (Рисунок 20).

**Рисунок 20** - Показатель площадь ран на к исходу 5-х суток исследования в разных группах.

Таким образом, к исходу 5-х суток группы можно расположить следующим образом в последовательности (от худшего к лучшему): ДХ = Кфр > ДГКТ > ПСДЦ = К0 = МСК > Контроль_мск > ПСДЦ+МСК.

На 7 сутки исследования тест Дункана выделил по показателю площадь ран 2 гомогенные подгруппы, без групп «переходных результатов». В лучшую группу вошли только раны группы ПСДЦ+МСК, которые отличались от всех остальных

групп по показателю площадь ран на 7 сутки исследования. Последние же не различались между собой (таблица 21, рисунок 21).

Таблица 21 - Площадь ран на 7 сутки исследования (Дункан тест)

группы	Подмножество для альфа = 0.05	
	1	2
ПСДЦ+МСК	78,4595	
Контроль_0		99,6890
ДГКТ		100,1743
ПСДЦ		100,5318
МСК		100,7276
Контроль_мск		102,2192
Контроль_фр		111,4812
ДХ		116,0948
Значимость	1,000	0,097
Использует размер образца гармонического среднего = 22,802		

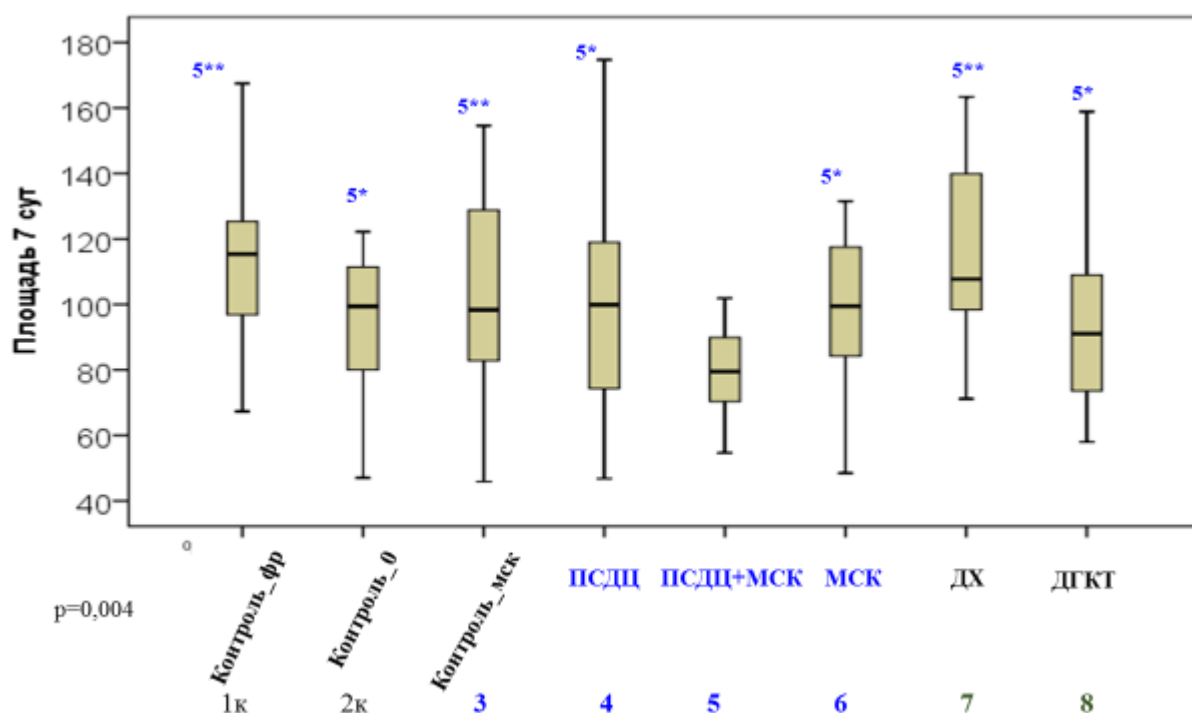


Рисунок 21 - Показатель площадь ран на к исходу 7-х суток исследования в разных группах.

На 14 сутки тест Дункана определил 4 подгруппы, что говорит о влиянии множества факторов на результат заживления ран к этому периоду. При этом наилучший результат был по-прежнему в группе ПСДЦ+МСК, а наихудший – в группах К0 и Кфр (таблица 22).

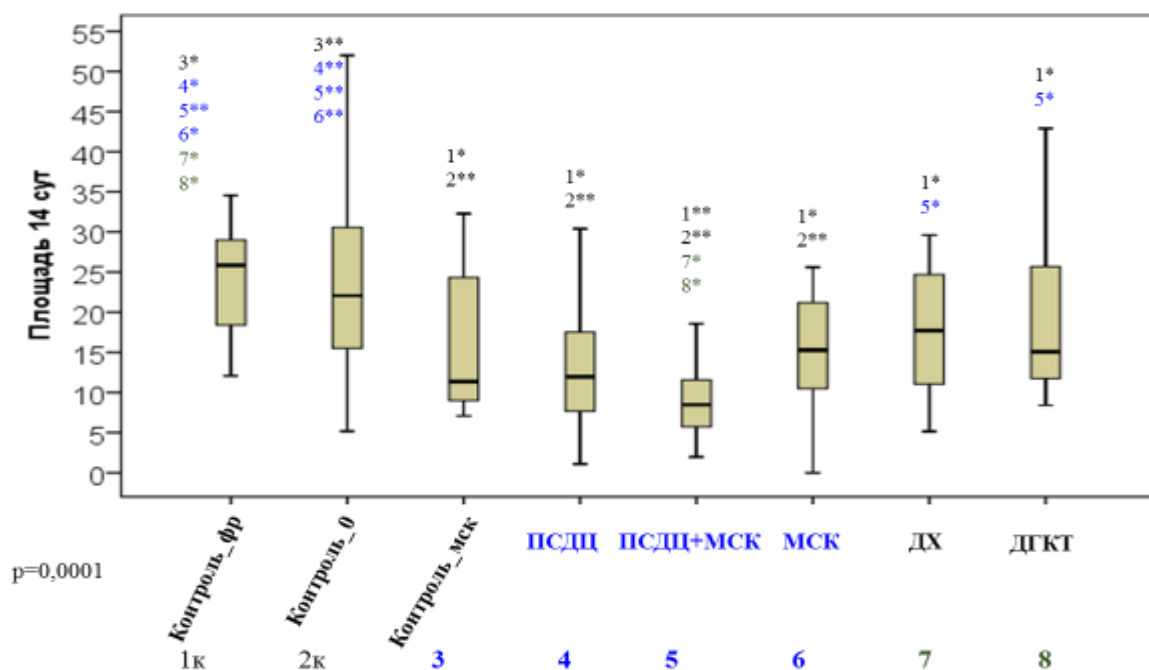
Таблица 22 - Площадь ран на 14 сутки исследования (Дункан тест)

	Подмножество для альфа = 0.05			
Группы	1	2	3	4
ПСДЦ+МСК	9,1350			
МСК	15,0886	15,0886		
Контроль_мск	15,1750	15,1750		
ПСДЦ	15,7414	15,7414		
ДХ	17,6314	17,6314	17,6314	
ДГКТ		19,2986	19,2986	19,2986
Контроль_0				24,8508
Контроль_фр				27,2364
Значимость	0,053	0,345	0,082	0,056

Использует размер образца гармонического среднего = 14,667.

К 14 суткам исследования раны групп МСК, Контроль_мск и ПСДЦ были отнесены и к 1-й, и ко 2-й подгруппам («хорошие» результаты). «Средние» результаты были установлены в группах ДХ (ранжированы в 1, 2, 3 подгруппах) и ДГКТ (отнесены в 2, 3 и 4 подгруппы). К «худшим» результатам на 14 сутки исследования были отнесены только раны контрольных групп, заживающих под струпом».

Были выявлены значимые множественные различия по показателю площадь ран на 14 сутки (рисунок 22).

**Рисунок 22** - Показатель площадь ран на к исходу 14-х суток исследования в разных группах.

Таким образом, на 14 сутки группы можно расположить следующим образом в последовательности показателя площадь ран (от худшего к лучшему): $K_{фр} > K_0 > ДГКТ = ДХ > ПСДЦ = \text{Контроль_мск} = МСК > ПСДЦ+МСК$.

3.2. Результаты исследования микрогемодициркуляции кожи по краям ран

Оценку динамики состояния микрогемодициркуляции выполняли по связанным выборкам у животных, выведенных из эксперимента на контрольной точке в сравнении с исходным показателем, измеренным на 0 сутки.

3.2.1. Состояние ран к исходу 3-х суток исследования

Было определено, что на 3 сутки исследования показатель микрогемодициркуляции в среднем (Me) в разных группах составил 96-199 ВРУ. Минимальный уровень показателя был в группе ПСДЦ+МСК. Показатель микрогемодициркуляции был максимальным на 3 сутки в группе ДХ, что было статистически значимо выше, чем в группах $K_{фр}$ (в среднем в 1,73 раза, $p < 0,05$), K_0 (в 1,49 раза, $p < 0,05$), Контроль_мск (в 1,56 раза, $p < 0,05$), ПСДЦ (в 1,66 раза, $p < 0,05$), ПСДЦ+МСК (в 2,07 раза, $p < 0,05$), МСК (тенденция, в среднем в 1,65 раза, $p = 0,081$ по тесту Бонферрони). Уровень гемодициркуляции на 3 сутки между группами ДХ и ДГКТ статистически не различался. В остальных группах к исходу 3-х суток статистически не отличался и в среднем (Me) составил 115-138 ВРУ (Таблица 23, Рисунок 23).

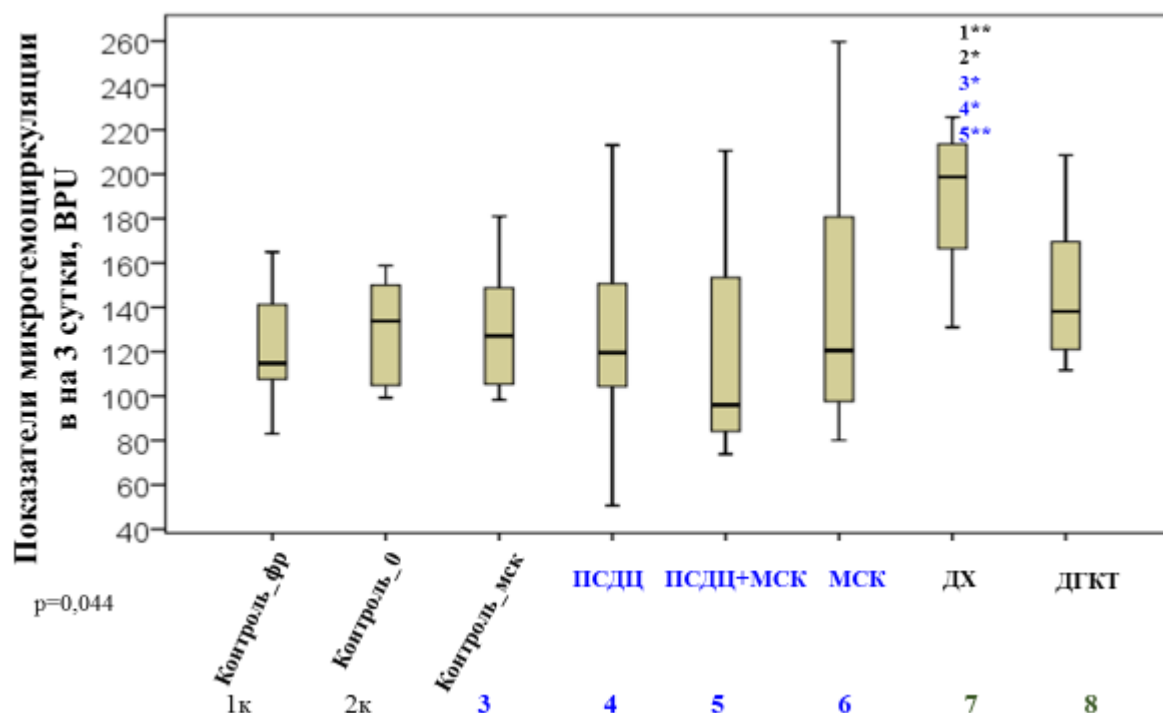


Рисунок 23 - Показатели микрогемоциркуляции в коже края ран на 3 сутки в ранах разных групп (BPU); *- $p < 0,05$, ** - $p < 0,05$ (апостериорные тесты при $p < 0,05$ по ANOVA).

Таблица 23 - Показатели микрогемоциркуляции на 0 и 3 сутки в коже края ран разных групп, BPU

Группа	0 сутки	3 сутки	Различия на 3 сутки (апостериорные тесты)
1 Контроль_фр	111,2 93,4/126,6	114,8 107,6/141,2	7**
2 Контроль_0	149,0 114,7/184,6	133,8 104,9/149,9	7*
3 Контроль_мск	144,9 115,0/179,2	127,2 105,4/148,8	7*
4 ПСДЦ	104,4 80,5/147,2	119,5 104,3/150,6	7*
5 ПСДЦ+МСК	120,9 79,2/127,9	96,0 84,1/153,4	7**
6 Стволовые клетки	127,0 110,1/141,7	120,6 97,7/180,7	-
7 ДХ	130,5 98,3/137,4	198,8 166,4/213,6	1** 2* 3* 4* 5**
8 ДГКТ	110,6 99,2/117,6	138,2 120,9/169,5	-
p (Kruskal – Wallis)	0,256	0,091	
ANOVA, p	0,114	0,044	
Примечания: Представлены медианы (1я строка) и квартили показателей (2я строка).			

Значимое увеличение показателя микрогемоциркуляции на 3 сутки относительно дня моделирования зарегистрировано только в 2-х группах: в

неинвазивной группе ДХ (в среднем в 1,52 раза с 131 ВРУ до 199 ВРУ, $p=0,028$ по критерию Вилкоксона) и в инвазивной группе ДГКТ (в среднем в 1,25 раза с 111 ВРУ до 138 ВРУ, $p=0,043$). В обеих группах ДГКТ и ДХ этот показатель увеличился в 86% ран (6 из 7 животных, выведенных из эксперимента на 3 сутки). Уровень объема перфузии кровью микрососудов в коже по краю раны был без статистически значимых изменений по сравнению с показателями 0 суток во всех остальных группах Кфр, К0, Контроль_мск, МСК, ПСДЦ, ПСДЦ+МСК. При этом отмечалась тенденция к снижению данного показателя в неинвазивных группах ран К0 (в среднем в 1,11 раза с 149 ВРУ до 134 ВРУ, $p>0,05$), Контроль_мск (в среднем в 1,11 раза с 145 ВРУ до 127 ВРУ, $p>0,05$) и ПСДЦ+МСК (в среднем в 1,26 раза с 121 ВРУ до 96 ВРУ, $p>0,05$), а также в инвазивной группе СК (в среднем в 1,05 раза с 127 ВРУ до 121 ВРУ, $p>0,05$). В группах ПСДЦ и Кфр разницы показателя микрогемоциркуляции, измеренного на 0 сутки и на 3 сутки зарегистрировано не было, при этом была тенденция к незначимому росту в среднем в 1,03 раза в группе Кфр и в 1,15 раза в группе ПСДЦ ($p>0,05$) (Рисунок 24).

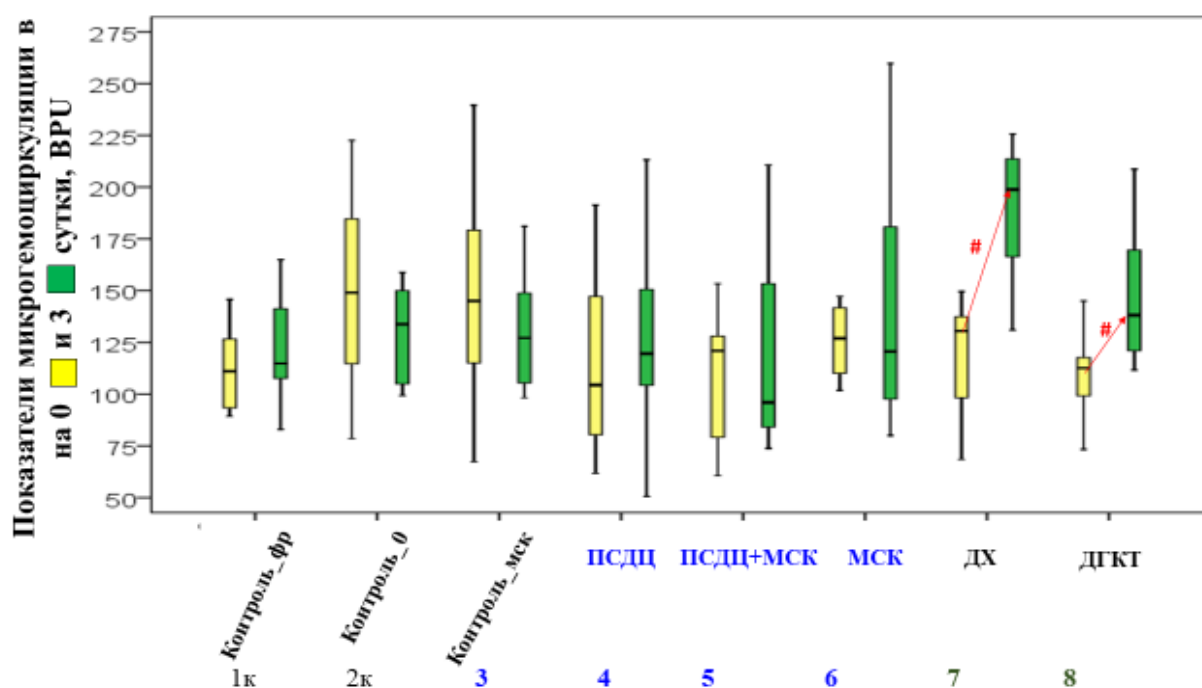


Рисунок 24 - Динамика микрогемоциркуляции на 0 и 3 сутки в ранах разных групп;
- различие динамики связанного показателя в пределах отдельной группы относительно дня 0 при $p<0,05$ (критерий Вилкоксона).

Корреляционный анализ выявил значимые взаимосвязи между показателем микрогемоциркуляции на 3 сутки с показателями процентного изменения размера ран относительно дня моделирования к исходу 1-х суток ($r=0,371$; $p<0,01$) и к исходу 3-х суток исследования ($r=0,268$; $p<0,05$). Следовательно, увеличение размера ран относительно 0 дня к концу 1-х и 3-х суток связано с увеличением уровня показателя микрогемоциркуляции, измененного в 3й день после ранения.

Таким образом, на 3 сутки уровень перфузии увеличился относительно дня 0 в ранах групп ДГКТ и, в наибольшей степени, ДХ. В итоге уровень микрогемоциркуляции по краю ран группы ДХ был значимо в 1,5-2,1 раза выше, чем во всех других группах.

Было высказано предположение, что изменение уровня микрогемоциркуляции в краях ран при применении разных препаратов связано с разными механизмами восстановления поврежденной ткани. Такое допущение подтверждалось и данными морфометрии.

Так, рост перфузии в ранах группы ДХ может быть обусловлен местно раздражающим действием компонентов этого препарата, а в группах ДГКТ – сосудистым эффектом (метаболическое и микроциркуляторное фармакологическое действие).

Увеличение объема гемоперфузии по краю ран на 3 сутки относительно 0 дня коррелирует с увеличением размеров ран и является ранним прогностически неблагоприятным маркером процессов заживления ран.

3.2.2. Состояние ран к исходу 7-х суток исследования

На 7 сутки исследования показатель микрогемоциркуляции в среднем (M_e) в разных группах составил 125,1-185,2 ВРУ (минимальный уровень был в группе ДГКТ, максимальный – в группе ПСДЦ (Таблица 24).

Таблица 24 - Показатели микрогемоциркуляции на 0 и 7 сутки в коже края ран разных групп, ВРУ

Группа	0 сутки	7 сутки	p (критерий Вилкоксона)
1 Контроль_фр	132,8 121,2/144,2	133,4 128,8/147,4	0,398
2 Контроль_0	158,8 131,0/199,8	176,6 128,3/192,0	0,866
3 Контроль_мск	146,1 97,3/165,2	176,7 162,0/221,4	0,019 #
4 ПСДЦ	117,4 77,9/134,0	182,5 150,1/195,2	0,014 #
5 ПСДЦ+МСК	96,0 89,1/110,8	164,5 149,5/175,1	0,036 #
6 Стволовые клетки	115,9 100,6/124,4	158,3 140,5/211,0	0,018 #
7 ДХ	109,3 97,4/145,6	167,0 135,4/188,6	0,063
8 ДГКТ	110,4 105/7/118,6	125,1 110,9/160,3	0,091
p (Kruskal – Wallis)	0,140	0,173	Все группы, крит. Фридмана p=0,0001
ANOVA, p	0,473	0,323	
Примечания: Данные представлены в виде медианы (первая строка) и квартилей 25% / 75% (вторая строка). # - различие динамики связанного показателя в пределах отдельной группы относительно дня 0 при p<0,05 (критерий Вилкоксона).			

Отсутствие достоверного значимого различия при сравнении показателя по тестам Kruskal – Wallis и ANOVA говорит о сопоставимом уровне микроперфузии на 7 сутки во всех исследуемых группах и не позволяет обоснованно проводить парные сравнительные анализы.

По критерию Фридмана получена достоверная асимптотическая значимость динамики уровня микрогемоциркуляции во общей оценке во всех группах ($\chi^2 = 21,06$; p=0,0001).

При анализе динамики микрогемоциркуляции в каждой группе по критерию Вилкоксона были установлены статистически значимые различия, свидетельствующие о выраженном росте объема микроперфузии на коже краев раны в неинвазивных группах Контроль_мск (в среднем в 1,21 раза с 146 ВРУ до 177 ВРУ, p<0,05), ПСДЦ (в 1,56 раза с 117 ВРУ до 183 ВРУ, p<0,05), ПСДЦ+МСК (в 1,72 раза с 96 ВРУ до 165 ВРУ, p<0,05), а также в инвазивной группе МСК (в

среднем в 1,36 раза с 116 ВРУ до 158 ВРУ, $p < 0,05$). Объем микрогемоперфузии статистически не изменился на 7 день и был такой же, как и в день моделирования в обеих контрольных группах (К0 и Кфр). В группах ДХ и ДГКТ установлена тенденция к росту данного показателя в среднем в 1,13 раза и в 1,53 раза соответственно (Рисунок 25).

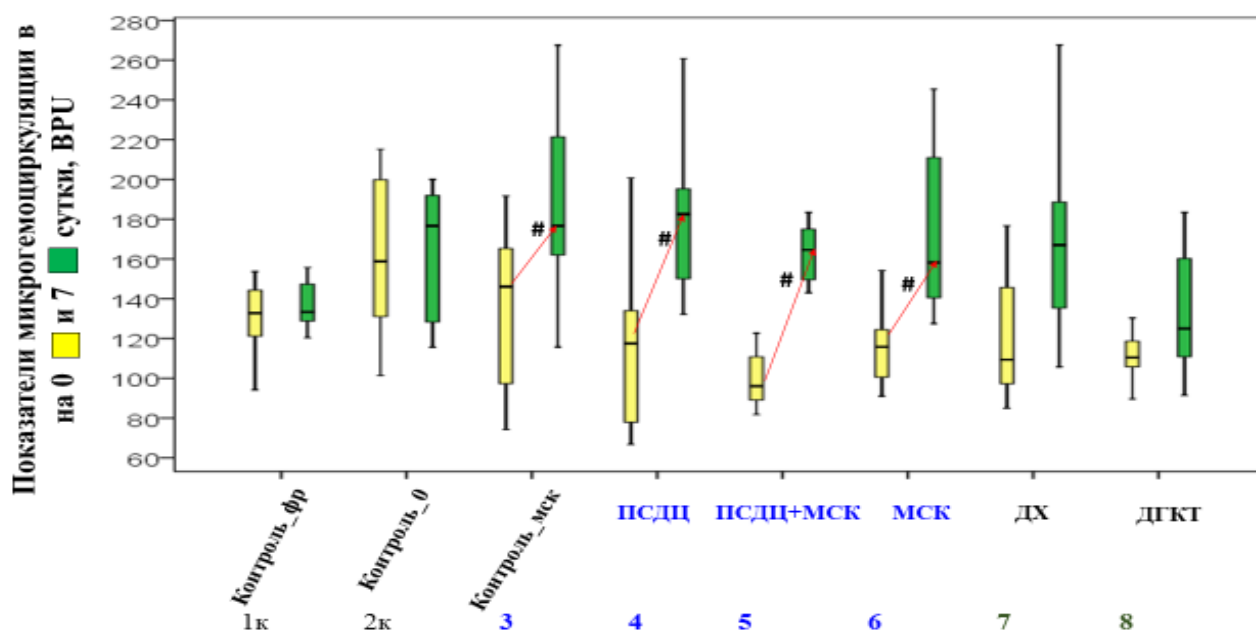


Рисунок 25 - Динамика микрогемоперфузии на 0 и 7 сутки в ранах разных групп;
- различие динамики связанного показателя в пределах отдельной группы относительно дня 0 при $p < 0,05$ (критерий Вилкоксона).

Корреляционный анализ между показателями площадь ран и уровнем микрогемоперфузии на 7 с утки не выявил значимых взаимосвязей силой выше 0,2.

Таким образом, на 7 сутки уровень перфузии не менялся относительно 0 дня в контрольных ранах и увеличился в ранах, которых лечили с использованием прогениторных клеток (МСК и Контроль_мск в 1,2-1,4 раза) и в наибольшей степени полимерных средств (ПСДЦ+МСК и ПСДЦ в 1,6-1,7 раза).

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 микрогемоперфузии, установленного на 0 сутки.

3.2.3. Состояние ран к исходу 14-х суток исследования

На 14 сутки исследования показатель микрогемоциркуляции увеличился относительно дня моделирования во всех группах ран и в среднем (Me) в разных группах составил 156,5-214,5 ВРУ (минимальный уровень был в группе ПСДЦ, максимальный – в контрольных группах) (Таблица 25). В среднем по всем ранам этот показатель на 14 сутки был наивысшим по сравнению с предыдущими точками исследования.

Таблица 25 - Показатели микрогемоциркуляции на 0 и 14 сутки в коже края ран разных групп, ВРУ

Группа	0 сутки	14 сутки	p (критерий Вилкоксона
1 Контроль_фр	128,9 102,9/134,5	211,0 201,0/263,5	0,018 #
2 Контроль_0	141,0 121,5/186,9	214,5 169,7/241,0	0,116
3 Контроль_мск	139,4 111,6/196,0	162,0 131,7/182,5	0,735
4 ПСДЦ	105,2 67,4/129,0	156,5 128,6/167,3	0,012 #
5 ПСДЦ+МСК	104,2 92,6/113,2	178,1 135,0/215,1	0,043 #
6 Стволовые клетки	129,3 107,4/162,6	167,8 156,4/213,9	0,345
7 ДХ	122,9 112,4/132,7	203,9 186,4/224,1	0,018 #
8 ДГКТ	103,0 92,7/136,4	208,0 148,1/220,5	0,016 #
p (Kruskal – Wallis)	0,049	0,011	Все группу, крит. Фридмана p=0,0001
ANOVA, p	0,029	0,008	
Данные представлены в виде медианы (первая строка) и квартилей 25% / 75% (вторая строка). # - различие динамики связанного показателя в пределах отдельной группы относительно дня 0 при p<0,05 (критерий Вилкоксона).			

Выявленные значимые различия при сравнении данного показателя, полученного на 14 сутки исследования, по тестам Kruskal–Wallis и ANOVA обосновывает проведение дальнейших статистических сравнений. Показатель микрогемоциркуляции был максимальным в группах (Кфр и К0), между которыми

различий не было. В группе Кфр объем гемоперфузии по краю раны на 14 утки в среднем составил 211 ВРУ, что было статистически значимо выше, чем в группах Контроль_мск (в среднем в 1,30 раза, $p<0,05$), ПСДЦ (в 1,35 раза, $p<0,05$), ПСДЦ+МСК (в 1,19 раза, $p<0,05$) и МСК (в 1,26 раза, $p<0,05$). В группе К0 объем гемоперфузии по краю раны на 14 сутки в среднем составил 214,5 ВРУ, что было статистически значимо выше, чем в группах Контроль_мск (в среднем в 1,32 раза, $p<0,05$), ПСДЦ (в 1,37 раза, $p<0,05$), СК (в 1,28 раза, $p<0,05$).

Различий показателя гемоперфузии на 14 сутки между контрольными группами и ранами групп ДХ и ДГКТ не было выявлено. В последних объем гемоперфузии на коже вокруг ран был на одинаково высоком уровне, в среднем (Me) 204-208 ВРУ. При этом определено статистически значимое различие показателя микрогемоциркуляции между группами ПСДЦ и ДХ, демонстрирующее превосходство в последней группе в среднем в 1,30 раза ($p<0,05$) (Рисунок 26).

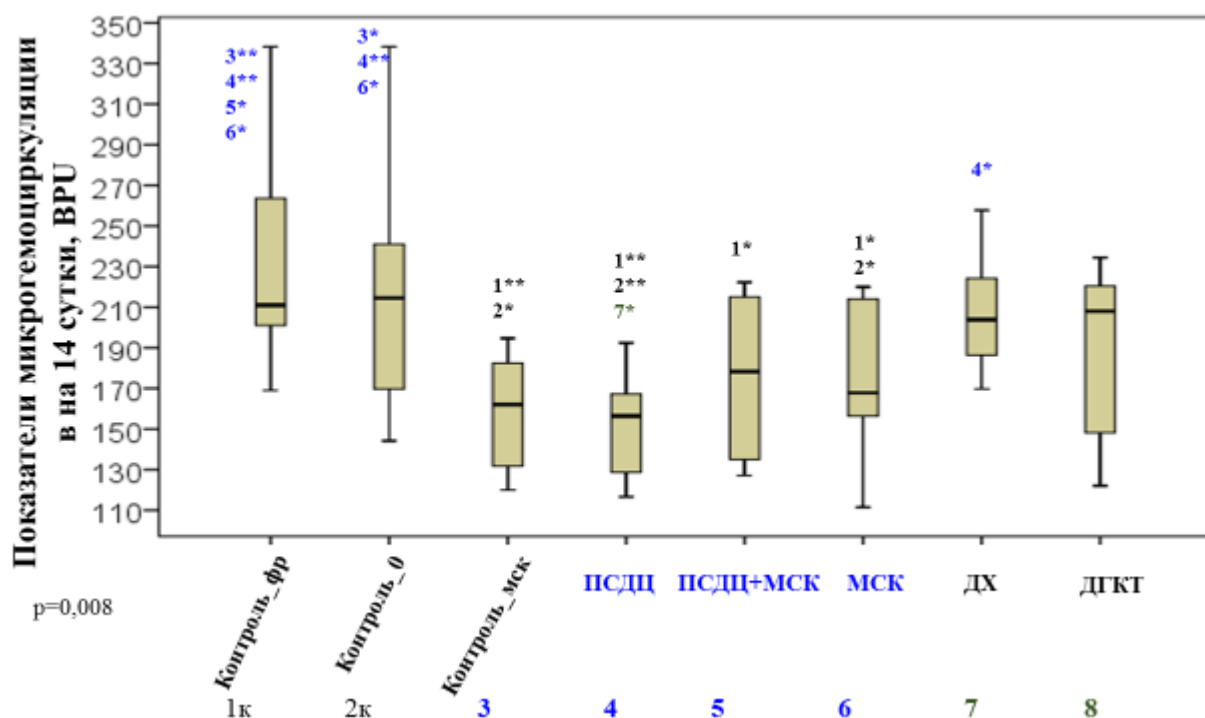


Рисунок 26 - Показатели микрогемоциркуляции в коже края ран на 14 сутки в ранах разных групп (ВРУ); *- $p<0,05$,**- $p<0,05$ (апостериорные тесты при значимости $p<0,05$ по ANOVA).

По критерию Фридмана получена достоверная асимптотическая значимость динамики уровня микрогемоциркуляции при общей оценке всех групп ($\chi^2 = 21,41$; $p=0,0001$).

При анализе динамики микрогемоциркуляции в каждой группе по критерию Вилкоксона были установлены статистически значимые различия, свидетельствующие о выраженном росте объема микроперфузии на коже краев раны к 14 суткам в неинвазивных группах ПСДЦ (в среднем в 1,49 раза с 105 ВРУ до 157 ВРУ, $p<0,05$), ПСДЦ+МСК (в 1,71 раза с 104 ВРУ до 178 ВРУ, $p<0,05$) и ДХ (в 1,66 раза с 123 ВРУ до 204 ВРУ, $p<0,05$), а также в инвазивных группах ран Кфр (в 1,64 раза с 129 ВРУ до 211 ВРУ, $p<0,05$) и, в наибольшей степени, группе ДГКТ (в среднем в 2,02 раза с 103 ВРУ до 208 ВРУ, $p<0,05$). Не было значимых связанных различий динамики данного показателя на 0 и 14 сутки только в группах К0, а также в группах ран, лечение которых выполняли с использованием прогениторных клеток (Контроль_мск и МСК), хотя незначительная тенденция к росту объема гемоперфузии в среднем в 1,2-1,5 раза в этих группах также определялась (Рисунок 27).

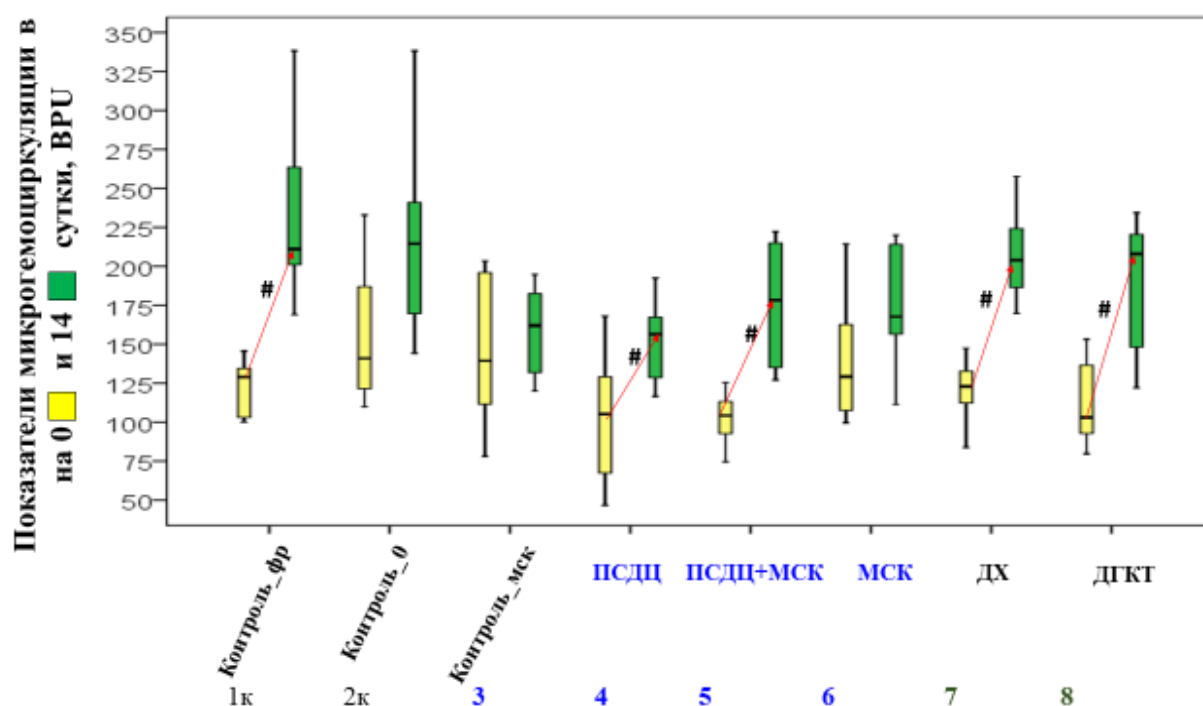


Рисунок 27 - Динамика микрогемоциркуляции на 0 и 14 сутки в ранах разных групп; # - различие динамики связанного показателя в пределах отдельной группы относительно дня 0 при $p<0,05$ (критерий Вилкоксона).

Корреляционный анализ выявил значимые прямые взаимосвязи умеренной силы между показателем микрогемоциркуляции на 14 сутки и показателями площадь ран на 14 сутки ($r=0,403$; $p<0,01$), а также уровнем микрогемоциркуляции

и процентным изменением размера ран к 14 суткам исследования ($r=0,377$; $p<0,01$). Следовательно, чем больше был размер раны на 14 сутки, тем выше был объем гемоперфузии. И, наоборот, низкий уровень перфузии ткани края ран на 14 сутки приводит к ускорению процессов заживления ран.

Таким образом, 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 рана 14 сутки был в нелеченных контрольных ранах К0 и Кфр, превосходя в среднем в 1,2-1,4 раза таковой в группах Контроль_мск, МСК, ПСДЦ+МСК и ПСДЦ (в этих группах показатель микрогемоциркуляции на 14 сутки был наименьшим), не отличаясь при этом от ран групп ДГКТ и ДХ.

Высокий уровень гемоперфузии на 14 сутки коррелирует с наибольшим размером ран в этот период, а низкий уровень перфузия ткани края ран взаимосвязан с ускорением темпов регенерации и может служить маркером оптимистичного результата.

3.3. Результаты морфологического и гистологического исследования

3.3.1. Состояние ран к исходу 3-х суток исследования

При анализе гистологической картины в ткани всех ран животных, выведенных из эксперимента на 3 сутки, были установлены такие признаки экссудативного воспаления как: расширение и полнокровие кровеносных сосудов, отечность тканей вплоть до подкожной жировой клетчатки, эмиграция лейкоцитов из кровеносного русла и инфильтрация ими грануляций. Морфометрически к исходу 3-х суток число привлеченных в поврежденные ткани лейкоцитов значимо превосходило концентрацию фибробластов в среднем в 1,75-2,33 раза в ранах

разных групп ($p < 0,05$). Причем число лейкоцитов в 1 мм^2 ткани ран было в 1,19-1,85 раза больше, чем в краях ран. Это свидетельствует об активности процесса экссудативного воспаления.

Однако фаза экссудативного воспаления протекала по-разному, о чем свидетельствуют данные анализа количества лейкоцитов в ткани центра и краев ран разных групп к исходу 3-х суток исследования. При анализе всех 8 изучаемых нами групп по критерию Kruskal - Wallis были установлены различия по таким показателям как: абсолютное количество лейкоцитов на 1 мм^2 ткани центра ран ($p = 0,014$), в крае ран ($p = 0,001$) и в среднем по ране ($p = 0,001$), позволило выполнить анализ ANOVA, который также установил значимые различия между группами по лейкоцитарной инфильтрации, а также апостериорные тесты, выявившие множественные различия во всех группах ран, что демонстрировало, в целом, противовоспалительный эффект стволовых клеток и полимерных препаратов. В ранах этих групп число лейкоцитов на единицу площади ткани было меньше, чем в других группах, однако активность лейкоцитов при этом была на высоком уровне (таблица 26).

Таблица 26 - Число и доля лейкоцитов в центре и краях ран к исходу 3-х суток в разных группах (абс. и % на 1 мм^2 ткани раны)

Отдел раны	Центр		Край	
Группы	Абс.	%	Абс.	%
Контроль_фр	210 206 : 217	63,8 63,0:66,8	176 163 : 181	62,6 62,1:63,8
Контроль_0	197 189:241	62,9 62,4:66,9	159 145:229	78,3 77,5:80,6
Контроль_мск	229 189:263	64,3 60,1:67,0	176 151:188	70,8 69,2:75,4
ПСДЦ	184 172:247	62,1 56,5:70,4	118 112:144	72,6 58, :80,8
ПСДЦ+МСК	168 139:176	61,2 57,8:66,3	91 77:105	79,7 55,5:81,1
Стволовые клетки	180 167 : 183	64,6 60,4:65,6	130 102 : 139	83,9 73,6:89,0
ДХ	209 205:228	63,4 59,9:69,0	128 84:238	60,4 50,6:72,6
ДГКТ	203 195 : 226	66,8 63,7:67,0	114 108 : 145	58,6 57,5:60,6
Kruskal - Wallis test	0,014*	0,907	0,001**	0,015*

Число лейкоцитов в ткани дна ран было наименьшим в группах ПСДЦ+МСК (Me = 168 лейкоцитов/мм²), МСК (Me = 180 лейкоцитов/мм²), а также ПСДЦ (Me = 184 лейкоцитов/мм²). Между собой эти группы по лейкоцитарной инфильтрации центра ран не отличались ($p>0,05$). Однако самым низким данный показатель был на 3 сутки в группе ПСДЦ+МСК, статистически значимо отличаясь от контрольных групп (Кфр, К0 и Контроль_мск) в среднем в 1,17-1,36 раза ($p<0,05$), от группы ДХ - в 1,24 раза ($p<0,05$), от группы ДГКТ - в 1,21 раза ($p<0,05$). Число лейкоцитов в центре ран группы МСК статистически отличалось только от групп Кфр (в среднем в 1,17 раза, $p<0,05$), Контроль_мск (в среднем в 1,27 раза, $p<0,05$) и ДХ (в среднем в 1,16 раза, $p<0,05$). Группа ПСДЦ по данному показателю занимала промежуточное положение и не отличалась статистически от любых других групп (Рисунок 28).

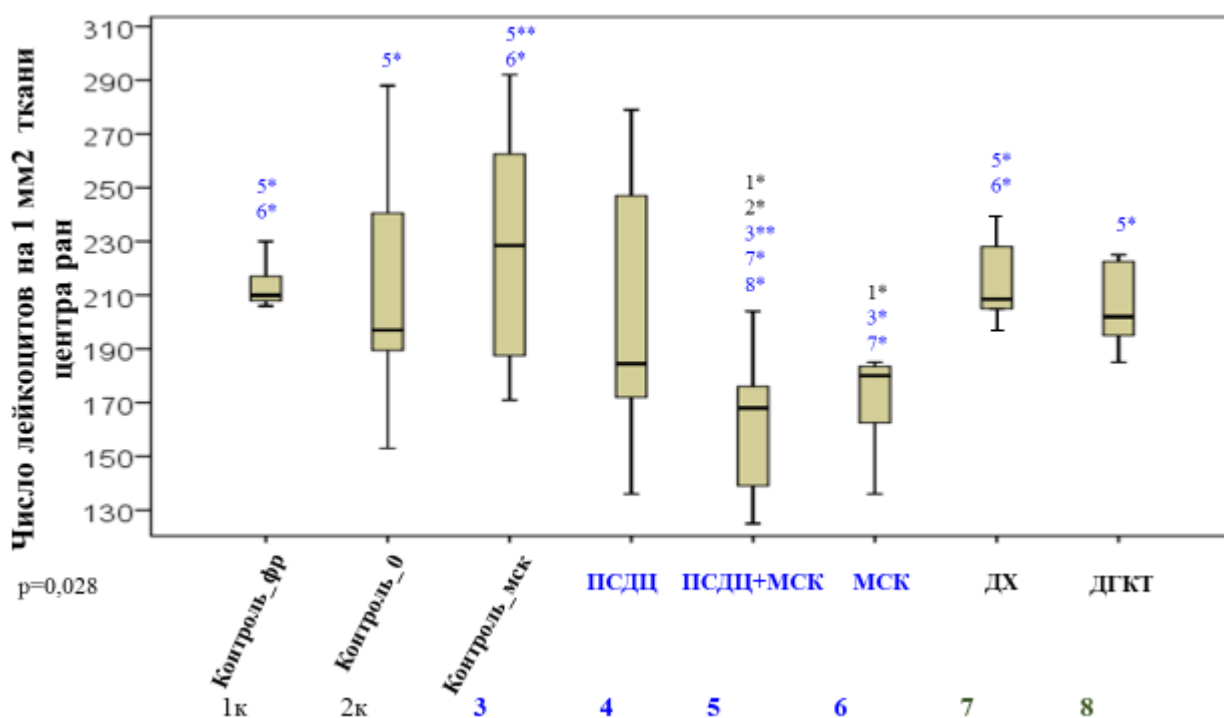


Рисунок 28 - Число лейкоцитов в ткани центра ран в разных группах на 3 сутки исследования (количество лейкоцитов на 1 мм²). Значимость межгрупповых различий по апостериорным тестам: * - $p<0,05$, ** - $p<0,01$.

Несмотря на наличие статистически значимых различий по показателю абсолютное число лейкоцитов в центре ран разных групп, их доленое содержание в дне ран не отличалось в группах, составив в среднем (Me) 61,2%-66,8% ($p>0,05$).

Столь стабильный процент может быть связан с одинаковым объемом фибриновой массы в центре стандартизированных ран на 3 сутки.

Численное представительство лейкоцитарных клеток было выше в центре ран (по сравнению с краями ран) во всех группах в среднем в 1,2-1,9 раза ($p < 0,05$). Наибольшая разница этого показателя была установлена в группах ПСДЦ+МСК (в 1,85 раза клеток больше в центре ран), МСК (1,56 раза), ДХ (1,63 раза) и ДГКТ (1,78 раза); а наименьшее различие было в группах Контроль_мск (в среднем в 1,30 раза) и Кфр (1,19 раза).

При этом в тканях краев ран на 3 сутки исследования сохранились выявленные в центре ран особенности. Так, наименьшее число лейкоцитов в ткани края ран на 3 сутки было установлено в группах с локальным применением прогениторных клеток. В группе ПСДЦ+МСК содержание лейкоцитов было самым низким и составило в среднем (Me) 91 лейкоцитов/ мм^2 , что значимо отличало эту группу от всех контрольных групп (от групп Кфр в 1,93 раза, К0 в 1,74 раза; $p < 0,05$), а также от групп Контроль_мск в среднем в 1,93 раза ($p < 0,05$), ДХ в 1,41 раза ($p < 0,05$). Наибольшее число лейкоцитов в краях ран на 3 сутки было установлено в группах Кфр и Контроль_мск (Me = 176 лейкоцитов/ мм^2), а также в группе К0 (Me = 159 лейкоцитов/ мм^2), что было статистически значимо было больше, чем в группах ПСДЦ, ПСДЦ+МСК, МСК и ДГКТ ($p < 0,05$) (Рисунок 29).

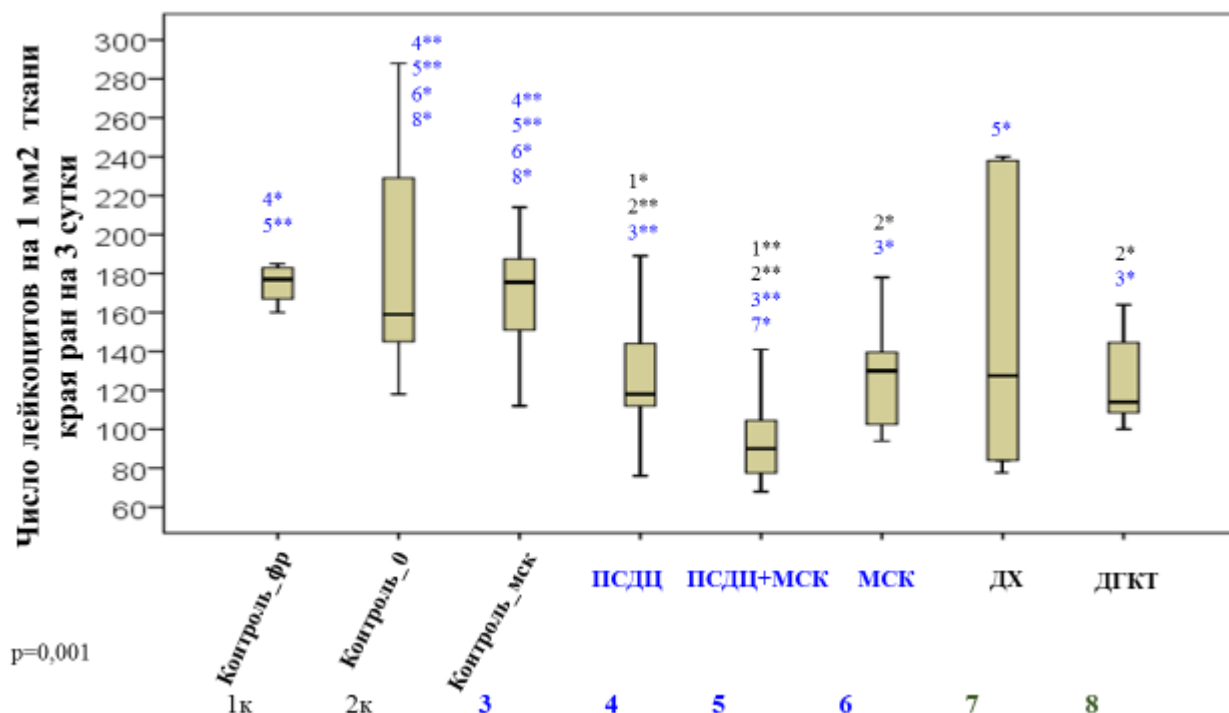


Рисунок 29 - Число лейкоцитов в ткани краев ран разных групп на 3 сутки исследования (количество лейкоцитов на 1 мм²). Значимость межгрупповых различий по апостериорным тестам: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$.

В отличие от дна ран, в краях ран процентное содержание лейкоцитарных клеток на единицу ткани ран на 3 сутки исследования статистически различалось в разных группах. Медианы данного показателя различались до 25,3% (в 1,43 раза), варьируя от 58,6% до 83,9% ($p < 0,05$). Наименьший процент лейкоцитов в тканях края ран был в группах ДГКТ (Me = 58,6%), ДХ (Me = 60,4%) и Кфр (Me = 62,6%), т.е. в ранах с наибольшей площадью. А наибольший процент лейкоцитов в тканях края ран был в группах ПСДЦ+МСК (Me = 79,7%) и МСК (Me = 83,9%), т.е. в ранах с наименьшей площадью.

В среднем процент лейкоцитов в краях ран на 3 сутки был больше, чем в центре ран в группах МСК (в 1,30 раза, $p < 0,05$) и К0 (в 1,24 раза, $p < 0,05$), а также тенденция в группах ПСДЦ+МСК (в 1,30 раза, $p > 0,05$), ПСДЦ (в 1,17 раза, $p > 0,05$) и Контроль_мск (в 1,10 раза, $p > 0,05$). Процентное содержание лейкоцитов в краях и центре ран групп Кфр, ДХ, ДГКТ было одинаковым на 3 сутки (Рисунок 30).

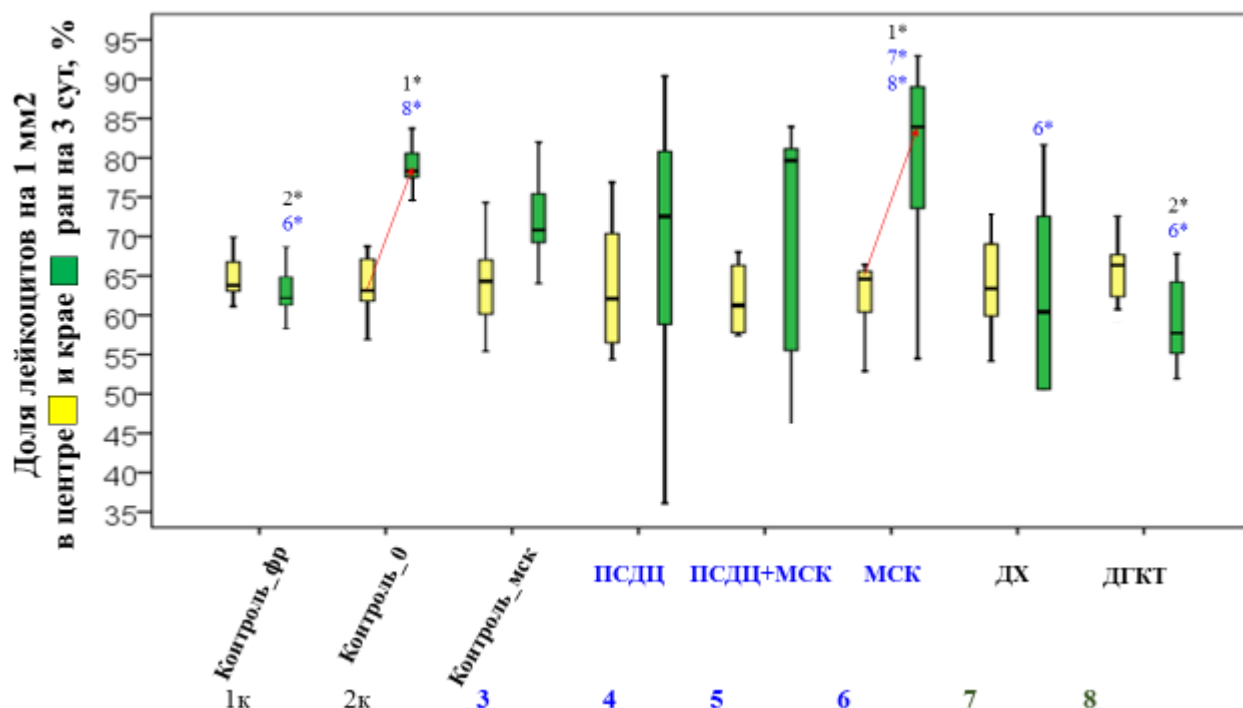


Рисунок 30 - Доля лейкоцитов в ткани центра (желтый) и края ран (зеленый) разных групп на 3 сутки исследования (в %). Значимость межгрупповых различий по апостериорным тестам при $p < 0,05$; стрелками указано значимое различие показателя в центре и крае раны в пределах одной группы при $p < 0,05$.

Учитывая важность участия лейкоцитов в экссудативной фазе воспаления и своевременный переход этой фазы в пролиферацию нами был проанализирован усредненный показатель лейкоцитарной инфильтрации в среднем по всем отделам ран. Установлено, что средняя концентрация (число) лейкоцитов в ранах групп МСК, ПСДЦ+МСК и ПСДЦ была наименьшей, демонстрируя противовоспалительный механизм ранозаживляющего действия у стволовых клеток и, в несколько меньшей степени, полимерных соединений. Показатель количества лейкоцитов на 1 мм^2 в среднем по ране в порядке возрастания распределился следующим образом (от минимального к максимальному): ПСДЦ+МСК – МСК – ПСДЦ – ДГКТ – ДХ – Контроль_мск – Кфр – К0. Все три последние контрольные группы статистически значимо отличались от групп ПСДЦ+МСК, МСК и ПСДЦ, превосходя их по данному показателю в среднем в 1,17-1,32 раза ($p < 0,05$). Помимо этого, лейкоцитарное содержание в ранах группы ДХ было в среднем в 1,19 раза больше, чем в группах МСК или ПСДЦ+МСК

($p < 0,05$), а в группе ДГКТ оно превышало в 1,17 раза таковое группы ПСДЦ+МСК ($p < 0,05$) (Рисунок 31).

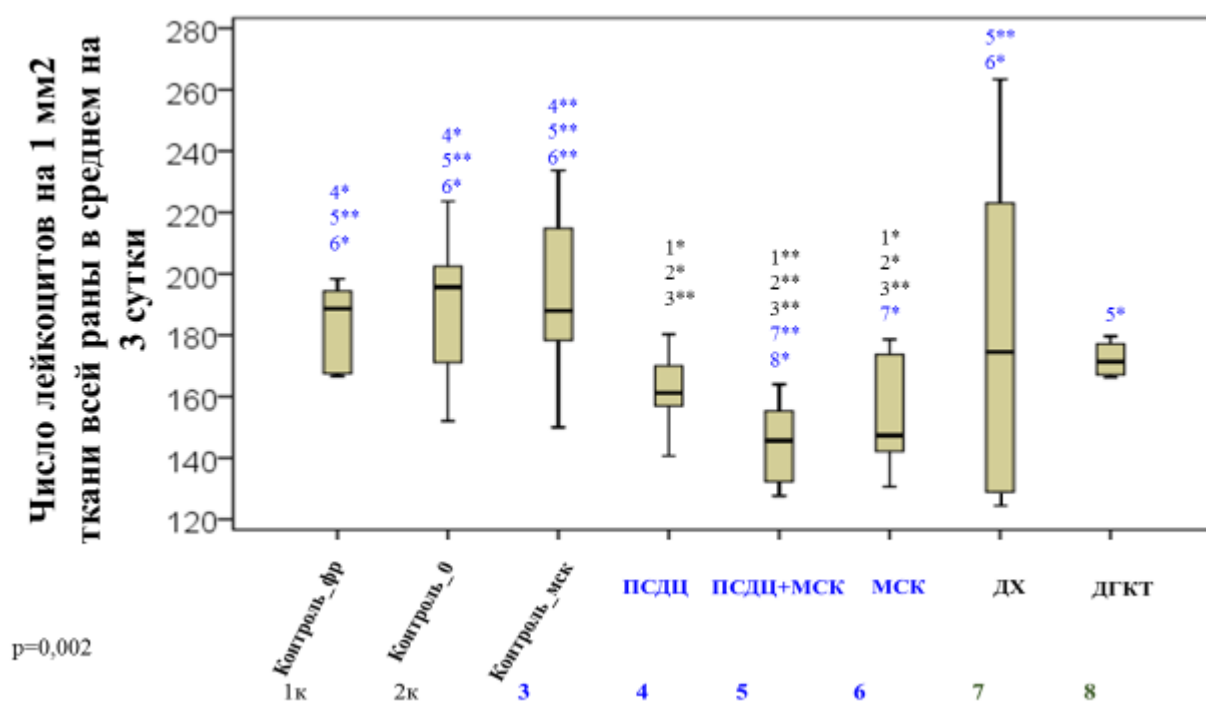


Рисунок 31 - Показатель количество лейкоцитов на 1 мм² ткани раны в среднем по разным отделам раны во всех группах (значимость межгрупповых различий по апостериорным тестам: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$).

Однако низкое относительно ран других групп число лейкоцитов не означало их низкое доленое содержание или их меньшую активность. В среднем по ране именно в группе МСК процентное содержание лейкоцитов было наибольшим (Me=73,9%). На втором месте по долевному содержанию лейкоцитов в тканях ран на 3 сутки были раны групп Контроль_мск и К0 (в среднем 71,8% и 72,5% соответственно). Группы ПСДЦ+МСК и ПСДЦ по данному показателю занимали промежуточное положение. Самый низкий процент содержания лейкоцитов в среднем по разным отделам раны был в группах ДХ (Me=66,7%), ДГКТ (Me=65,5%) и К0 (Me=64,8%) (Рисунок 32).

Увеличение размеров ран на 3 сутки морфологически сочеталось с повышением числа лейкоцитов, особенно в ткани центра ран. Установлены прямые корреляционные связи между показателем площадь ран на 3 сутки и общим числом лейкоцитов на 3 сутки в ткани центра ран ($r=0,266$; $p < 0,05$), с процентом

содержания лейкоцитов в центре ран ($r=0,247$; $p<0,05$), а также с общим числом разных клеток в центре ран ($r=0,242$; $p<0,05$).

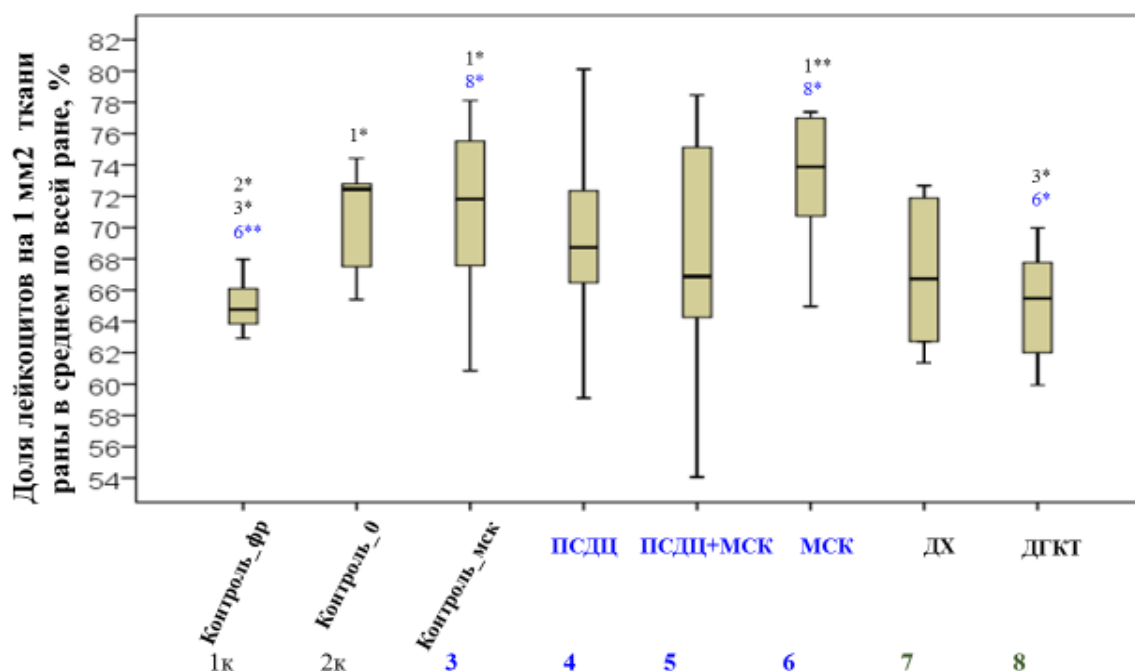


Рисунок 32 - Процентное содержание лейкоцитов на 1 мм² ткани раны в среднем по разным отделам раны во всех группах (Kruskal - Wallis test: $p=0,030$. ANOVA: $F=2,19$; $p=0,048$. Значимость межгрупповых различий по апостериорным тестам: * - $p<0,05$, ** - $p<0,01$).

Следовательно, максимальная лейкоцитарная инфильтрация ткани дна ран к 3 суткам может служить маркером сохраняющегося острого воспаления и причиной возможного замедления процесса репарации ран. И, наоборот, меньшая концентрация лейкоцитарных клеток в тканях ран на 3 суток может быть маркером ускоренного перехода экссудации в пролиферацию и лучшего заживления ран.

Число клеток **фибробластного дифферона на 3 сутки** исследования в тканях ран всех групп было статистически значимо меньше, чем лейкоцитов (различие в 1,8-2,3 раза в разных группах, $p<0,05$). Наибольшее различие было установлено в группах МСК (в среднем в 2,33 раза лейкоцитарных клеток было больше, чем фибробластов), К0 (в 2,32 раза), ДХ (в 2,29 раза) и Контроль_мск (в 2,16 раза). В группах ПСДЦ+МСК и ПСДЦ данный показатель занимал промежуточное положение (в среднем в 2,03 раза и 2,04 раза соответственно). Меньшее различие, но также достоверное было зарегистрировано в группах ДГКТ (1,99 раза) и Кфр

(1,75 раза). Все это вновь подтверждает наибольшую роль лейкоцитарных клеток на 3 сутки раневого процесса (Рисунок 33).

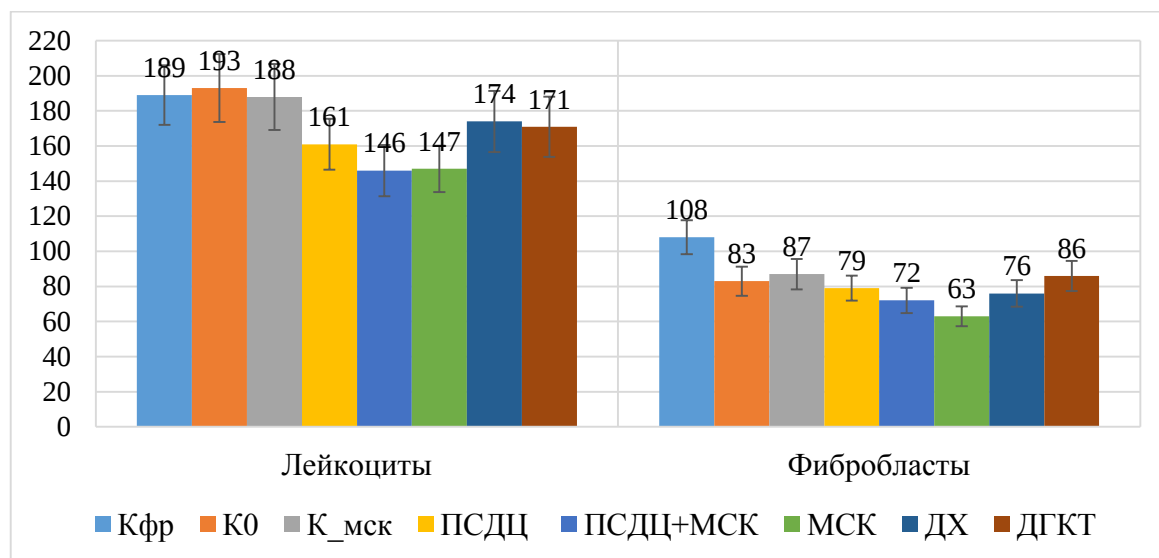


Рисунок 33 - Число лейкоцитов и фибробластов в тканях разных отделов ран разных групп на 3 сутки исследования (в среднем, абс.)

Число фибробластов в тканях центра ран было в среднем в 1,09-5,44 раза больше, чем в краях ран, достоверно различаясь во всех группах кроме Кфр. Так, в ткани центра ран группы Кфр фибробласты были в таком же количестве, что и в краях ран (в среднем 117 и 107 фибробластов на мм² в дне и в крае ран, соответственно, $p > 0,05$). Наибольшее различие было зарегистрировано в группе МСК (в среднем 98 и 18 фибробластов на мм² ран в дне и в крае ран, соответственно, $p < 0,05$). Последовательность групп при анализе показателя отношения концентрации фибробластов в центре и краях ран (от меньшей разницы к большему) выглядит следующим образом: Кфр (1,09 раза) > ДХ (1,37 раза) = ДГКТ (1,46 раза) > Контроль_мск (1,83 раза) > ПСДЦ (2,18 раза), К0 (2,53 раза) > ПСДЦ+МСК (3,96 раза) > МСК (5,44 раза).

Отсутствие значимости различия при сравнении обеих показателей числа и доли фибробластов в центре ран во всех 8 группах по критерию Краскел-Уоллиса ($p > 0,05$), не позволяет обоснованно проводить перекрестное погрупповое сравнение, а также еще раз подчеркивает большую значимость лейкоцитов на 3 сутки после моделирования ран. В то же время в краях ран установлены значимые

различия по критерию Краскел-Уоллиса как по показателю абсолютного числа фибробластов ($p < 0,05$), так и по их долевого содержанию в краях ран на 3 сутки ($p < 0,05$) (Таблица 27).

Таблица 27 - Число и доля фибробластов в центре и краях ран к исходу 3-х суток в разных группах (абс. и % на 1 мм² ткани раны)

Отдел раны	Центр		Край	
Группы	Абс.	%	Абс.	%
Кфр	117 108 : 121	36,2% 33,2:36,9	107 92 : 109	37,4% 36,2:37,9
К0	119 113 : 120	37,1% 33,1:37,5	47 43 : 55	21,7% 19,4:22,5
Контроль_мск	132 101 : 142	35,7% 32,9:39,9	72 47 : 78	29,2% 24,5:30,8
ПСДЦ	111 93 : 123	37,9% 29,6:43,5	51 28 : 72	27,4% 19,2:41,1
ПСДЦ+МСК	99 94 : 103	38,8% 33,6:42,2	25 23 : 79	20,3% 18,9:44,5
Стволовые клетки	98 92 : 117	35,4% 34,4:39,6	18 14 : 49	16,1% 11,0:26,4
ДХ	112 92 : 129	36,6% 31,0:40,1	82 71 : 90	39,6% 27,4:49,4
ДГКТ	111 101 : 118	33,2% 32,9: 36,3	76 74 : 97	41,4% 39,4:42,4
Kruskal - Wallis test	0,120	0,900	0,002**	0,015*

Примечания: 1я строка – медиана, 2я строка – нижний : верхний квантили показателя.

Средняя численность фибробластов в разных отделах ран на 3 сутки исследования в ранах групп СК, ПСДЦ+МСК и ПСДЦ была наименьшей (как и концентрация лейкоцитов), возможно, вследствие отсутствия необходимости привлечения в очаг повреждения разных клеток по причине эффективности лечения посредством прогенеторных мезенхимальных клеток и/или полимерных соединений. Показатель количества фибробластов на 1 мм² в среднем по ране в порядке возрастания распределился следующим образом (от минимального к максимальному): МСК > ПСДЦ+МСК > ПСДЦ = ДХ > ДГКТ = К0 > Контроль_мск > Кфр (Рисунок 34). Важно отметить, что морфометрически на 3 сутки определялись молодые формы фибробластов.

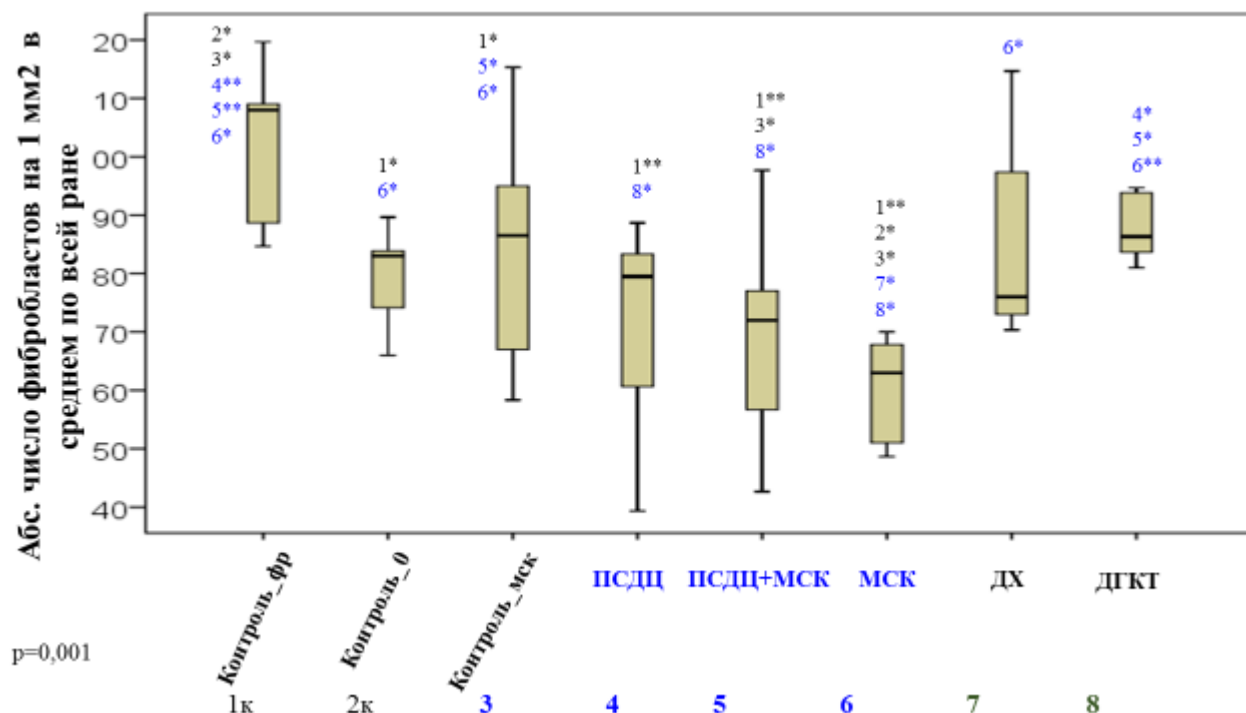


Рисунок 34 - Показатель количество фибробластов на 1 мм² ткани раны в среднем по разным отделам раны во всех группах (значимость межгрупповых различий по апостериорным тестам: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$).

Корреляционный анализ числа и доли фибробластов на 3 сутки установил только одну достоверную связь размера ран (площадь ран на 3 сутки) с показателем долевого содержания фибробластов в центре ран. Связь эта была слабой и отрицательной. Наилучшая динамика заживления ран к 3 суткам коррелировала с наибольшим процентным содержанием фибробластов в центре ран. И, наоборот, чем больше был размер ран, тем меньше в тканях центра ран был процент фибробластов ($r = -0,247$; $p < 0,05$). Наименьший процент фибробластов в центре ран был в группе ДГКТ (Me = 33,0%), наибольший – в группах ПСДЦ+МСК (Me = 38,8%) и ПСДЦ (Me = 37,9%).

Кроме того, было установлена отрицательная корреляционная взаимосвязь размера площади ран на 3 сутки с отношением резидентных и нерезидентных клеток на 3 сутки в центре ран ($r = -0,342$; $p < 0,05$). Это была наибольшая по силе (умеренная) корреляционная взаимосвязь между показателями размера ран и клеточной составляющей их тканей. Эта связь свидетельствовала о том, что размер раны тем больше, чем больше содержание лейкоцитов и одновременно меньше

фибробластов в центре ран. Наибольшим показателем отношения лейкоцитов/фибробластов на единицу ткани центра ран был в группах ПСДЦ+МСК ($Me = 0,633$) и МСК ($Me = 0,611$), наименьшим – в группе ДГКТ ($Me = 0,493$). Корреляционных достоверных связей по этому показателю в краях ран установлено не было, при этом отношение концентрации лейкоцитов и фибробластов в краях ран на 3 сутки, наоборот, было наибольшим в группе ДГКТ ($Me = 0,707$), наименьшим – в группе ПСДЦ+МСК ($Me = 0,192$).

Таким образом, на 3 сутки заживления ран в фазе экссудативного воспаления в разных отделах тканей ран превалировало содержание лейкоцитов, причем наиболее значимые механизмы ранозаживления протекали в тканях центра ран. В среднем число лейкоцитов в разных группах превосходило число фибробластов во всех группах в 1,8-2,3 раза, причем в центре число лейкоцитов было в 1,2-1,9 раза выше, чем по периферии ран, однако процентное содержание лейкоцитов в краях ран было выше только в группах МСК, ПСДЦ+МСК и К0 в 1,2-1,3 раза. Наименьший размер ран к 3 суткам коррелировал с меньшей концентрацией лейкоцитов в центре ран (но наибольшим процентом лейкоцитов в тканях края ран), и с наибольшим процентным содержанием фибробластов в центре ран.

Противовоспалительный эффект на 3 сутки был установлен у стволовых клеток и, в несколько меньшей степени, полимерных препаратов, главным образом в ранах групп МСК и ПСДЦ+МСК (только при локальном применении прогенеторных мезенхимальных клеток). В ранах этих групп число лейкоцитов на единицу площади ткани было меньше, чем в других группах, однако активность лейкоцитов при этом была на высоком уровне.

Системный противовоспалительный эффект прогенеторных клеток при их инъекционном применении в рану на противоположной стороне тела (группа Контроль_мск) на 3 сутки не был определен.

Микроскопическое исследование гистологических препаратов тканей ран животных на 3-и сутки после их моделирования позволило установить, что все раны на 3 сутки были покрыты струпом, который располагался на тонком слое

грануляционной ткани и закрывал всю рану целиком (и центр, и края всех ран). Глубокие отделы струпа были инфильтрированы полиморфноядерными лейкоцитами, лейкоцитарный инфильтрат широко распространялся в грануляционную ткань. Струп больше был выражен в контрольных группах, особенно в группе Кфр. Наименьшей была толщина струпа в группах МСК, ПСДЦ+МСК и ПСДЦ. В ткани всех ран обнаружены признаки венозного полнокровия гиподермы, фасциального сосудистого сплетения, а также выраженный феномен «краевого пула лейкоцитов», проявляющийся в их скоплении в пристеночном слое крови посткапиллярных и собирательных венул. Число лейкоцитов в пристеночном слое крови свидетельствует о продолжении процесса их миграции в паравазальную клетчатку, что типично для стадии экссудации воспаления (Рисунок 35).

Поскольку на 3 сутки исследования процессы, протекающие в центральных отделах ран, играли наибольшую роль, чем по краям ран, в качестве наглядных примеров приведем гистологические иллюстрации вышеописанных процессов в ранах разных групп.

Так, поверхность ран группы Кфр покрывал струп, который по толщине и плотности был максимально выражен в сравнении со всеми другими группами ран. Лейкоцитарный инфильтрат широко распространялся в грануляционную ткань и в более глубокие слои дермы (Рисунок 36).

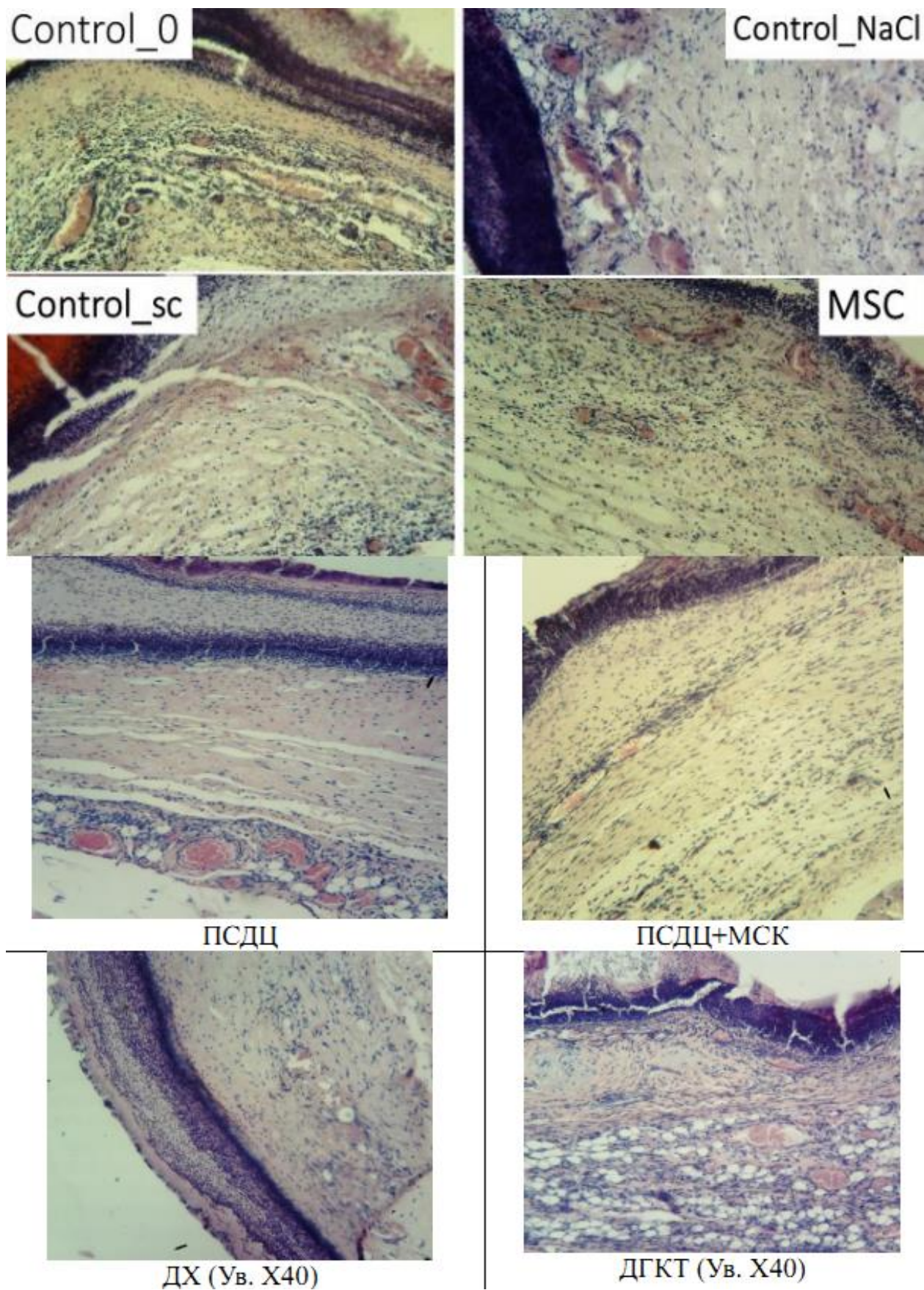


Рисунок 35 - Гистологическая картина центра ран на 3 сутки исследования в разных группах. Окраска гематоксилин-эозин.

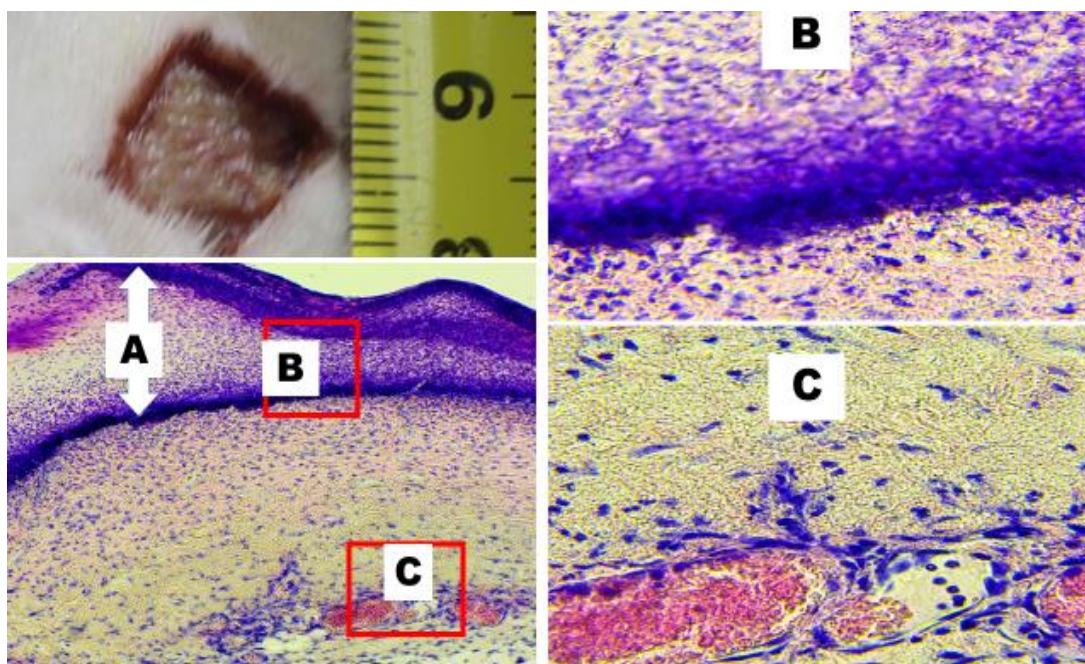


Рисунок 36 - Ткань центра раны к исходу 3-х суток после моделирования раневого процесса, группа Контроль. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. X100 (слева внизу) и x400 (справа). Струп большого размера (А), плотный лейкоцитарный инфильтрат на границе грануляционной ткани и в толще струпа (В, ув x400), лейкоциты в глубоких его слоях, где расширены полнокровные сосуды (С, ув x400).

В серии ран с применением ДГКТ выявлена самая значительная инфильтрация струпа полиморфноядерными лейкоцитами на фоне значительной отечности ткани раны вплоть до подкожной жировой клетчатки, в которой повсеместно определяются расширенные и полнокровные сосуды (Рисунок 37).

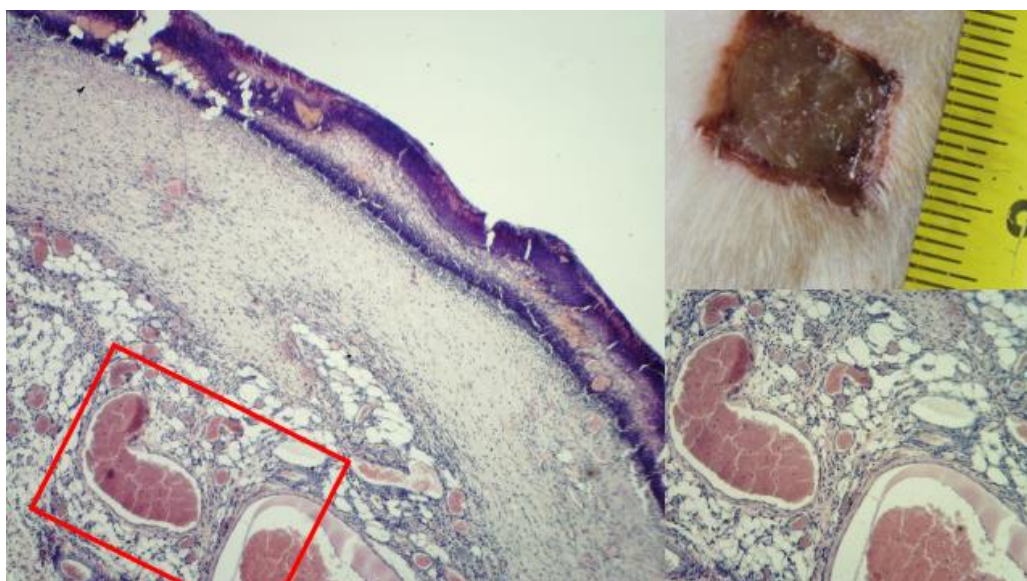


Рисунок 37 - Центр раневого кратера, конец 3-х суток после моделирования раневого процесса, группа ДГКТ. Обильная инфильтрация струпа, отек ткани и полнокровие ее сосудов. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. X40 и x100.

В ранах группы МСК на 3 сутки после дня моделирования выраженность струпа (по его ширине и плотности), а также степени его инфильтрации лейкоцитами была наименьшей по сравнению с ранами других групп. Вместе с тем, степень отечности тканей, формирующих дно раны и грануляции, была более выраженной. По сравнению с другими группами ран, в инфильтрате ран группы МСК преобладали макрофаги (моноциты) и лимфоциты в сравнении с нейтрофилами (рисунок 38).

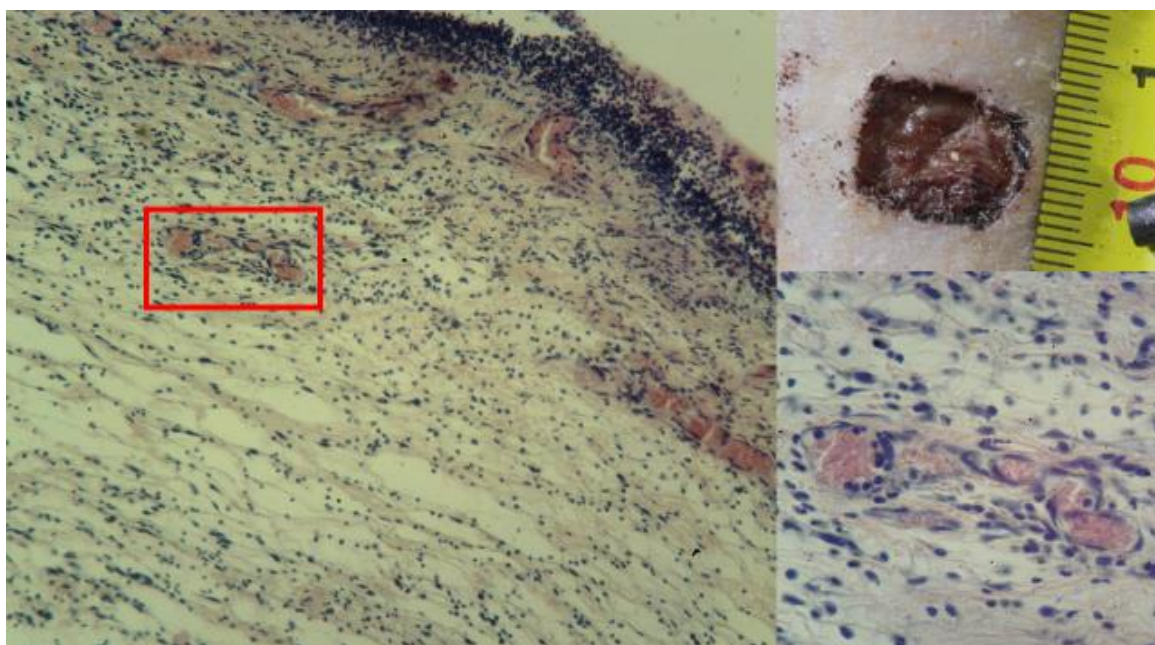


Рисунок 38 - Центр раневого кратера к исходу 3-х суток после моделирования раневого процесса в группе МСК. Отек грануляционной ткани распространяется на глубже лежащие ткани. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. X40, x400.

В меньшей степени по сравнению с другими группами лейкоцитарная инфильтрация была выражена в группе ПСДЦ+МСК. Феномен «краевого пула лейкоцитов», отек и венозный застой сосудов фасциального сплетения также в наименьшей степени был выражен в группе ПСДЦ+МСК (Рисунок 39).

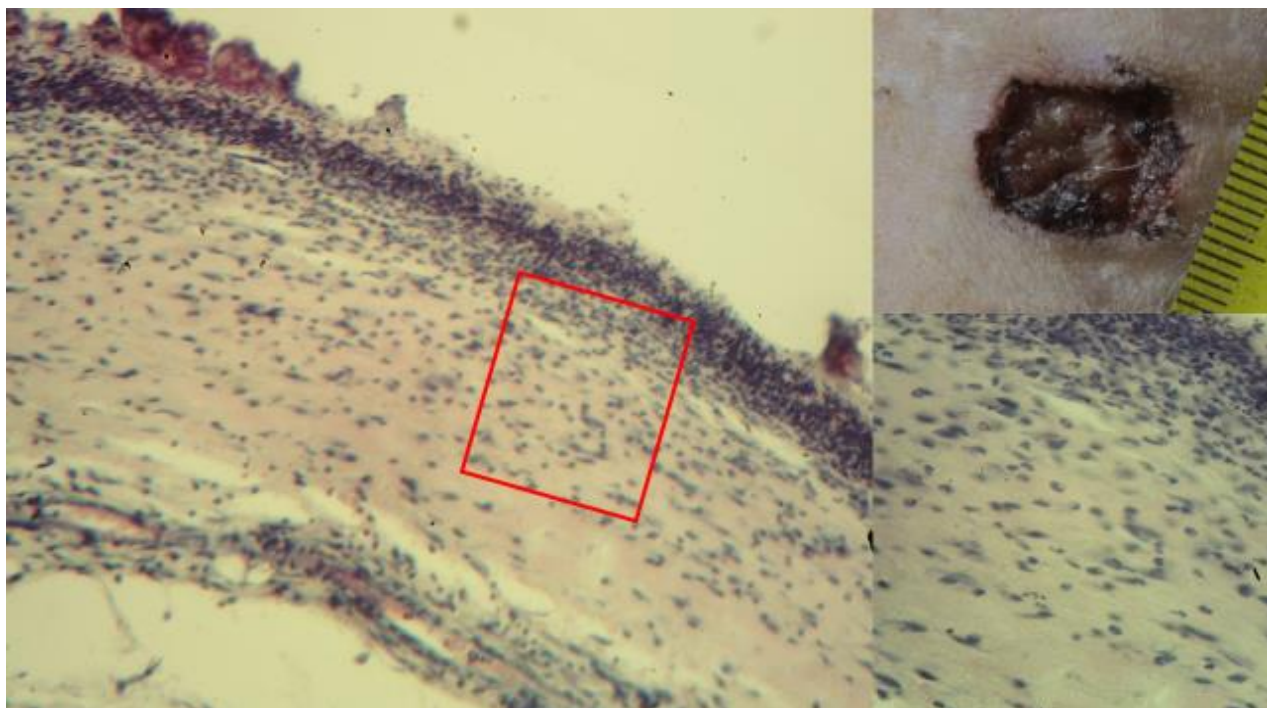


Рисунок 39 - Центр раны к исходу 3-х суток после моделирования раневого процесса в группе ПСДЦ+МСК. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. Х40, х400.

Изучение края ран на 3 сутки было менее информативным, при этом все особенности центра ран также прослеживались. В редких случаях у крыс групп ПСДЦ+МСК (n=2), МСК (n=2), ПСДЦ (n=1), Контроль_мск (n=1) и ДГКТ (n=1) на 3 сутки визуализировали в ткани краев ран под струпом новообразованный тонкий эпидермис, представленный 1-2 слоями клеток эпителия, покрывающий менее 10% поверхности края раны (Рисунок 40).

Анализ срезов ран, окрашенных по методу Ван-Гизона, определил на 3-и сутки во всех ранах под сформированным достаточно толстым струпом фибрин, заполняющий раневой кратер и содержащий мало тонких молодых слабо окрашенных коллагеновых волокон (Рисунок 41).

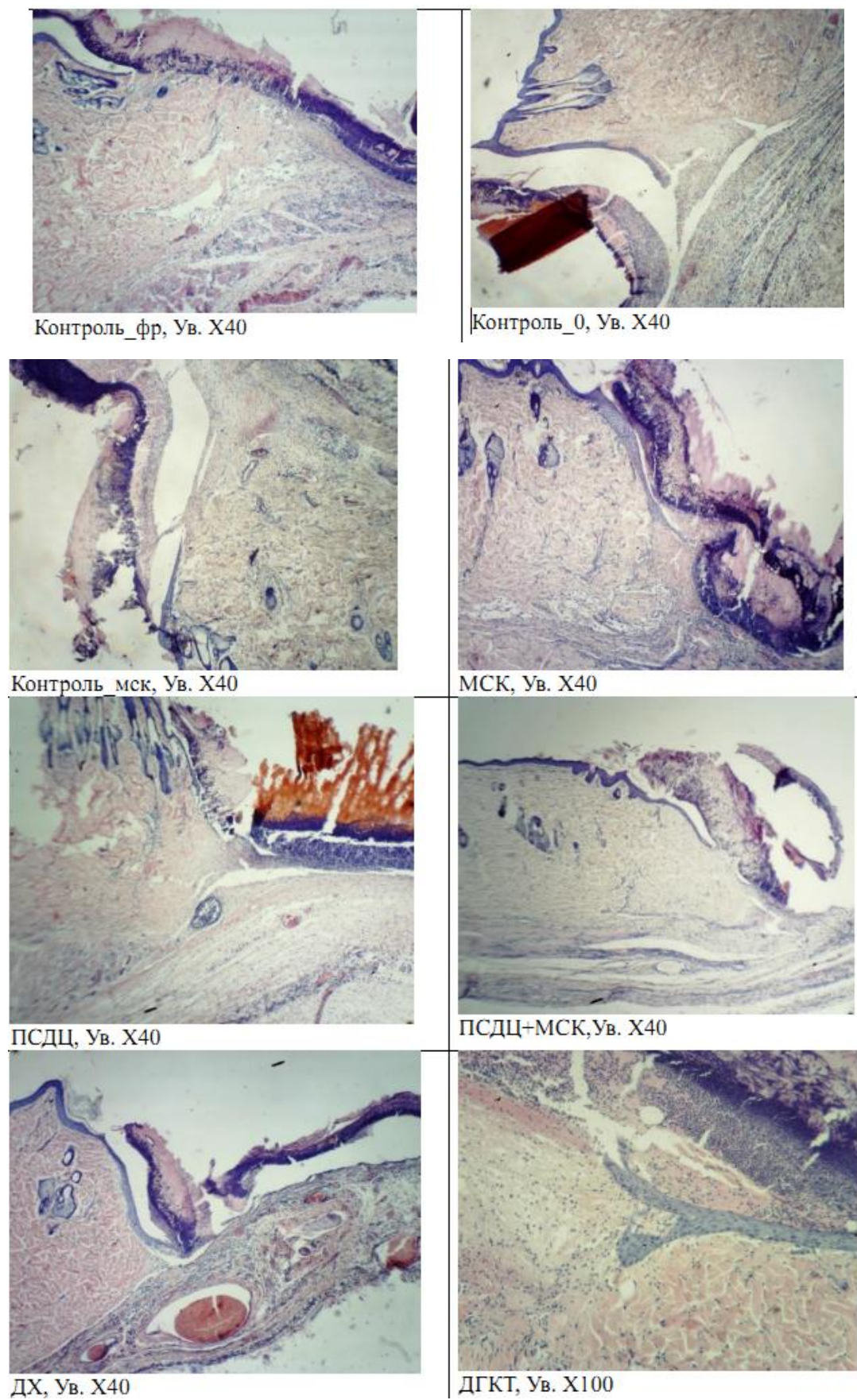


Рисунок 40- Край ран в разных группах на 3 сутки исследования (окраска Гематоксилин-Эозин)

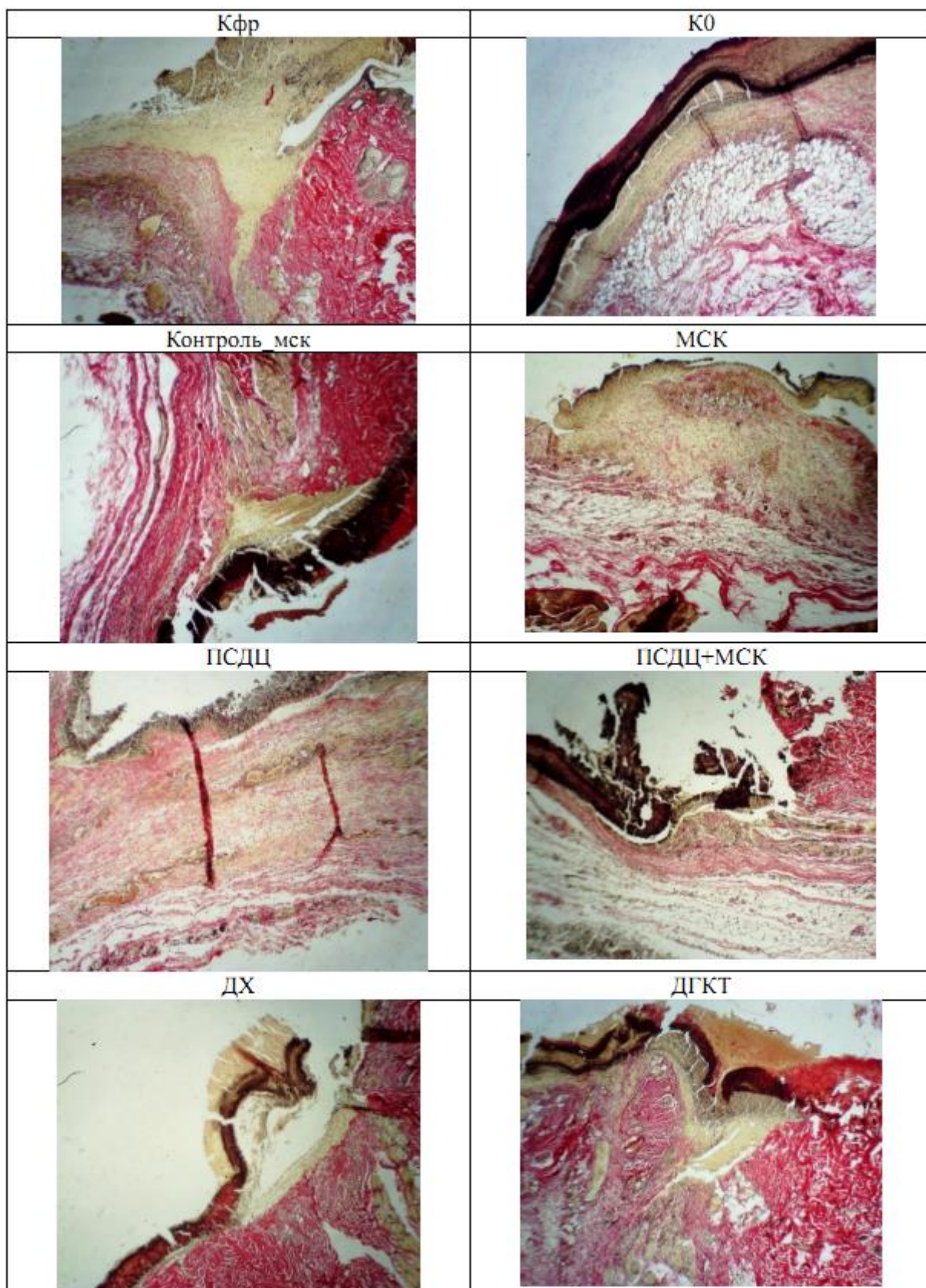


Рисунок 41 - Раны разных групп на 3 сутки исследования. Световая микроскопия, окраска по Ван-Гизону, ув. X40

Таким образом, на 3 сутки гистологическая картина характеризовалась признаками экссудативного воспаления, проявляющегося расширением и полнокровием сосудов, отеком тканей вплоть до подкожной жировой клетчатки, эмиграцией лейкоцитов из кровеносного русла и инфильтрация ими грануляций. Установлено уменьшение лейкоцитарной инфильтрации в группах МСК, ПСДЦ+МСК и ПСДЦ на фоне их высокой активности и развития (также в тканях этих групп визуализировалось меньше нейтрофилов и больше моноцитов, чем в других группах), выраженности отека и полнокровия, что ассоциировалось с наиболее быстрым переходом фазы экссудации в пролиферацию. Максимально выраженный переход в пролиферативную фазу был установлен в группе ПСДЦ+МСК (в краях ран группы ПСДЦ+МСК пролиферативная фаза была установлена в 28,6% случаях; все остальные препараты характеризовали экссудативную фазу).

3.3.2. Состояние ран к исходу 7-х суток исследования

На 7 сутки от момента моделирования острых ран в их тканях определяли явления пролиферативной фазы. В тканях разных отделов ран было зарегистрировано увеличение общей численности клеток относительно 3-го дня в среднем в разных группах в 2,0-3,9 раза в центре и в 3,0-6,5 раза в краях ран. Это говорит о том, что в отличие от 3-х суток, на 7-е сутки наибольшую роль в процессе заживления ран играют процессы, протекающие по краям ран. В наименьшей степени клеточная численность увеличилась в группах Кфр (в среднем в 2,04 раза возросло число клеток в центре и в 3,01 раза в краях ран) и Контроль_мск (в 1,98 раза и 3,17 раза, соответственно, $p < 0,05$). В наибольшей степени увеличение общего числа клеток было характерно для ран, которых лечили полимерными средствами: 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 (среднем в 3,32 раза увеличилось число клеток в центре и в 5,55 раза в краях ран, $p < 0,05$).

На 7 сутки было зарегистрировано увеличение и лейкоцитарных (в среднем в 1,18-2,09 раза в разных группах), и, главным образом, фибробластных клеток (в среднем в 4,32-8,56 раза в разных группах). Поэтому на 7 день раневой процесс в основном обеспечивали фибробласты, продуцирующие межклеточный матрикс, включая белок коллаген (Рисунок 42).

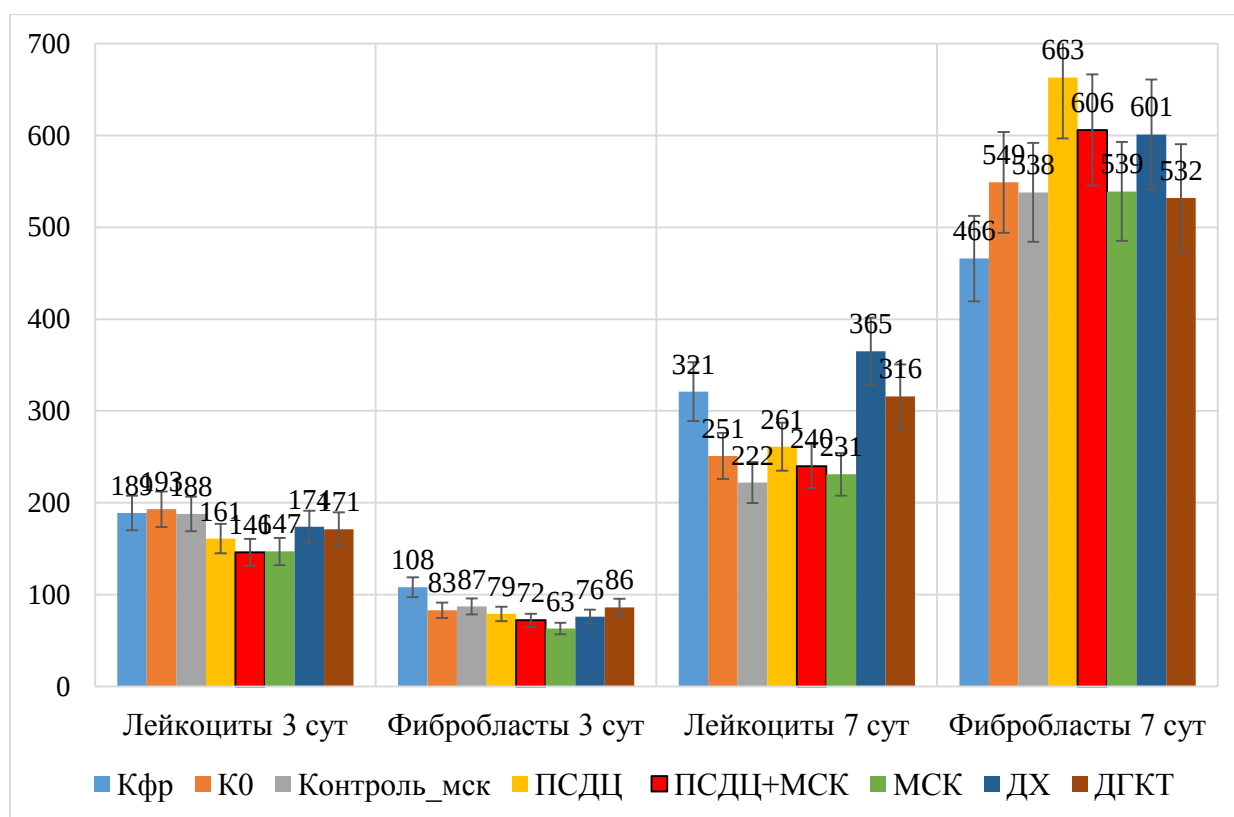


Рисунок 42 - Число лейкоцитов и фибробластов в тканях разных отделов ран разных групп на 3 и 7 сутки исследования (в среднем, абс.)

Фибробластов на 7 сутки исследования в тканях центра ран было в среднем в 1,24-1,83 раза больше, чем лейкоцитов, а в тканях края ран фибробластов было в среднем в 1,47-4,53 раза больше, чем лейкоцитов ($p < 0,05$). В среднем (Me) отношение фибробласты/лейкоциты по всем отделам раны распределилось в группах следующим образом (от меньшего к большему): Кфр (1,483) > ДХ (1,629) > ДГКТ (1,702) > К0 (2,156) > Контроль_мск (2,328) > МСК (2,354) > ПСДЦ (2,535) > ПСДЦ+МСК (2,586). То есть наибольшее данное отношение (больше фибробластов и меньше лейкоцитов) было в группах ран, которых лечили новыми полимерными средствами, а на втором месте по величине этого показателя были группы ран, которых лечили прогениторными клетками локально или системно. Установлены

межгрупповые различия, демонстрирующие, что в неотличимых между собой по данному показателю группах Кфр, ДХ и ДГКТ отношение фибробласты/лейкоциты статистически значимо меньше, чем во всех остальных группах ($p < 0,05$), а в сопоставимых группах ПСДЦ и ПСДЦ+МСК этот показатель был статистически значимо больше, чем в группах К0, Кфр, ДХ и ДГКТ ($p < 0,05$), как это представлено на рисунке 43.

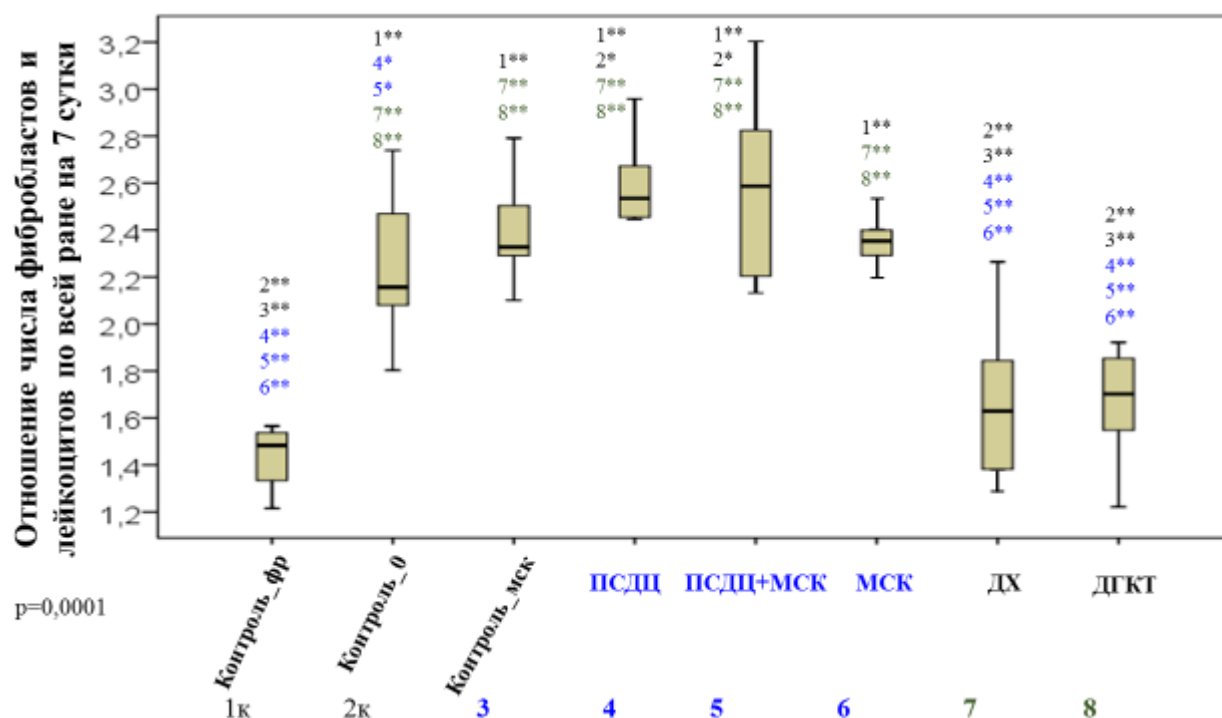


Рисунок 43 - Отношение числа фибробластов / лейкоцитов в среднем по всем отделам ран разных групп на 7 сутки (значимость межгрупповых различий по апостериорным тестам при: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$).

Таким образом, на 7 сутки, в ранах, для лечения которых использовали мезенхимальные клетки при их как локальном, так и системном применении, а также (особенно) полимерные соединения, в наибольшей степени судя по числу фибробластных клеток, должен был продуцироваться межклеточный матрикс, что и обеспечивает ускорение застывания раневого дефекта. И, наоборот, в группах с наименьшим показателем отношения (то есть где численность лейкоцитов оставалась на высоком уровне, а фибробластов на невысоком, это группы Кфр, ДХ, ДГКТ) в меньшей степени осуществлялась пролиферативная репарация, а в

большей степени протекали воспалительные процессы, что задерживало заживление ран и иллюстрировалось наибольшими их размерами на 7 сутки.

Именно в этих группах был установлен наибольший рост численности лейкоцитарных клеток к 7 суткам относительно 3 дня: в группе ДХ лейкоцитов стало больше в среднем в 2,09 раза, в группе ДГКТ – в 1,85 раза, в группе Кфр – в 1,70 раза. Наименьший рост числа лейкоцитов был характерен для ран группы К0 (1,31 раза), Контроль_мск (1,18 раза) и МСК (1,57 раза), что лишний раз подтверждает противовоспалительный эффект МСК и наименьшее воспаление у интактных ран.

Так, показатель численности лейкоцитов в разных слоях грануляций на 7 сутки был наименьшим в группах ран, где использовали прогениторные клетки местно инвазивно, неинвазивно или системно (группы МСК, ПСДЦ+МСК и Контроль_мск). В наибольшей мере это касалось краев ран (таблица 28).

Таблица 28 - Число и доля лейкоцитов в центре и краях ран к исходу 7-х суток в разных группах (абс. и % на 1 мм² ткани раны)

Отдел раны	Центр		Край	
	Абс.	%	Абс.	%
Группы				
Кфр	303 275/307	40,7 39,1/42,4	349 325/383	40,4 38,5/43,2
К0	327 256/378	44,8 40,5/47,0	204 185/248	23,0 21,3/27,3
Контроль_мск	298 261/333	41,7 37,7/42,8	180 171/218	22,8 21,0/27,8
ПСДЦ	384 375/410	40,3 37,6/41,1	181 156/191	19,5 17,5/21,2
ПСДЦ+МСК	323 311/340	35,4 35,0/36,7	158 140/182	18,3 17,7/24,1
Стволовые клетки	279 255/292	39,2 37,9/42,0	186 176/219	24,2 22,8/26,0
ДХ	369 366/371	39,1 37,7/40,1	332 299/551	36,7 32,4/47,1
ДГКТ	266 233/353	36,7 35,1/41,1	295 264/361	37,3 33,4/42,6
Kruskal - Wallis test	0,0001**	0,047*	0,0001**	0,0001**

Примечания: 1я строка – медиана, 2я строка – нижний/верхний квартиль показателя.

В ткани края ран число лейкоцитов на 7 сутки было наименьшим в группах ПСДЦ+МСК (Me = 158 лейкоцитов/мм²), Контроль_мск (Me = 180 лейкоцитов/мм²)

и ПСДЦ (Me = 181 лейкоцитов/мм²). Между собой эти группы по лейкоцитарной инфильтрации ран не отличались ($p > 0,05$). Наибольшим данный показатель был на 7 сутки в группах Кфр (Me = 349 лейкоцитов/мм², что было достоверно в 1,9-2,2 раза больше, чем в группах с наименьшим содержанием в ранах лейкоцитов, $p < 0,05$), ДХ (Me = 332 лейкоцитов/мм²) и ДГКТ (Me = 295 лейкоцитов/мм²).

Таким образом, в ткани ран разных групп количество лейкоцитов на 7-е сутки увеличилось, однако степень этого увеличения различалась. Продолжающийся противовоспалительный эффект мезенхимальных стволовых клеток при их применении любым способом обеспечивал наименьшую лейкоцитарную инфильтрацию таких ран. В наибольшей же степени рост числа лейкоцитов, показатель абсолютного их числа и процентного соотношения, был зарегистрирован в тканях ран групп Кфр, ДХ и ДГКТ (Рисунок 44).

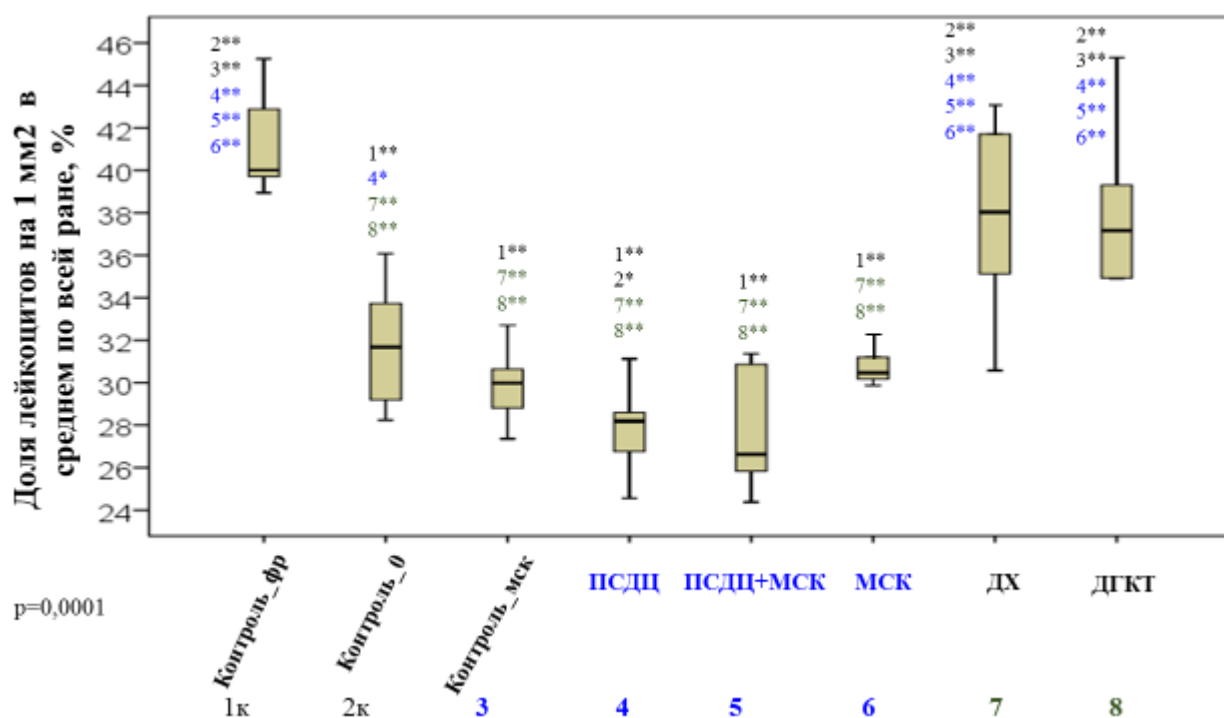


Рисунок 44 - Процентное содержание лейкоцитов в ткани всех отделов ран разных групп на 7 сутки исследования (значимость межгрупповых различий по апостериорным тестам при: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$).

Именно в этих группах (Кфр, ДХ и ДГКТ), которые имели наибольший размер ран на 7 сутки исследования, была зарегистрирована еще одна особенность, которая отличала их от других групп ран. В этих группах число лейкоцитов в краях

ран было таким же, как и в центре ран или даже больше. В итоге процентная концентрация лейкоцитов было одинаковым, в среднем оно составило в группе Кфр 40,7% в центре и 40,4% в крае ран ($p>0,05$), в группе ДХ – 39,1% в центре и 36,7% в крае ран ($p>0,05$), в группе ДГКТ – 36,7% в центре и 37,3% в крае ран ($p>0,05$). Во всех остальных фармакологических группах было установлено, что долевое содержание лейкоцитарных клеток в центре ран в среднем статистически значимо в 1,62-2,07 раза больше, чем в краях ран (в группе К0 - в 1,95 раза, Контроль_мск – в 1,83 раза, ПСДЦ – 2,07 раза, ПСДЦ+МСК – 1,93 раза, МСК – 1,62 раза), поэтому в краях ран этих групп средний процент лейкоцитарных клеток составил на 7 сутки 18,3-24,2% (Рисунок 45). Это обеспечивало наибольшую концентрацию фибробластов в краях ран этих групп, что способствовало наилучшей регенерации и более активному процессу эпителизации.

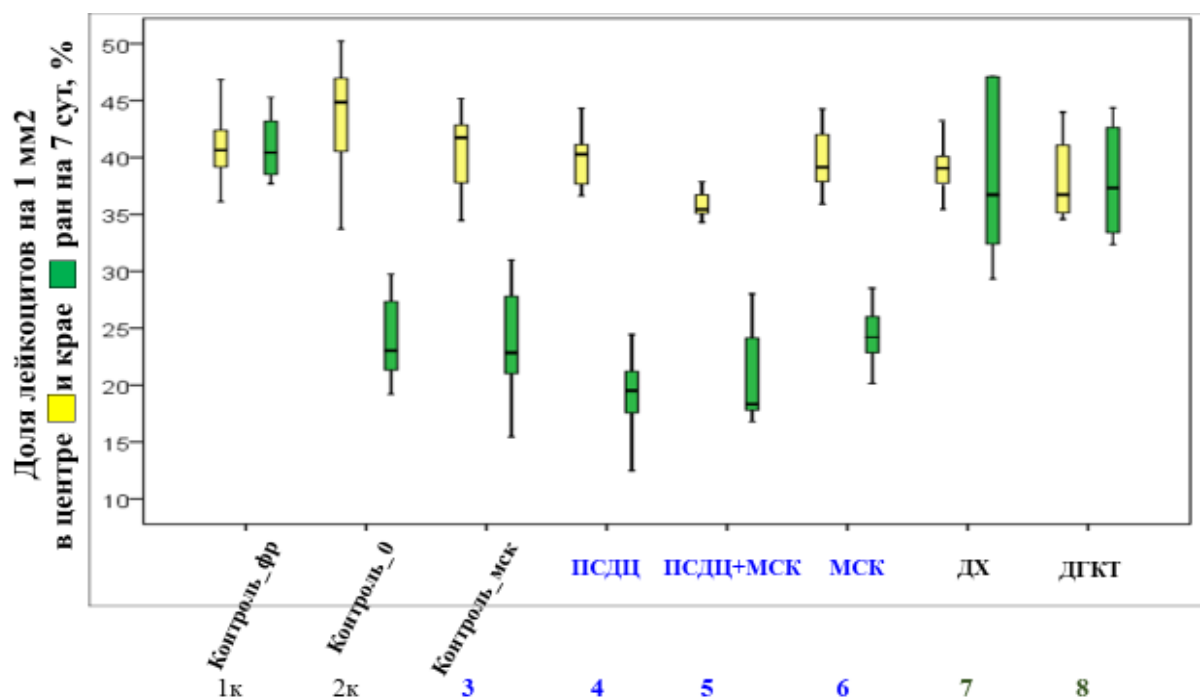


Рисунок 45 - Доля лейкоцитов в центре и краях ран разных групп на 7 сутки исследования, %

Следовательно, максимальная лейкоцитарная инфильтрация ткани ран к 7 суткам может служить маркером сохраняющегося воспаления и причиной возможного замедления процесса репарации ран. Наоборот, меньшая концентрация лейкоцитарных клеток в тканях ран, особенно в ее краях, на 7 сутки может быть маркером ускоренного заживления ран. Еще одним прогностическим маркером

может являться показатель разности лейкоцитарной инфильтрации в разных отделах раны, который в краях ран при благоприятном течении раневого процесса на 7 сутки в двое меньше, чем в центре ран.

Важно отметить, что на 7 сутки изменилась морфология лейкоцитов, нейтрофильную инфильтрацию сменили мононуклеары и макрофаги.

На 7 сутки наиболее существенные изменения в ткани ран были связаны с увеличением плотности фибробластных клеток и их активностью. В наибольшей степени число фибробластов к 7 суткам увеличилось по сравнению с 3 днем исследования в группах МСК (фибробластов стало больше в среднем в 8,56 раза, $p < 0,05$), ПСДЦ+МСК (в 8,42 раза, $p < 0,05$) и ПСДЦ (в 8,39 раза, $p < 0,05$). Минимальный рост числа фибробластов был установлен в ранах группы Кфр (в 4,32 раза, $p < 0,05$; это в два раза меньше, чем в вышеперечисленных группах). По краям ран рост количества фибробластов был больше, чем в дне ран. Численность фибробластов на 7 сутки в ткани краев ран значительно увеличилась у всех групп ран в среднем в 5-33 раза по сравнению с 3 сутками (минимум: в 5,0 раза в группе Контроль, максимум: в 33 раза в группе МСК). Поэтому на 7-е сутки (в отличие от 3-х суток) в ткани ран превалировали фибробласты над другими клетками. Это обеспечивало формирование послеоперационного нового межклеточного матрикса, включая коллагенизацию раны. Таким образом, на 7 сутки процесс пролиферативной регенерации с участием фибробластов сменил период экссудативного воспаления, представленного на 3 сутки раневого процесса. Установленные значимые различия по критерию Краскел-Уоллиса по всем представленным в таблице показателям позволяют обоснованно проводить апостериорные тесты и межгрупповые сравнения, определяя значимые различия по каждой группе ран. Максимальное число фибробластов разных степеней созревания было у животных в группах ран, для лечения которых применяли полимерные средства: ПСДЦ+МСК и ПСДЦ (таблица 29).

Таблица 29 - Число и доля фибробластов в центре и краях ран к исходу 7-х суток в разных группах (абс. и % на 1 мм² ткани раны)

Отдел раны	Центр		Край	
	Абс.	%	Абс.	%
Группы				
Кфр	428 383/454	59,3 57,6/60,8	537 488/549	59,6 56,8/61,5
К0	420 374/446	55,2 53,0/59,5	682 668/690	77,0 72,6/78,7
Контроль_мск	422 411/462	58,3 57,1/62,6	608 570/643	77,2 72,2/79,0
ПСДЦ	562 546/632	59,7 58,8/62,3	723 684/769	80,5 78,7/82,7
ПСДЦ+МСК	599 576/611	64,6 63,2/64,9	612 599/704	81,7 75,9/82,2
Стволовые клетки	449 395/458	60,8 58,0/62,1	594 574/638	75,8 73,9/77,1
ДХ	558 553/618	60,9 59,9/62,2	618 584/626	63,3 52,9/67,6
ДГКТ	458 442/472	63,3 58,9/64,9	545 499/561	62,7 57,3/66,7
Kruskal - Wallis test	0,0001**	0,047*	0,0001**	0,0001**

Примечания: 1я строка – медиана, 2я строка – нижний/верхний квартиль показателя.

Интересно отметить, что если на 3 сутки фибробластов в целом было больше в центре ран, то на 7 сутки, число фибробластов в ткани краев ран было больше, чем в центре ран во всех группах (в группе Кфр - в среднем в 1,25 раза ($p < 0,05$), К0 – в 1,62 раза ($p < 0,05$), Контроль_мск – в 1,44 раза ($p < 0,05$), ПСДЦ – в 1,29 раза ($p < 0,05$), ПСДЦ+МСК - в 1,02 раза ($p > 0,05$), МСК – в 1,32 раза ($p < 0,05$), ДХ – 1,10 раза ($p > 0,05$), ДГКТ - 1,19 раза ($p < 0,05$).

Анализ численности фибробластов в центре ран на 7 сутки исследования показал, что больше всего фибробластов было в группах ПСДЦ+МСК (Ме = 599 в 1 мм²), ПСДЦ (Ме = 562 в 1 мм²), а также ДХ (Ме = 558 в 1 мм²). Это число было достоверно в 1,21-1,42 раза выше, чем во всех других группах ($p < 0,05$). Между собой эти группы не отличались по этому показателю ($p > 0,05$). Число фибробластов в центре ран было наименьшим в статистически неразличимых группах К0 (Ме = 420 в 1 мм²), Кфр (Ме = 428 в 1 мм²), Контроль_мск (Ме = 422 в 1 мм²), а также МСК (Ме = 449 в 1 мм²) и ДГКТ (Ме = 458 в 1 мм²) (рисунок 46).

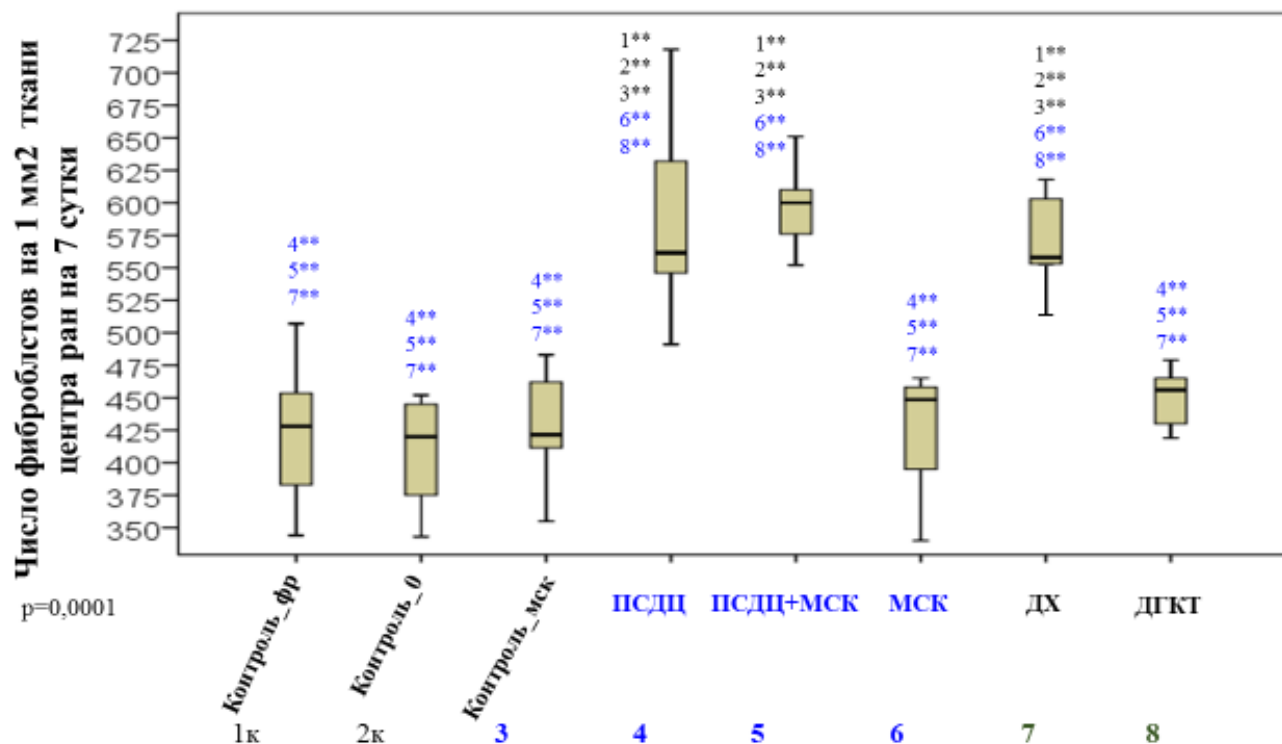


Рисунок 46 - Число фибробластов в ткани центра ран в разных группах на 7 сутки исследования (количество клеток на 1 мм²). Значимость межгрупповых различий по апостериорным тестам: * - p<0,05, ** - p<0,01.

Численность фибробластов на 7 сутки в ткани краев ран была значимо выше, чем в центре ран, во всех группах, кроме групп ПСДЦ+МСК и ДХ. Самое большое число фибробластов по краям ран было в группе ПСДЦ (Me = 723 в 1 мм², это было статистически значимо выше, чем в группах Кфр (в среднем в 1,35 раза, p<0,05), Контроль_мск (в 1,19 раза, p<0,05), МСК (в 1,22 раза, p<0,05), ДХ (в 1,17 раза, p<0,05) и ДГКТ (в 1,33 раза, p<0,05)). На втором месте по численности фибробластов в единице ткани края ран были на 7 сутки группы К0 и ПСДЦ+МСК, статистически значимо превосходящие группы Кфр (в 1,27 и 1,14 раза, соответственно, p<0,05) и ДГКТ (в 1,25 и 1,14 раза, соответственно, p<0,05). Промежуточное положение по этому показателю было в группах Контроль_мск, МСК и ДХ, в среднем число фибробластов в этих группах составило 594-618 в 1 мм² ткани края ран, что было статистически значимо меньше относительно группы ПСДЦ (p<0,05), от остальных групп по этому показателю они статистически не отличались. Самый низкий показатель численности фибробластов на 7 сутки в краях ран был зарегистрирован в группах ДГКТ и Кфр (Рисунок 47).

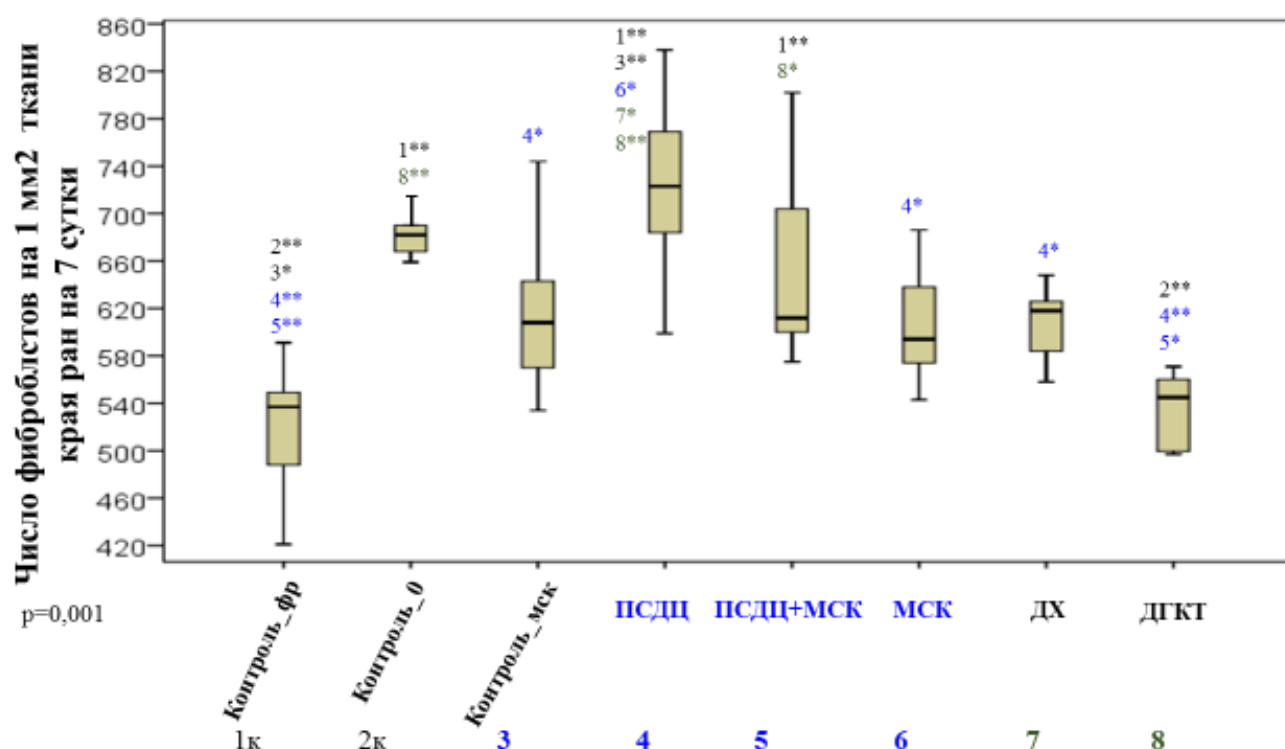


Рисунок 47 - Число фибробластов в ткани края ран в разных группах на 7 сутки исследования (количество клеток на 1 мм²). Значимость межгрупповых различий по апостериорным тестам: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$.

Долевое содержание фибробластов в тканях центра ран на 7 сутки в среднем (Me) в разных группах было на уровне 55,2-64,6% (с межквартильным размахом 53-65%). При сравнительном анализе всех изучаемых групп была установлена статистическая разница (Kruskal - Wallis test и ANOVA, $p < 0,05$). При этом, если по показателю абсолютного числа фибробластов в центре ран было определено три лидирующие группы (ПСДЦ, ПСДЦ+МСК и ДХ), то при анализе процентного содержания фибробластов в центре ран лидером была только одна группа ПСДЦ+МСК, в которой этот показатель в среднем составил 64,6%, что было в 1,1-1,17 раза больше, чем в контрольных группах Кфр, К0 и Контроль_мск ($p < 0,05$). Самым низким процентное содержание фибробластов на 7 сутки было в тканях центра ран группы К0 (Me= 55,2%, что значимо меньше, чем в группах ПСДЦ+МСК, ДХ и ДГКТ ($p < 0,05$)).

В краях ран по показателю процентного содержания фибробластов на 7 сутки исследования было установлено гораздо более существенное межгрупповое

различие, чем в центре ран. В среднем данный показатель в разных группах составил (Me) от 59,6% до 81,7% с межквартильным размахом 53-83%. При этом установлено статистически значимое различие, демонстрирующее то, что в краях ран частота встречаемости клеток фибробластного дифферона гораздо выше, чем в центре, только в 5 из 8 нами изучаемых групп ран: К0, Контроль_мск, ПСДЦ, ПСДЦ+МСК и МСК. В этих группах частота фибробластов в тканях края ран была в 1,3-1,4 раза выше, чем в центре ($p < 0,05$). И именно в этих группах, статистически не отличающихся между собой по данному показателю, был установлен наибольший процент содержания фибробластов (в среднем 75,8-81,7%), что было значимо выше, чем в группах Кфр (в среднем в 1,27-1,37 раза, $p < 0,05$), ДХ (в 1,20-1,29 раза, $p < 0,05$) и ДГКТ (в 1,21-1,30 раза, $p < 0,05$) (рисунок 48).

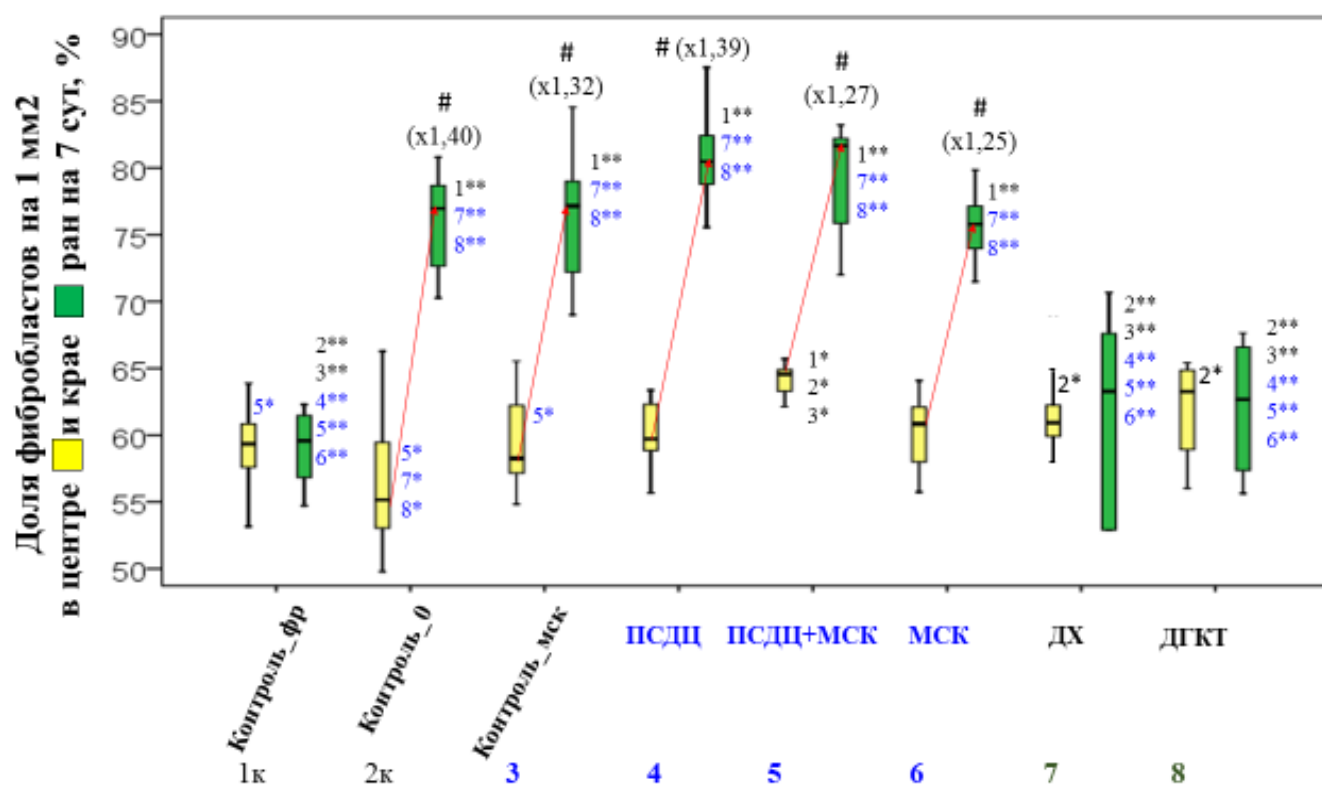


Рисунок 48 - Доля фибробластов в ткани центра (желтый) и края ран (зеленый) разных групп на 7 сутки исследования (в %). Значимость межгрупповых различий по апостериорным тестам: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$. # - значимое различие показателя в центре и крае раны в пределах одной группы при $p < 0,05$.

В среднем на 7 сутки процент фибробластов по всем отделам ран был наибольшим в группах ран, для лечения которых использовали полимеры и/или прогениторные клетки (в порядке убывания): ПСДЦ+МСК (Me = 73,4%), ПСДЦ

(Me = 71,8%), Контроль_мск (Me = 70,1%), МСК (Me = 69,5%). Несмотря на отсутствие достоверных различий между этими группами, отметим, что и по этому показателю лидировали группы ран, для лечения которых применяли полимеры, при применении прогениторных клеток доля фибробластов была менее высокой и не отличалась от таковой группы К0. Наименьшим был процент фибробластов по всем отделам ран в группах ДГКТ (Me = 62,8%), ДХ (Me = 62,2%) и, особенно, Кфр (Me = 59,6%). Установлены достоверные статистические различия между группами с высоким и низким содержанием фибробластов в ранах на 7 сутки ($p < 0,05$).

Корреляционный анализ размера ран и морфометрических показателей на 7 сутки был выполнен только по показателям 56 ран у крыс, выведенных на 7 сутки исследования. Результаты этого корреляционного анализа еще раз подтвердили, что на 7 сутки заживление ран в большей степени зависит от участия фибробластов. Это проявляется более сильными связями (величина показателя r) и большей степенью достоверности при изучении взаимосвязи размера ран на 7 сутки с морфометрическими данными (числом разных клеток, их доленое содержание, отношение фибробласты / лейкоциты). Также подтверждено, что на 7 сутки процесс регенерации зависит от краевых механизмов, главным образом от концентрации и активности фибробластов, локализующихся в краях ран. Кроме того, при сильной корреляционной связи между метрическим показателем площадь ран, измеренной на 7 сутки, и показателями изменения размера ран на 7 сутки относительно исходной площади, наиболее значимым оказался простой вычисляемый показатель изменения размера площади ран, выраженный в мм^2 (площадь раны на 0 сутки – площадь раны на 7 сутки). У этого показателя было выявлено больше корреляций, в том числе по силе связи (таблица 30). Следовательно, по изучаемым нами морфометрическим показателям можно определять не только связь с размером ран и фазой заживления, но и динамику процесса регенерации.

Таблица 30 - Корреляционный анализ размера ран и морфометрических показателей на 7 сутки (представлены значения r , превышающие 0,2 при $p < 0,05$)

Отдел раны	Показатель	Площадь ран на 7 сутки, мм ²	Изменение размера ран к 7 сут (размер на 0 сут – на 7 сут, в мм ²)	Изменение размера ран к 7 суткам по сравнению с днем 0, в %
Центр	Общее число клеток (абс.)		-0,346**	-0,301*
	Число фибробластов (абс.)		-0,354**	-0,324*
	Число лейкоцитов (абс.)		-0,259**	
Край	Число фибробластов (абс.)	-0,213*	-0,504**	-0,339*
	Число лейкоцитов (абс.)	0,354**	0,564**	0,480*
	% Фибробластов	-0,360**	-0,607**	-0,514**
	% Лейкоцитов	0,360**	0,607**	0,514**
	Фибробласты / Лейкоциты	-0,318*	-0,578**	-0,475**
В среднем по всей ране	Число фибробластов (абс.)	-0,282*	-0,478**	-0,419**
	Число лейкоцитов (абс.)	0,255*	0,401**	0,329**
	% Фибробластов	-0,363**	-0,598**	-0,509**
	% Лейкоцитов	0,363**	0,598**	0,509**
	Фибробласты / Лейкоциты	-0,331**	-0,554**	-0,455**
Изменение размера ран к 7 сут (размер на 0 сут – на 7 сут, в мм ²)		0,762**	1	0,970**
Изменение размера ран к 7 суткам по сравнению с днем 0, в %		0,807**	0,970**	1
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$				

Корреляционный анализ позволил определить, что наилучшее заживление к 7 суткам взаимосвязано с числом любых клеток, локализующихся в центре ран (связь умеренной силы, $r = -0,346$; $p < 0,01$), особенно фибробластов (связь умеренной силы, $r = -0,354$; $p < 0,01$). То есть, чем меньше клеток было в центральном отделе ран, тем хуже она сократилась в период с 0-х до 7-х суток исследования, и наоборот, лучшее сокращение размера ран к исходу 7 суток после острого повреждения связано с большей численностью клеток в центре ран (фибробластов). Других корреляций с морфометрическими показателями, определяемыми в центре ран, на 7 сутки выявлено не было.

Морфометрическое исследование краев ран дало более богатые результаты взаимосвязей. Наиболее сильные корреляции (связи средней силы $r > 0,5$) установлены по показателю изменения размера ран. Чем больше сократилась площадь ран к 7 суткам (чем меньше был этот показатель), тем больше в краях ран

было фибробластов ($r = -0,504$; $p < 0,01$) и меньше было число лейкоцитов ($r = 0,564$; $p < 0,01$), а также чем выше было процентное содержание фибробластов и, соответственно, низкий процент лейкоцитов в краях ран ($r = 0,607$; $p < 0,01$).

С показателем площадь ран определены корреляции умеренной силы (все $r < 0,4$). Наибольшая площадь ран на 7 сутки коррелировала с такими морфометрическими показателями, определяемыми по краям ран и в целом по ране, как: наибольшее число лейкоцитов в крае ран ($r = 0,354$; $p < 0,01$), наименьшее число фибробластов в крае ран ($r = -0,213$; $p < 0,05$), соответственно, наибольшее процентное содержание лейкоцитов в тканях края ран ($r = 0,360$; $p < 0,01$) и низкий индекс отношения фибробластов к лейкоцитам ($r = -0,318$; $p < 0,01$). Общий анализ по всем разделам ран также установил, что лучше заживали к 7 суткам те раны, в которых было больше фибробластов и меньше лейкоцитов.

Таким образом, на 7-е сутки после острого повреждения в ране формируются новые ткани дермы, обильно инфильтрированные клетками разного типа и степени зрелости, в связи с чем значительно возрастает общая численность клеток. Наибольшую роль в процессе заживления ран на 7 сутки играют продуцирующие межклеточный матрикс фибробласты и процессы, протекающие по краям ран. Успех пролиферации зависит от концентрации и активности фибробластов, локализующихся в краях ран.

Лучше регенерировали к 7 суткам раны с наибольшей численностью и концентрацией фибробластов и наименьшей численностью лейкоцитов, что особенно характерно для тканей края ран.

Стабильно высокий уровень лейкоцитарной инфильтрации ткани ран к 7 суткам может служить маркером сохраняющегося воспаления и причиной замедления процесса репарации. Наоборот, меньшая концентрация лейкоцитарных клеток в тканях ран, особенно в ее краях, на 7 сутки может быть маркером ускоренного заживления ран. Еще одним прогностическим маркером может являться показатель разности лейкоцитарной инфильтрации в разных отделах раны,

который в краях ран при благоприятном течении раневого процесса на 7 сутки в двое меньше, чем в центре ран.

Лучшие результаты регенерации на 7 сутки были установлены в группах ПСДЦ и ПСДЦ+МСК, худшие результаты были в ранах групп Кфр, ДГКТ и ДХ. Группы К0, МСК и Контроль_мск занимали промежуточный результат. На 7 сутки, в ранах, для лечения которых использовали полимерные соединения и мезенхимальные клетки при их как локальном, так и системном применении, в наибольшей степени судя по числу фибробластов, должен был продуцироваться межклеточный матрикс, что обеспечивает ускорение застания раневого дефекта. И, наоборот, в группах с наименьшим показателем отношения (то есть где численность лейкоцитов оставалась на высоком уровне, а фибробластов на невысоком, это группы Кфр, ДХ, ДГКТ) в меньшей степени осуществлялась пролиферативная репарация, а в большей степени протекали воспалительные процессы, что задерживало заживление ран и иллюстрировалось наибольшими их размерами на 7 сутки.

Новое полимерное соединение обладает ранозаживляющим действием, в наибольшей степени проявляющееся на стадиях, идущих при участии фибробластов. ПСДЦ и ПСДЦ+МСК обуславливали ускорение перехода экссудативной фазы в пролиферативную и активизировали пролиферативные процессы в ране за счет увеличения численности фибробластов, их активации, и ускоренного созревания с продукцией белков межклеточного матрикса.

При локальном или системном применении прегениторных мезенхимальных клеток, не отличающихся от группы К0 к 7 суткам по показателям морфометрии, не было выявлено существенного влияния на фазы заживления ран, идущие при участии фибробластов. Возможно, позитивный результат на 7 сутки, связан с влиянием этих клеток на лейкоциты, на более раннюю фазу заживления ран. Лейкоциты в этом случае мигрируют в рану быстрее, быстрее активизируются, более активно продуцируют медиаторы воспаления, быстрее созревают, обеспечивая таким образом, противовоспалительный эффект препаратов со СК, а

за счет этого и ускорение перехода в пролиферативную фазу (не влияя непосредственно на фибробласты, как это было в группах ран, которые лечили полимерами). Это означает, что численность лейкоцитов – менее важная характеристика, чем их активность, и МСК влияют именно на раннее начало и активность действия лейкоцитов.

ДГКТ и ДХ не оказывали действие на фибробласты на 7 сутки исследования.

В ранах, для лечения которых применяли мазь ДХ, процентное содержание фибробластов было низким (а лейкоцитов высоким). Кроме того, не было увеличения содержания фибробластов относительно центра ран, что было характерно для интактных ран группы К0, свидетельствуя о неэффективности использования этого препарата для лечения острых ран, поскольку применение ДХ отсрочивало переход экссудации в пролиферацию, поддерживало более длительное воспаление, тормозило фибробластную активность и в целом процесс регенерации.

Что касается препарата ДГКТ, введение которого сопряжено с дополнительным травмированием ран, что усиливает воспалительную реакцию и задерживает процессы заживления ран относительно неинвазивных лекарственных средств, то все изучаемые нами показатели, характеризующие фибробласты, не отличались от таковых группы Кфр. Из чего можно сделать вывод об отсутствии влияния ДГКТ на фазы заживления, идущие при участии фибробластов.

Микроскопия гистологических срезов ран животных, выведенных из эксперимента на 7 сутки

На 7 сутки от момента моделирования острых ран в их тканях определяли явления пролиферативной фазы. При микроскопии в центре ран во всех ранах на 7 сутки были выявлены отеки их тканей, расширенные лимфатические сосуды, полнокровные капилляры и веноулы. Лейкоцитарный инфильтрат был плотнее и имел наибольшую распространенность в группах Кфр, ДГКТ и ДХ.

Важно отметить, что если морфометрически на 3 сутки определялись молодые формы фибробластов, то на 7 сутки в гистологических препаратах визуализировали

разные по степени зрелости фибробластные клетки (молодые, зрелые и старые фиброциты), при этом преобладали зрелые формы (крупные отростчатые клетки с богатой органеллами и слабобазофильной цитоплазмой).. Это способствовало синтезу, формированию и созреванию коллагена.

Важным признаком заживления ран на 7-е сутки после моделирования раневого процесса явились признаки регенерации эпидермиса от краев раны к центру, визуализированные во всех ранах. Полной эпителизации (всей поверхности раны, оба края и центр) не было зарегистрировано ни в одном случае. Во всех ранах эпителизация была краевой, однако степень ее различалась. В одних ранах новообразованный эпителий покрывал менее трети поверхности края раны, в других ранах визуализировали почти полную эпителизацию за исключением отрезка, занимающего около 50% центральной части раны. Наименее организован краевой вал эпидермиса (по количеству его слоев) был в группах Контроль_фр, ДГКТ и ДХ. Наиболее развитым эпидермис был в ранах групп ПСДЦ+МСК, ПСДЦ, МСК и Контроль_мск. В этих группах было зарегистрировано наибольшее количество и размерность локаций будущих почек роста эпидермиса, из которых впоследствии развиваются волосы, сальные железы и др. производные кожи. Причем наилучшая эпителизация и наибольшее количество сформированных почек роста было в группе ПСДЦ+МСК (Рисунки 49-56).

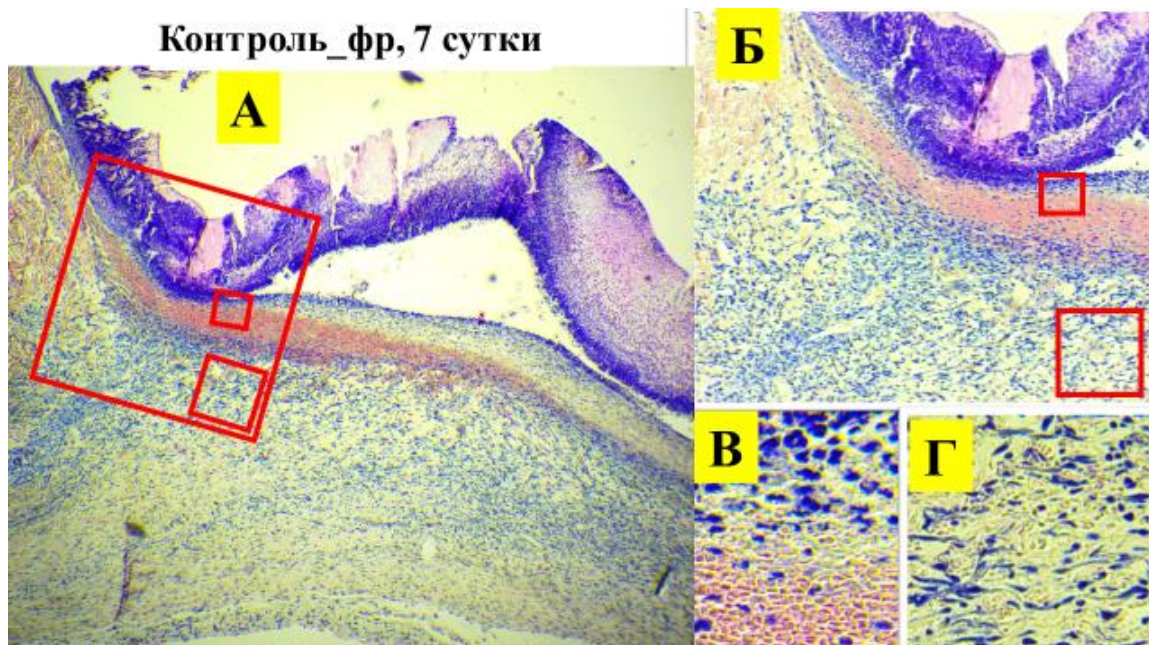


Рисунок 49 - Рана группы Контроль_фр на 7 сутки исследования (окраска Гематоксилин-эозин). А (ув. X40): Край и центр раны. Эпителизация только начала края раны, тонкий эпидермис быстро переходит в 1-слойный эпителий и прерывается. Вся рана покрыта плотным струпом, густо инфильтрированным лейкоцитами. Визуализируется кровоизлияние в поверхностные слои (МСК опление безъядерных клеток гемопоэтического ряда).

Б, В и Г - фрагменты среза А.

Б (ув. X100): Край раны, новообразованный тонкий 1-2-слойный эпидермис, покрывающий менее 10% края раны. Начало формирование дермы (без разделения на слои). Обильная инфильтрация фибробластами и лейкоцитами.

В (ув. X800): На поверхности раны преобладают лейкоциты (круглые клетки синего цвета) над зоной кровоизлияния.

Г (ув. X400): В толще раны фибробластов несколько больше, чем лейкоцитов.

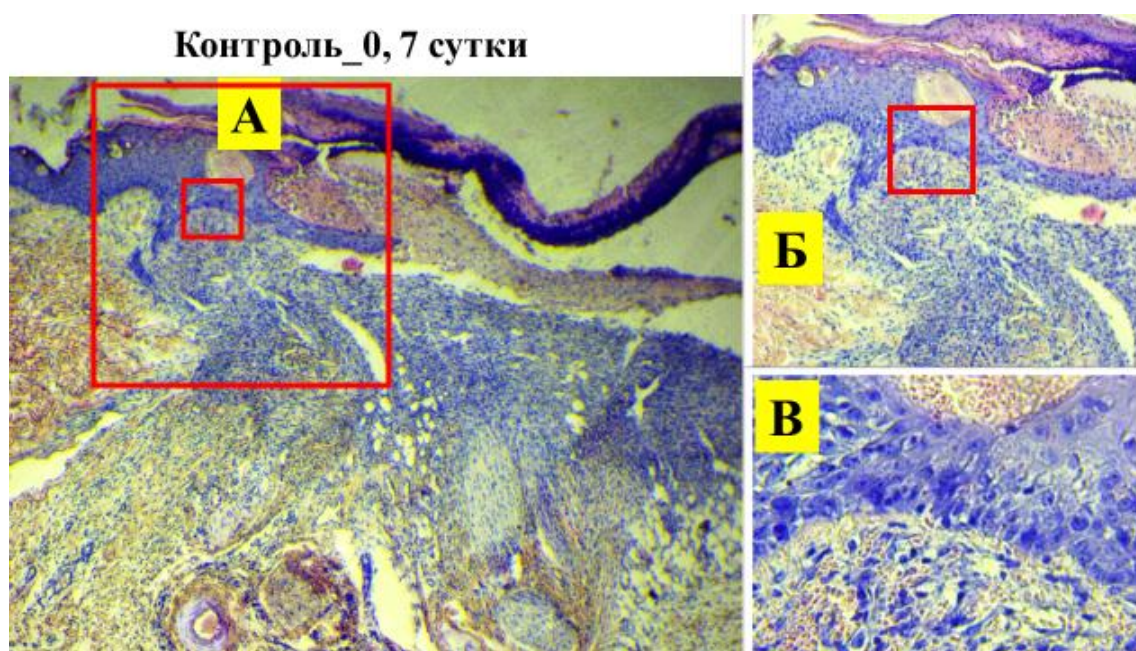


Рисунок 50 - Рана группы Контроль_0 на 7 сутки исследования (окраска Гематоксилин-эозин).

А (ув. X40): Край и центр раны. Эпителизация около 50% края раны. Вся рана покрыта широким струпом разной плотности, инфильтрированным лейкоцитами. Б, В - фрагменты среза А.

Б (ув. X100): Край раны. Вначале эпидермис многослойный, далее в нем визуализируется гематома, после которой эпидермис истончается по направлению к центру и прерывается. Начало формирования дермы. Обильная инфильтрация фибробластами и лейкоцитами.

В (ув. X400): Выбран фрагмент среза раны с хорошо сформированным эпителием (все слои эпидермиса, кроме рогового). Число фибробластов несколько больше, чем лейкоцитов; имеются внесосудистые эритроциты.

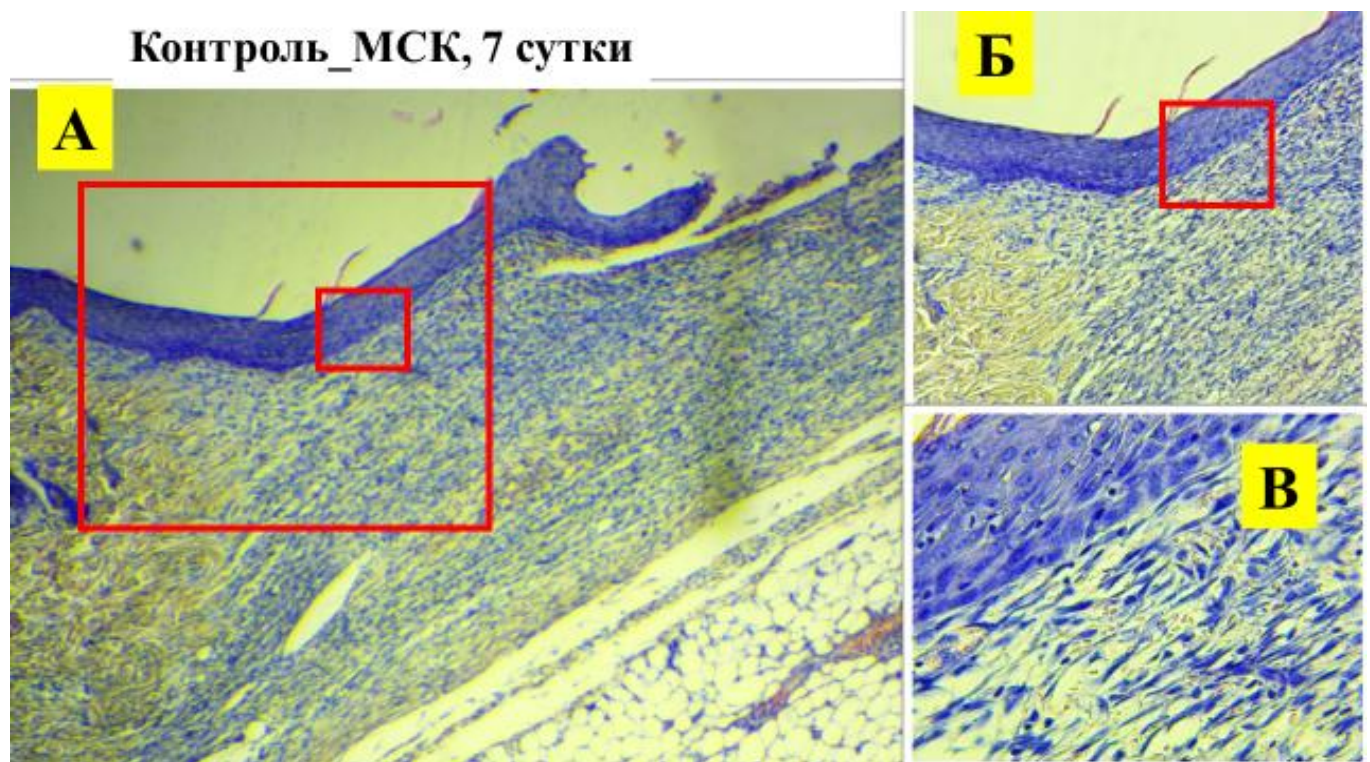


Рисунок 51 - Рана группы Контроль_мск на 7 сутки исследования (окраска Гематоксилин-эозин).

А (ув. X40): Эпителизация всего края раны осуществляется по направлению к центру.

Новообразованный многослойный ороговевающий эпителий постепенно истончается и прерывается, центр раны еще не эпителизирован.

Б (ув. X100): Край раны, новообразованные эпидермис и дерма, сосочковый слой пока не выражен. Единичный неоангиогенез.

В (ув. X400): Полностью сформированный многослойный эпидермис, присутствуют все его слои, от внутреннего тонкого базального до отшелушивающегося наружного рогового. Обильная инфильтрация тканей дермы клетками. Фибробласты (клетки неправильной формы) преобладают над лейкоцитами (круглые клетки).

Г (ув. X400): Начало формирования нового сосуда, ограниченного одним слоем эндотелиоцитов; среди фибробластов выявляются короткие тонкие нити (желтые блестящие) межклеточного вещества.

Новообразованные единичные сосуды, ограниченные одним слоем эндотелиоцитов, некоторые из них уже заполнены эритроцитами.

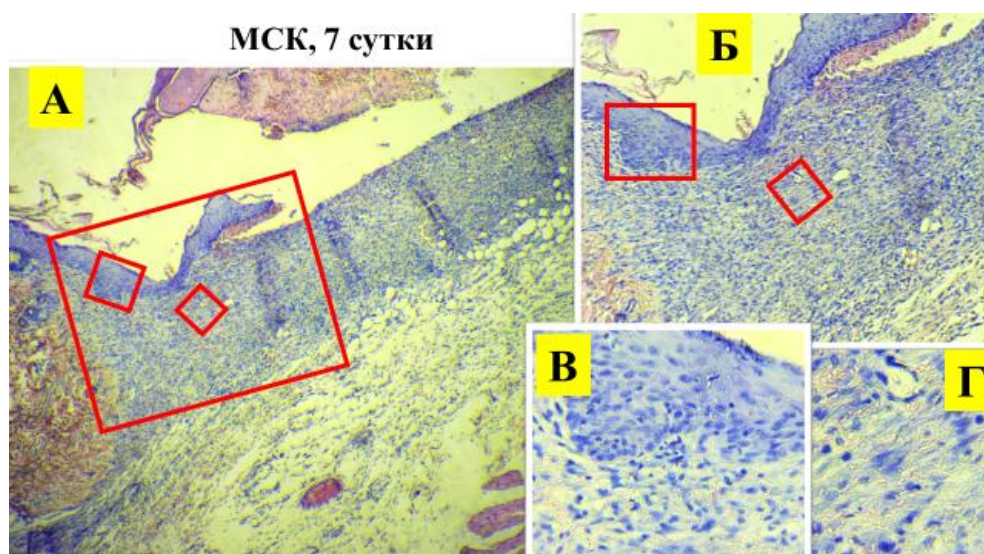


Рисунок 52 - Рана группы МСК на 7 сутки исследования (окраска Гематоксилин-эозин).
 А (ув. X40): Эпителизация большей части края раны осуществляется по направлению к центру. Новообразованный многослойный ороговевающий эпителий постепенно истончается и прерывается, поэтому центр раны не эпителизирован. Видны остатки струпа, под которым прерывается эпидермис.
 Б, В и Г - фрагменты среза А. Б) (ув. X100): Край раны, новообразованные эпидермис и дерма. Единичный неоангиогенез. В) (ув. X400): В сосочковом слое дермы фибробласты (клетки неправильной формы) преобладают над лейкоцитами (круглые клетки). По сравнению с контрольными ранами плотность клеток меньше. Выбран фрагмент среза со сформированным многослойным эпидермисом. Г) (ув. X400): Начало формирования нового сосуда, ограниченного одним слоем эндотелиоцитов; среди фибробластов выявляются короткие тонкие нити (желтые блестящие) межучного вещества.

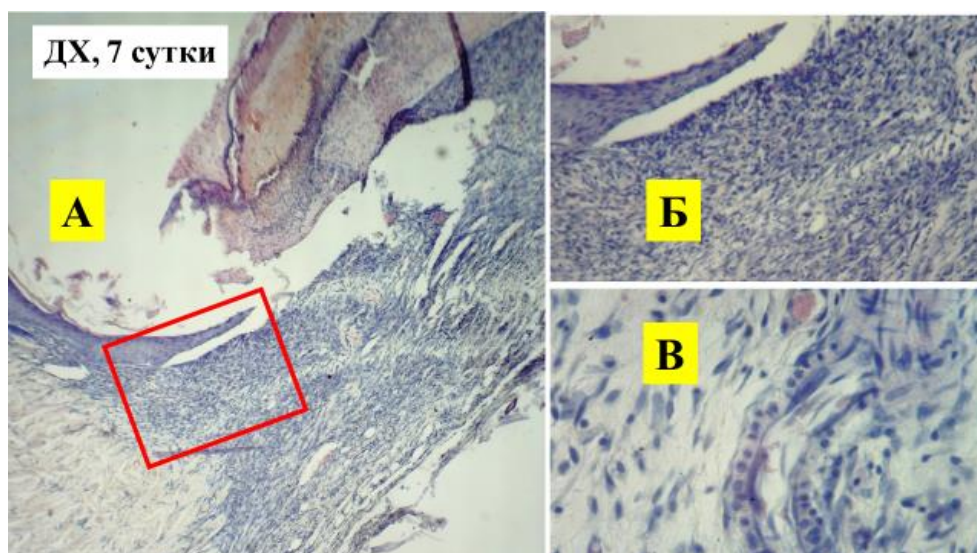


Рисунок 53 - Рана группы ДХ на 7 сутки исследования (окраска Гематоксилин-эозин).
 А (ув. X40): Край раны. Начало эпителизации по направлению от периферии к центру. Эпидермис быстро истончается, переходит в 1-2-слойный и прерывается, покрывая в общей сложности до трети края раны. Вся рана покрыта широким плотным струпом, густо инфильтрированным лейкоцитами.
 Б (ув. X100): Край раны, место прерывания эпителия. Начало формирование дермы, обильно инфильтрированной фибробластами и лейкоцитами.
 В (ув. X400): Неоангиогенез. В толще раны фибробластов несколько больше, чем лейкоцитов.

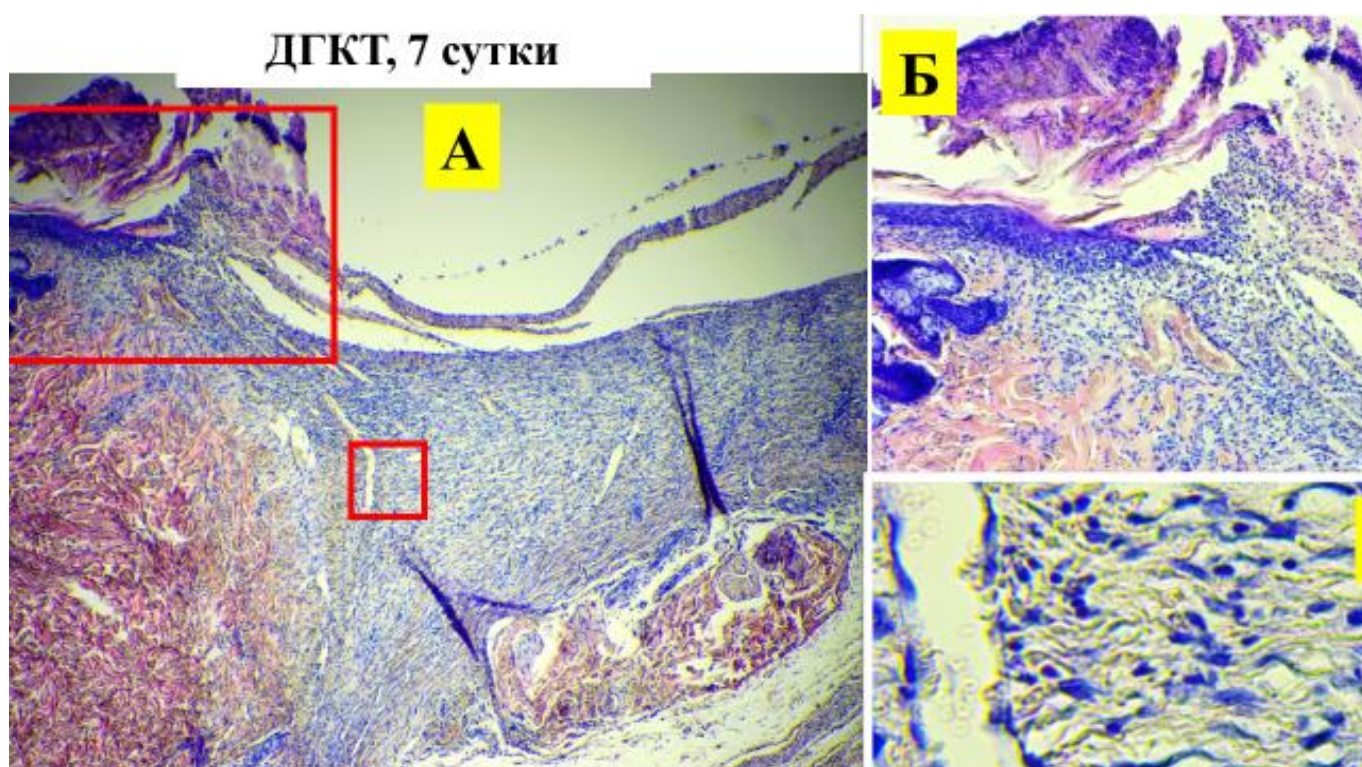


Рисунок 54 - Рана группы ДГКТ на 7 сутки исследования (окраска Гематоксилин-эозин).
 А (ув. X40): Край и центр раны. Самое начало эпителизации по направлению от периферии к центру. Тонкий эпидермис покрывает менее 10% края раны. Вся рана покрыта широким плотным струпом, густо инфильтрированным лейкоцитами.
 Б (ув. X100): Край раны, место прерывания эпителия, локализуется над неповрежденными тканью краями раны, где визуализируется старый (зрелый) коллаген . Начало формирования дермы, обильно инфильтрированной разными типами клеток. Поверхность раны больше инфильтрирована лейкоцитами.
 В (ув. X400): Неоангиогенез. Сформирован широкий сосуд, стенки которого представлены одним слоем эндотелиоцитов, внутри сосуда имеются клетки крови (безъядерные эритроциты). В толще раны фибробластов больше, чем лейкоцитов.

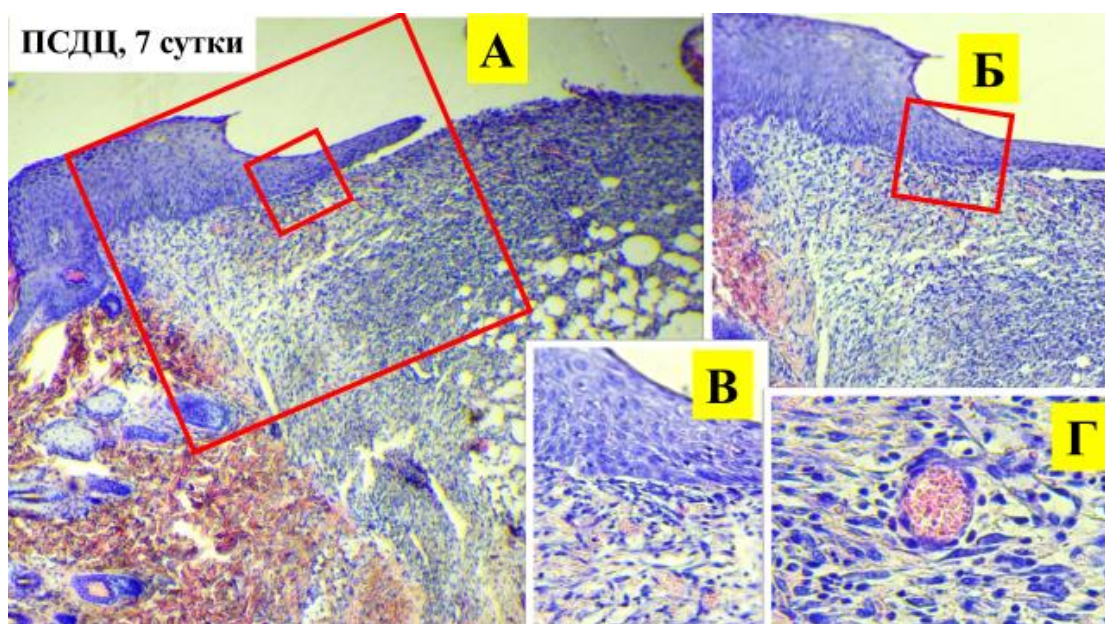


Рисунок 55 - Рана группы ПСДЦ на 7 сутки исследования (окраска Гематоксилин-эозин).

А (ув. Х40): Эпителизация края раны. Многослойный эпителий истончается, переходит в 2-слойный, потом в 1-слойный и прерывается.

Б, В и Г - фрагменты среза А. Б). (ув. Х100): Край раны, эпидермис и дерма. Возле самого края раны появляется почка роста придатка кожи. Неоангиогенез. В). (ув. Х400): В сосочковом слое дермы фибробласты преобладают над лейкоцитами. В ране преобладают фибробласты (клетки неправильной формы) над лейкоцитами (круглые клетки). Выбран фрагмент среза с полностью сформированным многослойным плоским ороговевающим эпителием. Г) (ув. Х800): Новообразованный сосуд, ограниченный одним слоем эндотелиоцитов, заполненный клетками крови (эритроциты) в новообразованном слое дерме, где фибробласты значительно преобладают над лейкоцитами. Много зрелых фиброцитов.

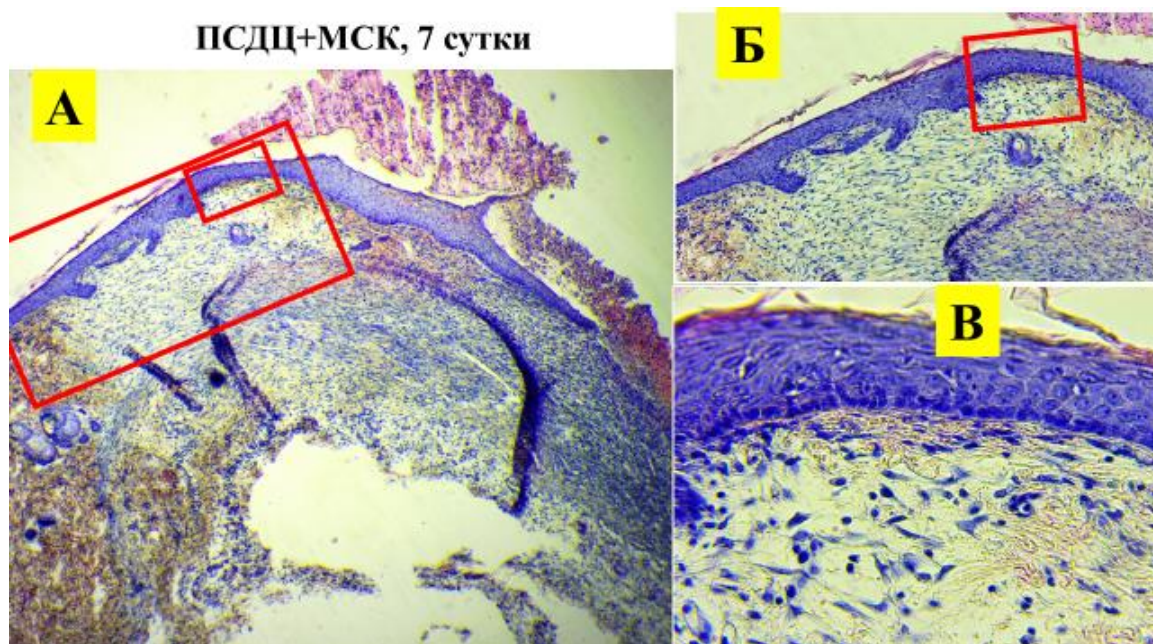


Рисунок 56 - Рана группы ПСДЦ+МСК на 7 сутки исследования (окраска Гематоксилин-эозин, ув. х40, х100, х800).

А (ув. Х40): Эпителизация края и части центра раны. Эпидермис. Край на всем протяжении покрыт новообразованным многослойным эпителием (все слои хорошо сформированы), центр раны вначале покрыт полнослойным новообразованным эпителием, далее он истончается,

переходит в 2-слойный, потом в 1-слойный эпителий и прерывается. Таким образом с этого края раны около половины центра раны эпителизирована. Центр раны с распространением на край раны покрыт струпом, под который заползает эпителий и в последующем прерывается.

Б и В - фрагменты среза А.

Б (ув. X100): Край раны, эпидермис и дерма (хорошо развитый сосочковый слой и верхние слои сетчатого слоя). Новообразованный эпидермис хорошо сформирован, появляются почки роста, придатки кожи. Визуализируется волосяной фолликул. В сосочковом слое дермы фибробласты преобладают над лейкоцитами.

В (ув. X800): В ране преобладают фибробласты (клетки неправильной формы), лейкоцитов (круглые клетки) очень мало. Фибробласты представлены в формах разной степени зрелости. Концентрация клеток меньше, чем в ране группы ПСДЦ. Несмотря на то, что выбран фрагмент среза на границе край/центр раны с наиболее визуальным тонким слоем эпидермиса, видно, что эпидермис хорошо сформирован, присутствуют все его слои, от внутреннего тонкого базального до отшелушивающегося наружного рогового. В дерме визуализируются образованные фибробластами волокна коллагена (желтые волокна в разных слоях дермы).

В таблице 31 представлена оценка послойной организации новообразованного эпидермиса на всей поверхности края ран на 7 сутки в разных группах, из которой следует, что комбинация полимерного и клеточного средства является наиболее лучшим способом заживления ран к 7 суткам.

Таблица 31 - Послойная характеристика формирования эпидермиса на всей поверхности края ран на 7 сутки (n)

Группы	Эпидермис не четко дифференцирован на слои	2 слоя	3 и более слоев с четкой дифференциацией
Кфр	4	3	0
Контроль_мск	3	3	1
ПСДЦ	3	2	2
ПСДЦ+МСК	0	1	6
Стволовые клетки	5	1	1
ДХ	6	1	0
ДГКТ	2	5	0

Степень зрелости коллагена была диагностирована при визуализации гистологических срезов, окрашенных по методу Ван-Гизона, при этом выполняли сравнение интенсивности окрашивания старого коллагена в интактных краях среза с интенсивностью окрашивания и структурности новообразованного коллагена. Была установлена следующая последовательность групп ран от наименее зрелого к наиболее зрелому новообразованному коллагену на 7 сутки исследования: Кфр и К0 < ДХ и ДГКТ < Контроль_мск и ПСДЦ < МСК и ПСДЦ+МСК (Рисунок 57).

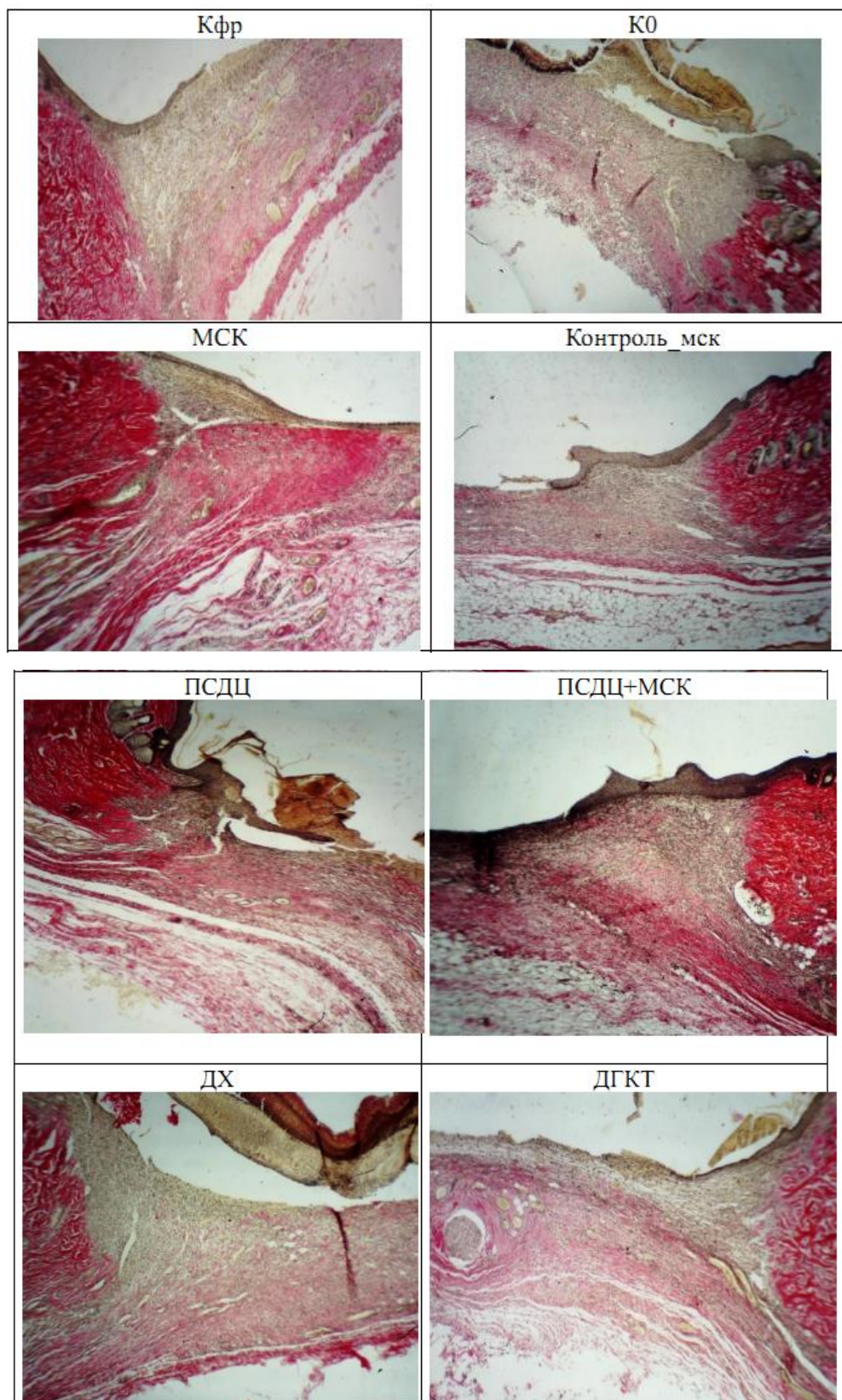


Рисунок 57 - Ткань края и центра ран разных групп животных на 7 сутки раневого процесса в разных группах ран. Окраска по Ван-Гизону (визуализация коллагена и степени его зрелости). Увеличение x40.

3.3.3. Состояние ран к исходу 14-ти суток исследования

На 14-е сутки исследования воспалительные процессы должны завершиться, пролиферация переходит в фазу ремоделирования, что морфологически проявляется формированием новых тканей всех слоев эпидермиса и дермы (включая новообразованные сосуды в ней), а также завершение эпителизации поверхности ран.

В связи с завершением процесса синтеза основного межклеточного матрикса, который теперь созревает, а также завершением процесса воспаления, в тканях разных отделов ран на 14 сутки исследования было зарегистрировано уменьшение численности разных клеток (фибробластов и лейкоцитов) по сравнению с 7 сутками в среднем в разных группах в 1,1-3,1 раза в центре и в 1,1-3,2 раза в краях ран. При этом число лейкоцитов в большинстве групп стало меньше, чем было даже вначале исследования, на 3 сутки после моделирования ран (Рисунок 58).

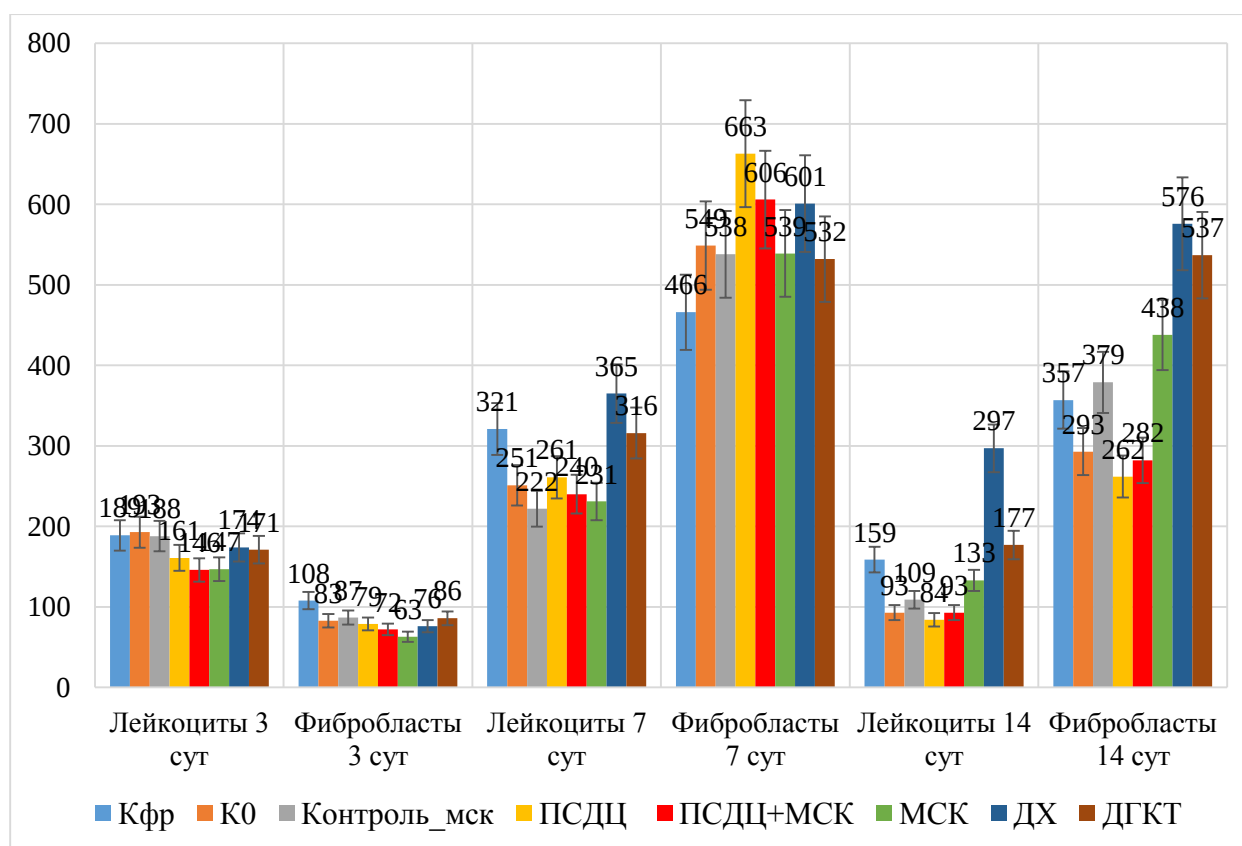


Рисунок 58 - Число лейкоцитов и фибробластов в тканях разных отделов ран разных групп на 3, 7 и 14 сутки исследования (в среднем, абс.)

Лучше всего, в наибольшей степени, клеточная популяция в тканях центра и краев ран сократилась в группах ПСДЦ и ПСДЦ+МСК ($p < 0,05$). В наименьшей степени клеточная численность сократилась в группах ДХ и ДГКТ, причем это уменьшение относительно 7 дня было недостоверным ($p > 0,05$), а в центре ран группы ДГКТ была отмечена недостоверная тенденция к увеличению числа клеток.

Важно отметить, что если на 7 сутки показатель отношения фибробластов к лейкоцитам в краях ран был значимо выше, чем в центре, то на 14 сутки соотношение фибробласты/лейкоциты в краях ран и в центре ран было почти одинаковым (Рисунок 59). Это говорит о сопоставимой вовлеченности тканей центра и краев ран в процесс регенерации на 14 сутки после моделирования острой раны. Следовательно, и центр и периферия ран одинаково ответственны за формирование и качество послеоперационного рубца.

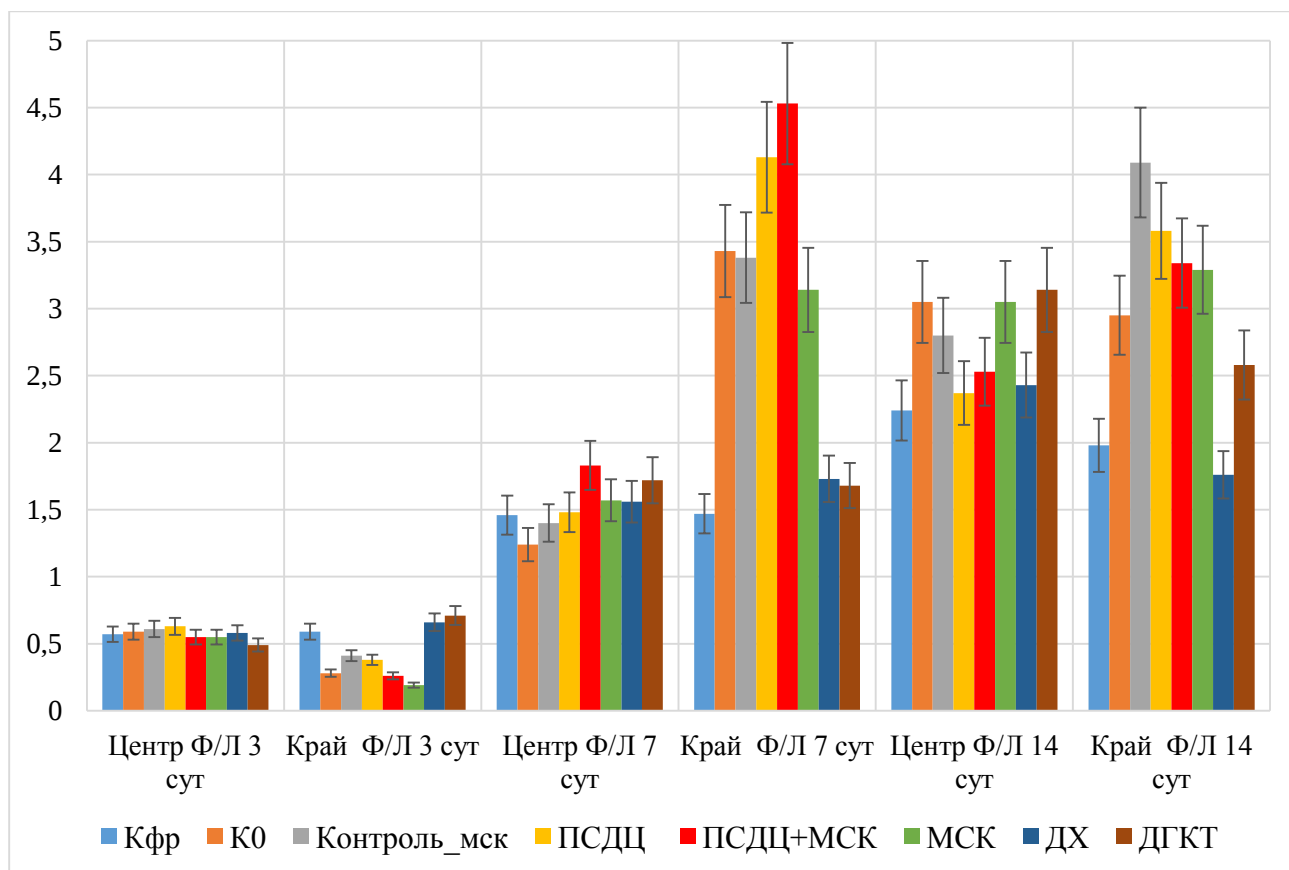


Рисунок 59 - Показатель отношения фибробластов к лейкоцитам в центре и краях ран разных групп на 3, 7 и 14 сутки исследования.

На 3 сутки в среднем по всей ране соотношение фибробласты/лейкоциты составило 0,5, варьируя в разных группах (по Me) в пределах 0,37-0,56 (минимум – в группе МСК, максимум – Кфр). На 7 сутки оно в среднем составило 2,1 (1,48-2,59 в разных группах, минимум – в группах Кфр и ДХ, максимум – в группах ПСДЦ и ПСДЦ+МСК). На 14 сутки в среднем по всей ране соотношение фибробласты/лейкоциты составило 2,9; в разных группах 2,1-3,5 (наименьшее – в группах ДХ (2,06) и Кфр (2,17), наибольшее – в группах МСК (3,37) и Контроль_мск (3,54)).

Таким образом, выявлена следующая закономерность клеточной представленности в ране разных клеток на разных этапах заживления ран. На 3 сутки (в фазе экссудативного воспаления) число клеток в ране наименьшее по сравнению с последующими сроками наблюдения, при этом в ранах достоверно (в 1,5 раза) преобладают лейкоциты над фибробластами, которые мигрируют в очаг повреждения из рядом расположенных неповрежденных сосудов кровеносного русла. При этом соотношение фибробласты/лейкоциты в 1,5 раза выше в центре ран, чем в ее краях (в среднем 0,57 и 0,39 соответственно). То есть лейкоцитарная инфильтрация, характерная для 3 суток заживления ран, превалирует в центре ран.

На 7 сутки общее число клеток в зоне повреждения значительно увеличилось в среднем во всех группах в 3,3 раза по сравнению с 3 сутками, в большей степени в крае ран (в 2,6 раза в центре и в 4,2 раза в краях ран, $p < 0,05$). Преимущественно это произошло за счет увеличения численности фибробластов, которых было в 2,1 раза больше, чем лейкоцитов. Соотношение фибробласты/лейкоциты на 7 сутки было в 1,9 раза выше в краях ран, чем в центре (в среднем 1,53 в центре и 2,92 в краях ран, $p < 0,05$). То есть на 7 сутки характерна картина пролиферации с активным участием фибробластов, особенно по краям ран, что обеспечивает заживление ран преимущественно по направлению с краев ран к центру. Воспалительные процессы с участием лейкоцитов угасают, в наибольшей степени они представлены на 7 сутки в центре ран.

На 14 сутки после моделирования ран общее число клеток значительно увеличилось в среднем во всех группах в 1,5 раза по сравнению с 7 сутками (в среднем с 826 до 550 клеток/мм², $p < 0,05$), хотя оно и было в 2,1 раза больше, чем на 3 сутки ($p < 0,05$). Число клеток в центре и краях ран было на 14 сутки одинаковым (в среднем по всем группам 574 клеток/мм² в центре и 526 клеток/мм² в краях ран, $p > 0,05$). Это говорит об активном репаративном процессе, идущем в сопоставимой степени во всех отделах раны, при участии преимущественно фибробластов, которых было в 2,89 раза больше, чем лейкоцитов (в среднем в 2,7 раза в центре и 2,94 раза в краях ран разных групп, $p > 0,05$). То есть, несмотря на сокращение численности клеточной популяции в ране, процентное содержание фибробластов достоверно увеличивается относительно всех предыдущих точек исследования, причем это отношение к 14 суткам уравнивается в разных отделах раны. *В большинстве групп на 14 сутки лейкоциты элиминируются, их численность ниже, чем она было на 3 сутки, за исключением ран групп Кфр, ДХ.*

Анализ числа и процентного содержания лейкоцитарных и фибробластных клеток в ранах на 14 сутки после моделирования показал, что на 14 сутки существенные изменения в ткани ран всех групп были в большей степени связаны с сокращением численности клеток, особенно лейкоцитарных, при этом концентрация фибробластов увеличивалась, а соотношение клеток в разных отделах ран уравнивалось, свидетельствуя об одинаковой интенсивности регенераторных процессов в центре и краях ран.

Число лейкоцитов в ткани ран разных групп на 14 сутки уменьшилось по сравнению с 7 сутками в 1,2-3,1 раза. Наибольшее сокращение численности лейкоцитов в среднем по всей ране было зарегистрировано в неинвазивных группах ПСДЦ (в среднем с 261 лейкоцитов/мм² до 84 лейкоцитов/мм², т.е. в 3,11 раза, $p < 0,05$), ПСДЦ+МСК (в 2,58 раза, $p < 0,05$) и К0 (в 2,69 раза, $p < 0,05$). Наименьшее сокращение численности лейкоцитов в среднем по ране было зарегистрировано в инвазивных группах МСК (в среднем в 1,78 раза, $p < 0,05$) и ДГКТ (в 1,74 раза,

$p < 0,05$), а также в группе ДХ (в среднем с 365 лейкоцитов/мм² до 297 лейкоцитов/мм², т.е. в 1,23 раза).

В ткани центра ран на 14 сутки число лейкоцитов было наименьшим в группах ПСДЦ (Me = 99 лейкоцитов/мм²), ПСДЦ+МСК (Me = 123 лейкоцитов/мм²) и К0 (Me = 128 лейкоцитов/мм²). Наибольшим число лейкоцитов в ткани центра ран на 14 сутки было в группах ДХ и ДГКТ. В среднем в группе ДГКТ в ткани центра ран на 14 сутки число лейкоцитов составило 224 на 1 мм², что было в 1,75 раза больше, чем в группе К0 ($p < 0,05$), в 2,26 раза больше, чем в группе ПСДЦ ($p < 0,05$), в 1,82 раза больше, чем в группе ПСДЦ+МСК ($p < 0,05$) и в 1,53 раза больше, чем в группе МСК ($p < 0,05$). В среднем в ткани центра ран группы ДХ на 14 сутки число лейкоцитов составило 253 клеток на 1 мм², что было в 1,98 раза больше, чем в группе К0 ($p < 0,05$), в 2,56 раза больше, чем в группе ПСДЦ ($p < 0,05$), в 2,06 раза больше, чем в группе ПСДЦ+МСК ($p < 0,05$), и в 1,73 раза больше, чем в группе МСК ($p < 0,05$).

Аналогичные особенности были зарегистрированы при анализе числа лейкоцитов в ткани краев ран. Наименьшим оно было в ранах групп ПСДЦ (Me = 55 лейкоцитов / мм²) и Контроль_мск (Me = 84 лейкоцитов / мм²). Наибольшим число лейкоцитов в ткани краев ран на 14 сутки было в группах ДГКТ и особенно ДХ. В среднем в группе ДХ в ткани края ран на 14 сутки число лейкоцитов составило 311 на 1 мм², что было в 5,65 раза выше, чем в группе ПСДЦ ($p < 0,05$), в 3,70 раза больше, чем в группе Контроль_мск ($p < 0,05$), в 3,05 раза больше, чем в группе ПСДЦ+МСК ($p < 0,05$), в 2,93 раза больше, чем в группе К0 ($p < 0,05$), в 2,59 раза больше, чем в группе МСК ($p < 0,05$), в 1,65 раза выше, чем в группе Кфр ($p < 0,05$) и в 1,59 раза больше, чем в группе ДГКТ ($p < 0,05$). В краях ран группы ДГКТ число лейкоцитов в среднем составило 196 на 1 мм², что было в 1,85 раза больше, чем в группе К0 ($p < 0,05$), в 2,33 раза больше, чем в группе Контроль_мск ($p < 0,05$), в 3,56 раза больше, чем в группе ПСДЦ ($p < 0,05$), в 1,92 раза больше, чем в группе ПСДЦ+МСК ($p < 0,05$), в 1,63 раза больше, чем в группе МСК ($p < 0,05$) (Таблица 32; Рисунок 60).

Таблица 32 - Число и доля лейкоцитов в центре и краях ран к исходу 14-х суток в разных группах (абс. и % на 1 мм² ткани раны)

Отдел раны	Центр		Край	
	Абс.	%	Абс.	%
Группы				
Кфр	172 168/195	31,8 30,7/36,6	188 142/206	33,6 28,9/36,5
К0	128 98/143	24,7 24,1/27,1	106 82/151	25,4 23,9/29,4
Контроль_мск	147 133/153	26,3 25,5/27,3	84 75/125	19,6 18,2/24,2
ПСДЦ	99 89/119	29,7 28,1/32,8	55 51/76	21,8 20,1/23,1
ПСДЦ+МСК	123 76/133	28,3 27,4/34,0	102 59/140	23,1 21,6/25,2
Стволовые клетки	146 127/164	24,7 24,1/25,2	120 99/142	25,0 21,9/29,6
ДХ	253 210/279	29,2 29,0/21,8	311 274/336	36,3 33,8/41,7
ДГКТ	224 207/239	24,4 23,8/26,7	196 162/238	27,9 26,5/31,5
p (Kruskal – Wallis)	0,0001**	0,0001**	0,0001**	0,0001**

Примечание: Показатели представлены в виде Ме (1я строка) и 25%/75% квантили (2я строка).

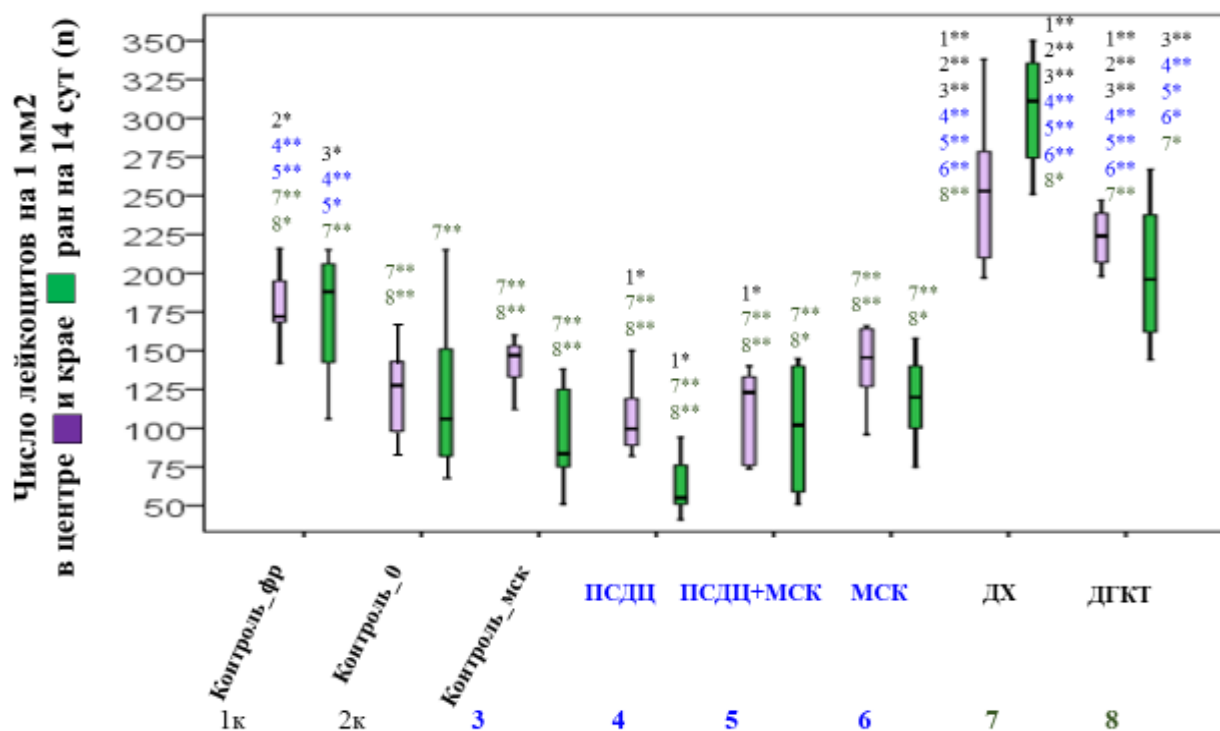


Рисунок 60 - Количество лейкоцитов в ткани центра и края ран в разных группах на 14 сутки исследования (n, на 1 мм²). Значимость межгрупповых различий по апостериорным тестам: * - p<0,05, ** - p<0,01.

Таким образом, на 14 сутки исследования лейкоцитарная инфильтрация регрессировала во всех ранах, но в меньшей степени в ранах групп ДХ и ДГКТ, что может говорить о пролонгированном провоспалительном эффекте этих лекарственных средств при лечении острых невосполительных (неинфицированных) ран. В максимальной степени это было выражено в группе ДХ. Противовоспалительный эффект, проявляющийся в достоверном снижении лейкоцитарной инфильтрации всех отделов ран даже относительно контрольных ран, было установлено только в группе ПСДЦ. Лейкоцитарная инфильтрация групп, в которых использовали клетки (МСК, Контроль_мск, ПСДЦ+МСК) не отличалась от контрольных ран (K0) и между собой. Следовательно, на 14 сутки противовоспалительного действия у МСК нет, что может быть связано с ограниченным сроком их жизни.

В наибольшей степени репаративные процессы в ране на 14 сутки зависели от клеток фибробластного дифферона, которые существенно преобладали над лейкоцитарными клетками. При этом число фибробластов к исходу 14-х суток в среднем по ранам достоверно значимо уменьшилось по сравнению с 7 сутками (в среднем в 1,23-2,53 раза) во всех группах, кроме групп ДГКТ и ДХ (Таблица 33). Установленные значимые различия по критерию Краскел-Уоллиса по всем представленным в таблице показателям позволяет обоснованно проводить апостериорные тесты и межгрупповые сравнения, определяя значимые различия.

В центре ран число фибробластов к исходу 14-х суток уменьшилось по сравнению с 7 сутками в наибольшей степени и достоверно в группах ПСДЦ+МСК (в 2,05 раза, $p<0,05$), Кфр (в 1,27 раза, $p<0,05$) и K0 в 1,22 раза). Исключение составили группы ДГКТ (число фибробластов в центре ран стало в среднем в 1,45 раза больше, чем оно было на 7 сутки исследования в этой группе, $p<0,05$) и ДХ (увеличилось в 1,09 раза, $p>0,05$). По краям ран рост количества фибробластов на 14 сутки сократился относительно 7-го дня во всех группах ран в среднем в 1,1-3,2 (минимум в группах ДГКТ (в 1,11 раза, $p>0,05$) и ДХ (в 1,26 раза); максимум в группах K0 (в 2,21 раза, $p<0,05$) и ПСДЦ (в 3,19 раза, $p<0,05$)).

Таблица 33 - Число и доля фибробластов в центре и краях ран к исходу 14-х суток в разных группах (абс. и % на 1 мм² ткани раны)

Отдел раны	Центр		Край	
Группы	Абс.	%	Абс.	%
Кфр	337 330/376	68,2 63,4/69,3	367 322/376	66,4 63,4/71,0
К0	343 307/369	75,3 72,8/75,8	308 261/367	74,6 70,6/76,1
Контроль_мск	408 360/421	73,7 72,9/74,4	341 336/368	80,4 75,8/81,8
ПСДЦ	211 209/221	70,3 67,2/71,8	227 206/263	78,2 76,8/80,1
ПСДЦ +МСК	292 201/345	71,7 68,0/72,6	337 224/399	76,9 74,8/78,3
Стволовые клетки	414 399/514	75,3 74,7/75,8	408 327/451	76,6 73,6/78,1
ДХ	614 524/713	70,8 68,1/71,0	489 405/556	63,7 58,2/66,1
ДГКТ	663 579/725	75,9 73,2/76,1	490 444/519	72,1 68,5/73,4
p (Kruskal – Wallis)	0,0001**	0,0001**	0,001**	0,0001**

Примечание: Показатели представлены в виде Me (1я строка) и 25%/75% квартили (2я строка).

Таким образом, на 14 сутки в наибольшей степени сократилось общая средняя численность фибробластов в группах ран, лечение которых выполняли посредством новых полимерных изделий (ПСДЦ – в 2,98 раза, ПСДЦ+МСК – в 2,04 раза). Именно в этих группах к исходу 14-х суток размер ран был наименьший, а также в этих было наименьшее число не только фибробластов (в среднем по ране 222 и 298 фибробластов/мм² в группах ПСДЦ и ПСДЦ+МСК соответственно), но и всех клеток как в центре ран (в среднем 309 и 414 клеток/мм², соответственно), так и в краях ран (в среднем 282 и 439 клеток/мм², соответственно). Это может свидетельствовать в пользу ускорения заживления ран, более быстрого формирования межклеточного матрикса и всех слоев кожи, в связи с чем в этих ранах роль клеточной инфильтрации уже регрессирует.

Максимальное число фибробластов было в ранах групп ДХ (в среднем 614 фибробластов/мм² в центре и 489 фибробластов/мм² в краях ран, что было в 2,91 раза и 2,15 раза больше, чем в группе ПСДЦ соответственно в центре и крае ран

($p < 0,05$), и соответственно в 2,10 раза и 1,45 больше ($p < 0,05$), чем в группе ПСДЦ+МСК) и ДГКТ (в среднем 663 фибробластов/мм² в центре и 490 фибробластов/мм² в краях ран, что было в 3,14 раза и 2,16 больше, чем в группе ПСДЦ соответственно в центре и краях ран ($p < 0,05$), и соответственно в 2,27 раза и 1,45 раза больше ($p < 0,05$), чем в группе ПСДЦ+МСК). Помимо этого, группы ДГКТ и ДХ по показателям численности фибробластов в центре и краях ран статистически значимо отличались в большую сторону от всех контрольных групп и групп, раны которых лечили прогениторными клетками системно или местно ($p < 0,05$). Кроме того, число фибробластов в центре и крае ран было статистически неразличимым во всех группах, кроме групп ДХ и ДГКТ, в которых в центре ран фибробластов было достоверно в 1,26 раза и 1,35 раза, соответственно, больше, чем в краях ран (Рисунок 61).

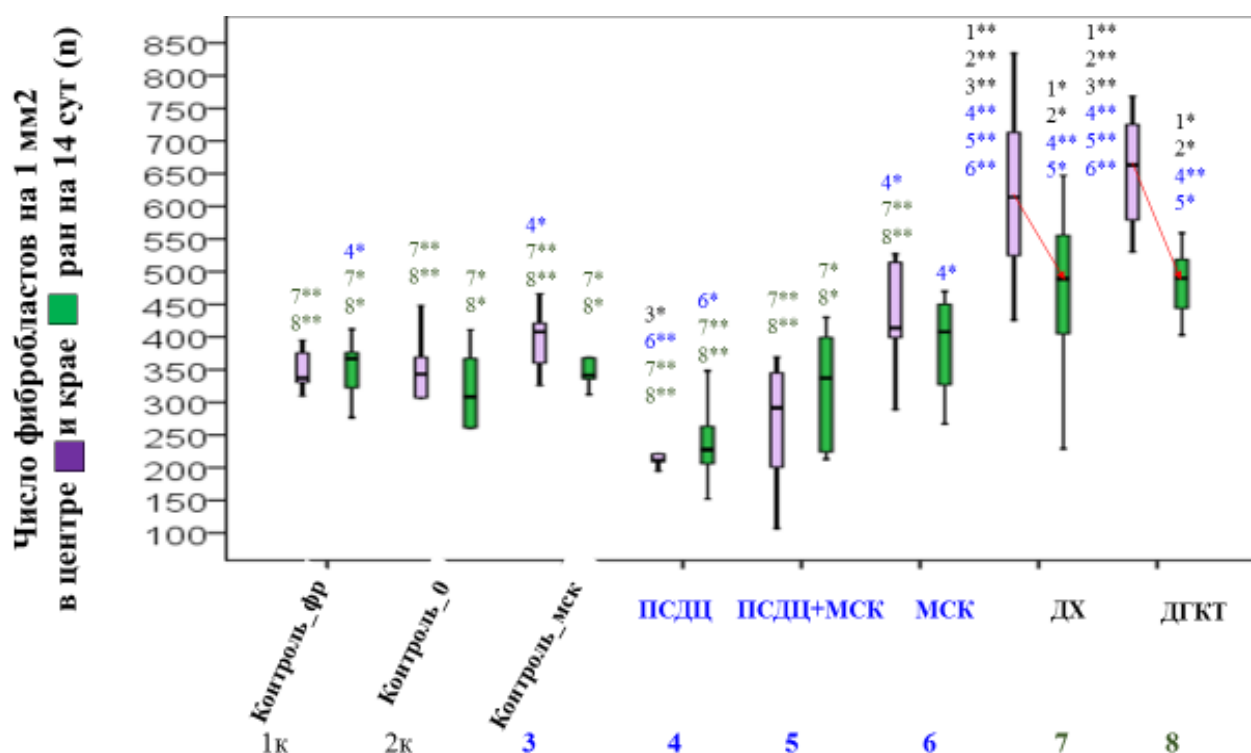


Рисунок 61 - Число фибробластов в ткани центра и края ран в разных группах на 14 сутки исследования (n, на 1 мм²). Значимость межгрупповых различий по апостериорным тестам: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$.

Долевое содержание фибробластов в тканях центра ран на 14 сутки исследования в среднем (Me) в разных группах было на уровне 66,9-77,9% с

межквартильным размахом 64-80%. В центре ран процентное содержание фибробластов было наименьшим в группах Кфр (Ме = 68,2%) и ПСДЦ (Ме = 70,3%). Наибольшим долевым содержанием фибробластов в центре ран было на 14 сутки в группах ДГКТ (Ме = 75,9%, что значимо превосходило этот показатель групп Кфр в 1,11 раза ($p < 0,05$) и ПСДЦ в 1,08 раза ($p < 0,05$)), а также К0 и МСК (Ме = 75,3%, что значимо превосходило этот показатель групп Кфр в 1,10 раза ($p < 0,05$) и ПСДЦ в 1,07 раза ($p < 0,05$)).

В краях ран по показателю процентного содержания фибробластов на 14 сутки было установлено больше различий между группами, чем в центре ран. В среднем (Ме) данный показатель в разных группах варьировал от 63,7% до 80,4% с межквартильным размахом 63-82%. Выявлено статистически значимое различие, демонстрирующее то, что в краях ран частота встречаемости фибробластов была значимо выше, чем в центре ран, только в 3 группах: Контроль_мск (в среднем в 1,09 раза, $p < 0,05$), ПСДЦ (в среднем в 1,11 раза, $p < 0,05$), ПСДЦ+МСК (в среднем в 1,07 раза, $p < 0,05$). В этих же группах прослеживалась аналогичная разница и на 7 сутки. В противоположность этому, процент фибробластов в краях ран был меньше, чем в центре в группах ДГКТ (в среднем в 1,05 раза, $p > 0,05$) и ДХ (в среднем в 1,11 раза, $p < 0,05$). В крае ран процентное содержание фибробластов на 14 сутки было наименьшим в группах ДХ (Ме = 63,7%) и Кфр (Ме = 66,4%). Наибольшим долевым содержанием фибробластов в краях ран было на 14 сутки в группах Контроль_мск (Ме = 80,4%, что значимо превосходило этот показатель групп Кфр в 1,21 раза ($p < 0,05$), ДХ в 1,25 раза ($p < 0,05$) и ДГКТ в 1,12 раза ($p < 0,05$)), а также ПСДЦ (Ме = 78,2%, что значимо превосходило этот показатель групп Кфр в 1,18 раза ($p < 0,05$) и ДХ в 1,23 раза ($p < 0,05$)) (Рисунок 62).

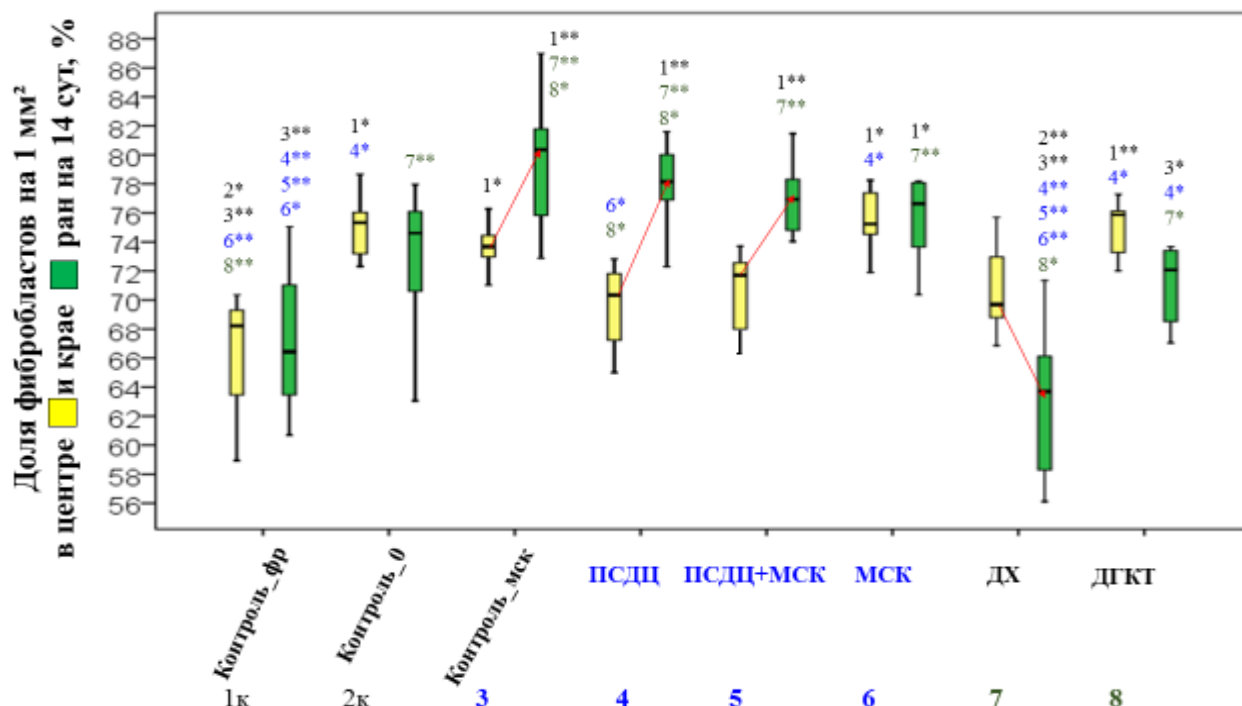


Рисунок 62 - Доля фибробластов в ткани центра (желтый) и края ран (зеленый) разных групп на 14 сутки исследования (в %). Значимость межгрупповых различий по апостериорным тестам: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$; стрелками указано значимое различие показателя в центре и крае раны в пределах одной группы при $p < 0,05$.

Корреляционный анализ размера ран и морфометрических показателей на 14 сутки, который был выполнен только по показателям 56 ран у крыс, выведенных на 14 сутки исследования, показал, что если на 7 сутки исследования успех заживления зависел от наибольшего числа клеток в ране, преимущественно это касалось фибробластов, то на 14 сутки исследования наименьший размер площади ран был связан с меньшим числом клеток, причем сильнее это зависело от сокращения лейкоцитов (связь умеренной силы: $r = 0,385$, $p < 0,01$), чем фибробластов (слабая, но достоверная связь: $r = 0,288$, $p < 0,01$). Процент фибробластов или отношение фибробластов/лейкоциты при благоприятном течении ранозаживления и меньшем размере ран на 14 сутки был наибольшим (связь умеренной силы: $r = -0,372$, $p < 0,01$). Аналогичным образом и с большей силой связи коррелировали процент сокращения площади ран с числом лейкоцитов (связь умеренной силы: $r = 0,451$, $p < 0,01$), фибробластов (связь умеренной силы: $r = 0,314$, $p < 0,01$) и отношением фибробласты/лейкоциты (связь умеренной силы: $r = -0,425$,

$p < 0,01$). Больше достоверных корреляций было установлено по показателям края ран, чем по ее центру. Самая сильная взаимосвязь была установлена между показателем процента сокращения площади ран на 14 сутки относительно размера ран в день моделирования с показателем процентного содержания фибробластов. Чем больше сократилась рана, тем больше была концентрация фибробластов в краях ран и, соответственно, меньше была концентрация лейкоцитов (связь средней силы: $r = 0,526$, $p < 0,01$) (таблица 34).

Таблица 34 - Корреляционный анализ размера ран и морфометрических показателей на 14 сутки (представлены значения r , превышающие 0,2 и имеющие $p < 0,05$)

Отдел раны	Показатель	Площадь ран на 14 сутки, мм ²	Изменение площади ран к 14 сут (размер на 0 сут – на 14 сут, в мм ²)	Изменение размера ран к 14 суткам по сравнению с днем 0, в %
Центр	Общее число клеток (абс.)	0,304*	0,305*	0,337*
	Число фибробластов (абс.)	0,273*	0,262*	0,293*
	Число лейкоцитов (абс.)	0,356**	0,389**	0,422**
Край	Общее число клеток (абс.)	0,331*	0,341*	0,383**
	Число фибробластов (абс.)		0,242*	0,273*
	Число лейкоцитов (абс.)	0,424**	0,439**	0,487**
	% Фибробластов	-0,480**	-0,437**	-0,526**
	% Лейкоцитов	0,480**	0,437**	0,526**
	Фибробласты / Лейкоциты	-0,434**	-0,345**	-0,458**
В среднем вся рана	Число фибробластов (абс.)	0,288*	0,275*	0,314*
	Число лейкоцитов (абс.)	0,385**	0,420**	0,456**
	% Фибробластов	-0,372**	-0,407**	-0,454**
	% Лейкоцитов	0,368**	0,405**	0,451**
	Фибробласты / Лейкоциты	-0,353**	-0,363**	-0,425**
Изменение размера ран к 7 сут (площадь на 0 сут – на 7 сут, в мм ²)		0,579**	1	0,760**
Изменение размера ран к 7 суткам по сравнению с днем 0, в %		0,957**	0,760**	1
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$				

Таким образом, на 14 сутки репаративные процессы в ране сопровождались сокращением числа разных клеток (практически в одинаковой степени в разных отделах ран), при этом сокращение численности лейкоцитов превалировало над сокращением числа фибробластов. Поэтому на 14 сутки успех заживления ран зависел от числа и активности фибробластов, частота выявляемости которых при

разных вариантах лечения раневого процесса преобладала над лейкоцитами. Если рассматривать группы, в которых использовали инъекции (дополнительное травмирование ран), то по определмости фибробластов в тканях и дна и краев ран во всех фармакологических группах (МСК и ДГКТ) была больше, чем в ранах группы Кфр, что существенно отразилось на общей и морфологической картине процесса заживления ран. Неинвазивные группы (лекарства, наносимые на поверхность ран – группы ПСДЦ, ПСДЦ+МСК; а также интактные раны группы Контроль_мск) не отличались от группы К0 по показателю процентного содержания фибробластов. Исключение составила только группа ДХ, в краях ран которой процент фибробластов был существенно ниже чем в других группах, являясь неблагоприятным признаком.

Корреляционный анализ установил, что лучше заживали к 14 суткам те раны, в которых было меньше всех типов клеток во всех отделах ран, при этом процент содержания фибробластов был больше.

Микроскопия гистологических срезов ран животных, выведенных из эксперимента на 14 сутки

Важным морфологическим критерием заживления ран к концу 2й недели была оценка процесса их эпителизации. Полное покрытие ран эпителием выявлено в 100% ран групп ПСДЦ и ПСДЦ+МСК. Все остальные группы ран по этому показателю были хуже в разной степени. На втором месте по частоте эпителизации стояли раны групп Контроль_мск и К0 (по 71,4%, 5 из 7). Далее была группа МСК (n=4, 57,1%), при этом у 4 ран этой группы, где эпидермис полностью покрывал всю поверхность раны, слои эпидермиса были лучше сформированы, чем в группе К0. Полная эпителизация в группе ДХ была установлена только в 2 случаях (28,6%), в группе ДГКТ – только в 1 случае (14,3%). На 14 сутки эпителизация была только краевой (не было эпителия в центре ран) во всех ранах группы Кфр, что достоверно отличало эту группу от ран групп ПСДЦ, ПСДЦ+МСК, Контроль_мск, МСК и К0 ($p < 0,05$). По критерию $[X^2]$ было установлено, что раны группы ДГКТ

статистически достоверно были хуже эпителизированы, чем раны групп ПСДЦ, ПСДЦ+МСК, Контроль_мск и К0 ($p < 0,05$). Раны группы ДХ были достоверно хуже эпителизированы, чем раны групп ПСДЦ и ПСДЦ+МСК ($p < 0,05$).

В большинстве ран с неполной эпителизацией в центральных отделах (где не было эпидермиса на поверхности ран) в разных группах сохранялся струп, инфильтрированный лейкоцитами (в основном, нейтрофилами).

Еще одним важным признаком оптимального процесса заживления ран было визуализация производных кожи. Под новообразованным многослойным эпидермисом, где формировалась базальная мембрана, наблюдалось образование почек роста волосяных фолликулов и сальных желез. Наибольшее число и более зрелые почки роста наблюдались в группах ПСДЦ, ПСДЦ+МСК и СК. Так, сформированные производные кожи были зарегистрированы на 14 сутки исследования в 100% ран групп Контроль_мск и ПСДЦ, в 85,7% случаев в группе МСК, в 71,4% случаев группы ПСДЦ+МСК и ДГКТ, в 57,1% случаев групп Кфр и К0. В группе ДХ сформированных производных кожи было меньше всего, только в 1 ране (14,3%), что достоверно отличало группу ДХ по этому показателю от групп Контроль_мск, ПСДЦ, ПСДЦ+МСК, МСК и ДГКТ ($p < 0,05$) (Рисунок 63).

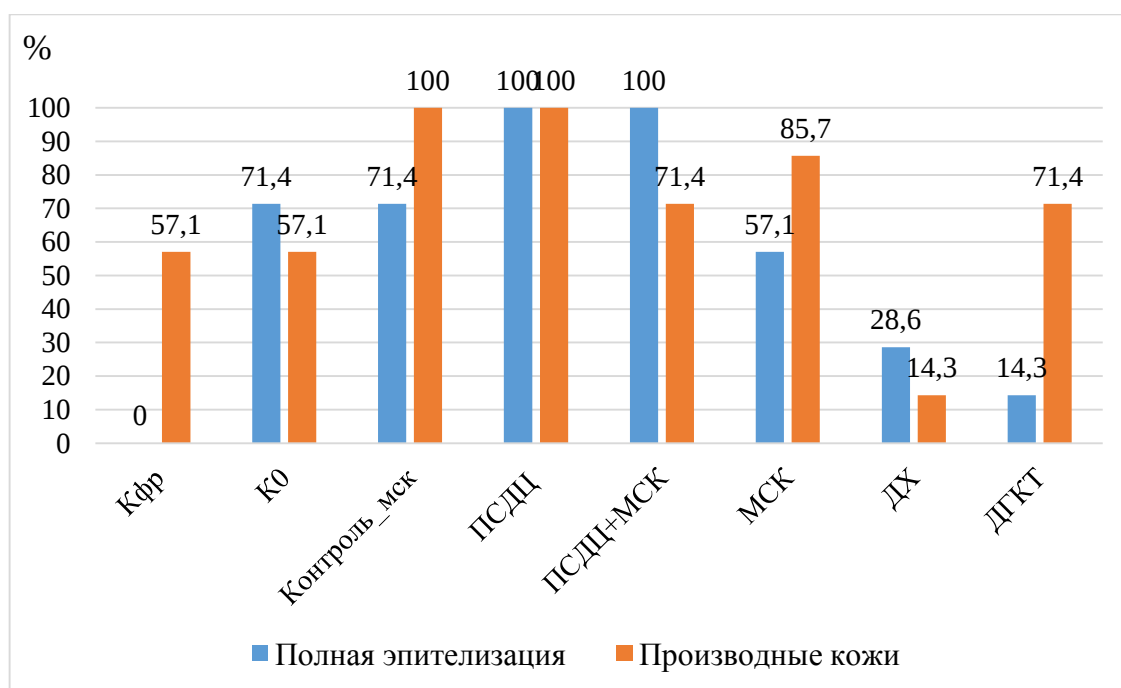
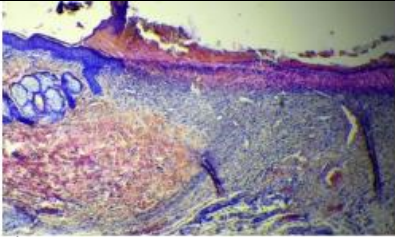
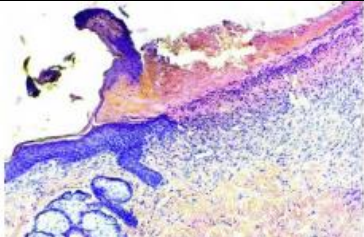
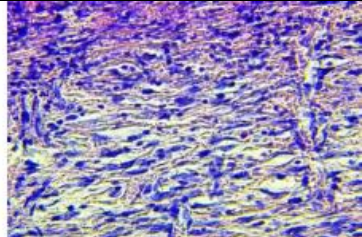
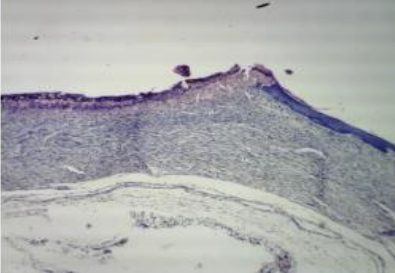
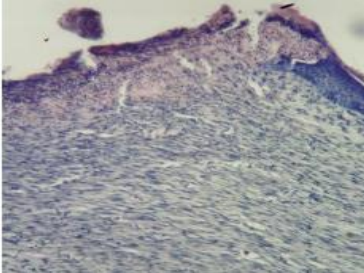
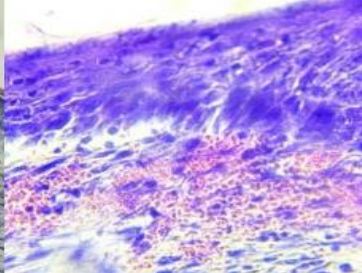
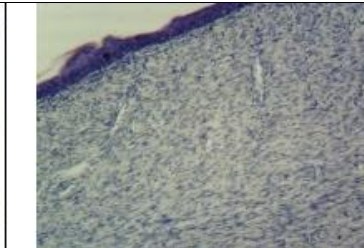
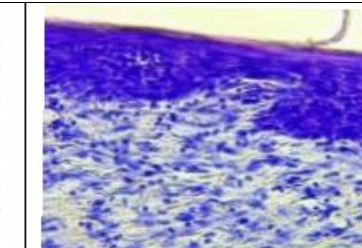
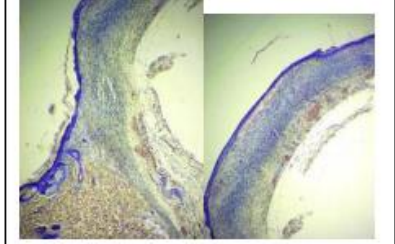
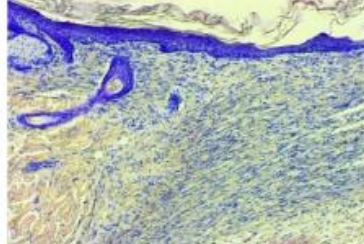
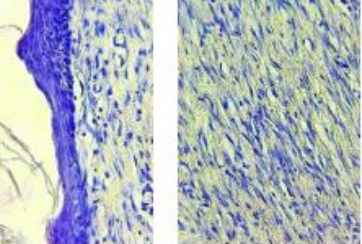
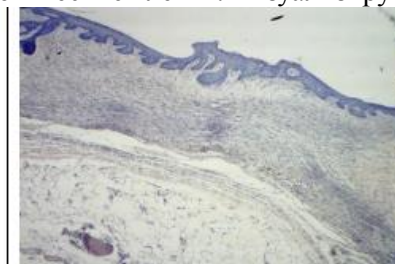
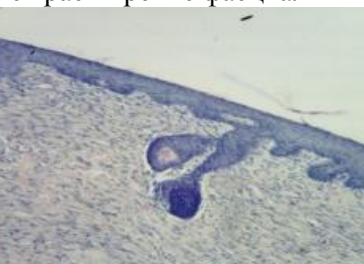
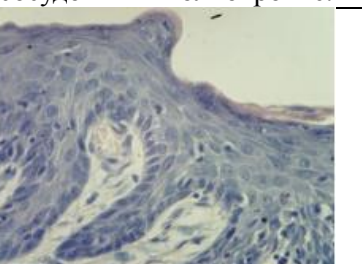


Рисунок 63 - Частота полной эпителизации всей поверхности ран и выявления сформированных производных кожи в разных группах ран на 14 сутки исследования.

Ниже представлены примеры гистологической картины ран у крыс, выведенных на 14-е сутки эксперимента, окрашенных гематоксилин-эозином (Рисунок 64). Представлены фрагменты ран каждой группы при их визуализации под разным увеличением (А-В). А. – под небольшим увеличением (ув. Х40) видно больше поверхности раны (край и ее центр), в группах с неполной эпителизацией представлен фрагмент раны края и центра раны с участком прерывания эпителия, а в группах с полной эпителизацией представлены все фрагменты раны, поверхность которой полностью покрыта эпителием. Б-В. – Под 100-800 кратным увеличением представлены наиболее значимые фрагменты раны, представленной на небольшом увеличении, например, участок прерывания эпителия и/или эпителизованный участок центрального отдела бывшей раны с визуализацией слоев эпидермиса и почечек роста. Пример гистологической картины каждой группы заканчивается описанием ключевых признаков заживления ран, которые были изучены в нашей работе.

Степень зрелости коллагена была диагностирована при визуализации гистологических срезов, окрашенных по Ван-Гизону, при этом выполняли сравнение интенсивности окрашивания старого коллагена в интактных краях среза с интенсивностью окрашивания и структурности новообразованного коллагена. Была установлена следующая последовательность групп ран от наименее зрелого к наиболее зрелому новообразованному коллагену на 14 сутки исследования: Кфр < К0 = ДХ = МСК < ДГКТ < Контроль_мск < ПСДЦ ≤ ПСДЦ+МСК (Рисунок 65).

	А. Край+Центр (ув. x40)	Б. (Ув. X100)	В. (Ув. X400(800))
Кфр			
Группа Кфр. Только краевая эпителизация, причем на большей протяженности не все слои эпителия сформированы. В центре и краях раны визуализируется струп, под которым нет эпидермиса. Большая концентрация фибробластов, а ближе к поверхности раны лейкоцитов.			
К0			
К0. Края раны эпителизированы, однако центр раны еще не полностью покрыт эпителием (эпителий истончается, залезая под струп прерывается). Однако под эпителием выявлены разные клетки гемопозитического ряда, в т.ч. безъядерные эритроциты. В дерме среди клеток преобладают фибробласты над лейкоцитами.			
Контр оль_м ск			
Группа Контроль_мск. Полная эпителизация всей поверхности раны многослойным плоским ороговевающим эпителием. Фибробласты преобладают над лейкоцитами в одинаковой степени во всех отделах раны. Визуализируются производимые фибробластами новообразованный коллаген.			
МСК			
Группа МСК. Полная эпителизация всей поверхности раны многослойным ороговевающим эпителием, который хорошо сформирован и содержит новообразованные придатки кожи по краям раны. Выраженное отшелушивание поверхностного рогового слоя. Клеток по количеству меньше, чем в контрольных группах. Фибробласты существенно преобладают над лейкоцитами. Визуализируются новообразованные коллагеновые волокна. Однако под эпидермисом имеются гемопозитические клетки. Визуализируется расширение фасциальных сосудов и их полнокровие.			
ПСДЦ			

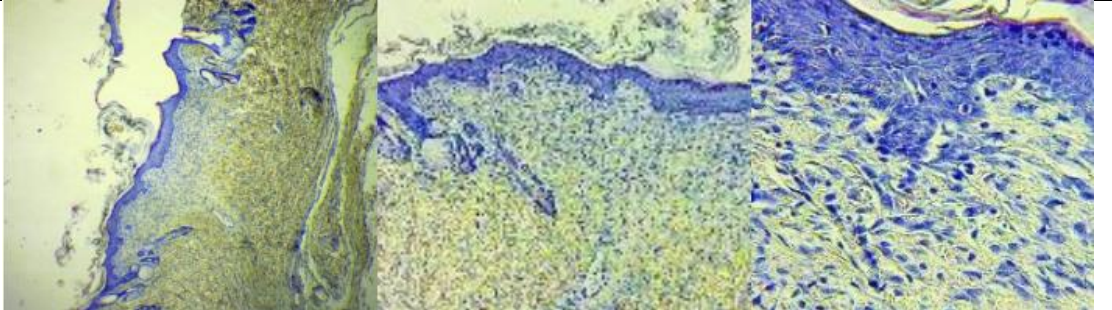
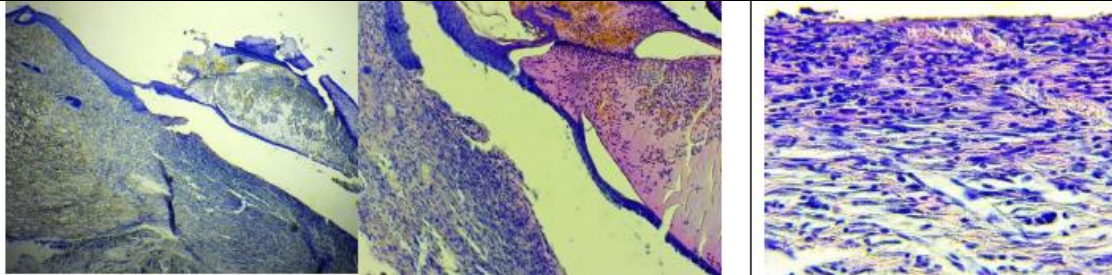
	Группа ПСДЦ. Полная эпителизация всей поверхности раны многослойным ороговевающим эпителием, который хорошо сформирован и содержит много новообразованных придатков кожи не только по краям раны, но и по ее центру. Эпидермис широкий, содержит хорошо структурированные все слои. Выражен нижний базальный слой, имеются участки отшелушивания поверхностного рогового слоя. Клеток меньше, чем в контрольных ранах. Фибробласты существенно преобладают над лейкоцитами. Визуализируются новообразованные сформированные коллагеновые волокна.		
ПСДЦ +МСК			
	Группа ПСДЦ+МСК. Завершена полноценная эпителизация всей поверхности раны многослойным ороговевающим эпителием, который хорошо сформирован и содержит много новообразованных придатков кожи по краям и центру раны. Эпидермис широкий, содержит хорошо структурированные все слои. Выражен нижний базальный слой, а также отшелушивание поверхностного рогового слоя. Клеток не много, особенно мало лейкоцитов. Визуализируются новообразованные сформированные коллагеновые волокна.		
ДХ			
ДХ	Группа ДХ. Только краевая эпителизация, а сформированный эпителий, закрывающий менее половины края, тонкий, 1-2 слойный, истончается по направлению к центру. В центре и краях раны имеется струп, под которым прерывается поверхностная эпителизация. Большая концентрация фибробластов и клеток крови, в т.ч. лейкоцитов.		
ДГКТ			
	ДГКТ. Только краевая эпителизация. По краям раны эпителий многослойный ороговевающий, закрывающий край раны до ее середины. Однако ближе к середине раны от истончается, на половине края раны становится 2-слойным, далее визуализируется только 1 слой эпителия. Центр раны не эпителизирован. В центре раны имеется достаточно широкий струп, инфильтрированный лейкоцитами. Большая плотность фибробластов и клеток крови, в т.ч. лейкоцитов. Новообразованные сосуды широкие и содержат гемопозитические клетки, что в основном визуализируется в центральной части раны.		

Рисунок 64 - Вид края и центра ран разных групп на 14 сутки исследования. Окраска гематокселин-эозин, увеличение x40, x100 и x400.

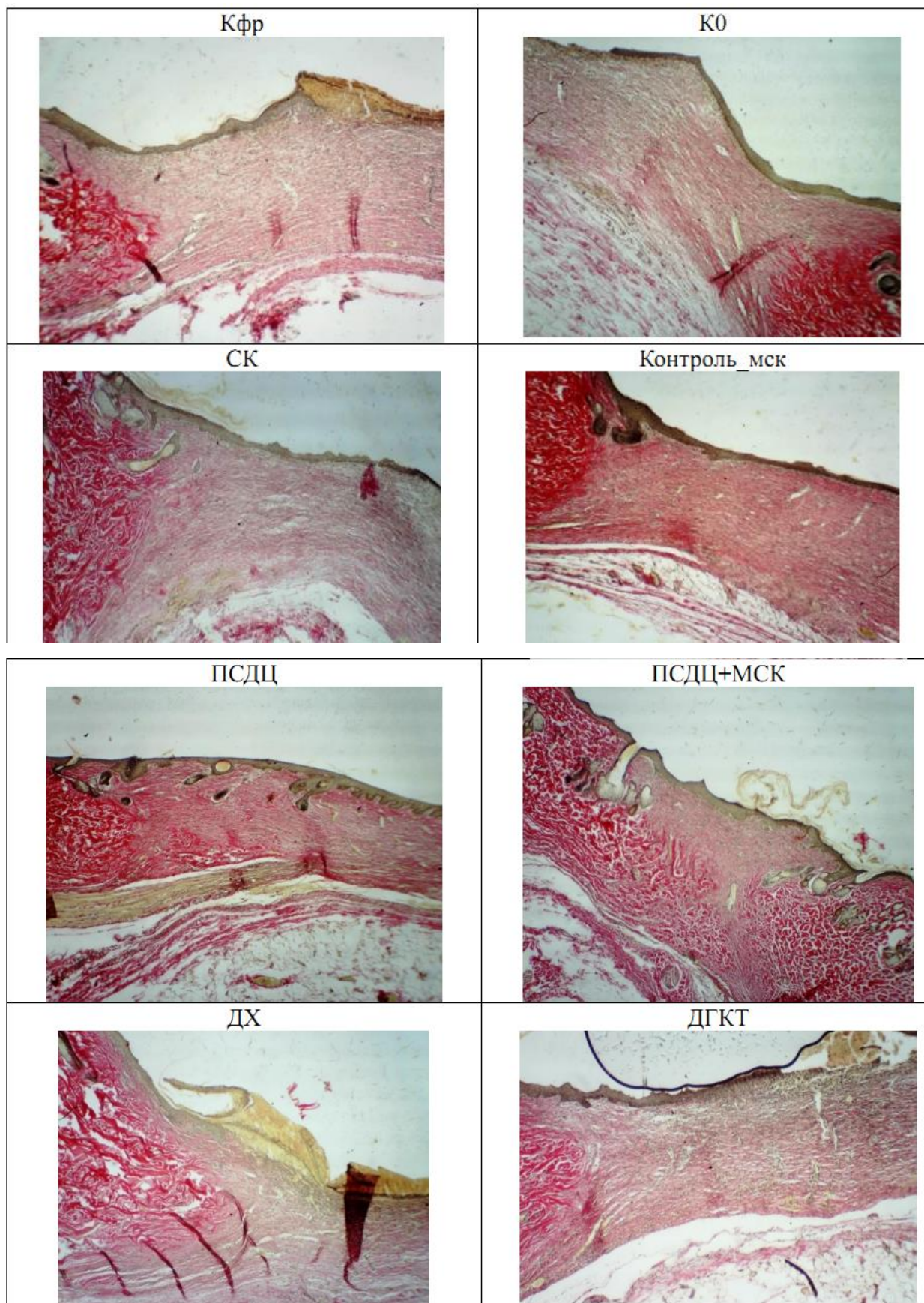


Рисунок 65 – 14-е сутки: ткань края и центра ран в разных группах ран. Окраска по Ван-Гизону (визуализация коллагена и степени его зрелости). Увеличение x40.

Таким образом, лучшие результаты эпителизации были достигнуты в группах ПСДЦ и ПСДЦ+МСК (100% ран были эпителизированы полностью). Наибольшее количество сформированных производных кожи были в ранах групп ПСДЦ и Контроль_мск (100%), а также ПСДЦ+МСК и МСК (86-71%). Полимерные изделия (ПСДЦ и ПСДЦ+МСК) в наибольшей степени способствуют не только формированию, но и созреванию межклеточного матрикса, в т.ч. белка коллагена

3.3.4. Корреляционный анализ показателей микрогемоциркуляции и морфометрии

Выполнен корреляционный анализ по выборкам ран животных, выведенных из эксперимента на 3 сутки, на 7 сутки и на 14 сутки отдельно (таблица 35).

Таблица 35 - Корреляционный анализ показателей морфометрии и микрогемоциркуляции у животных, выведенных на 3, 7 и 14 сутки

Часть раны		Перфузия ВРУ, 3 сутки	Перфузия ВРУ, 7 сутки	Перфузия ВРУ, 14 сутки
Центр	Лейкоциты, п			0,292*
	Фибробласты, %	0,217**		-0,354**
	Лейкоциты, %	0,217**		0,354**
	Фибр./Лейкоц.	0,214*		
Край	Всего клеток, п	0,218*		
	Фибробласты, п		0,239*	
	Лейкоциты, п	0,289*		0,318*
	Фибробласты, %		0,302*	-0,389**
	Лейкоциты, %		-0,302*	0,389**
	Фибр./Лейкоц.	-0,270*	0,292*	-0,322*
В сред. по всем отделам ран	Лейкоциты, п	0,254*		0,258*
	Фибробласты, %		0,274*	-0,346*
	Лейкоциты, %		-0,274*	0,346*
	Фибр./Лейкоц.	-0,215*	0,262*	-0,314*
*-p<0,05, **-p<0,01				

Установлено, что 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 ($r=0,254$; $p<0,05$), при обратной корреляции с процентным содержанием лейкоцитов в центре ран ($r=0,217$; $p<0,05$) и показателем отношения фибробласты/лейкоциты в среднем по ране у животных, выведенных на 3 сутки ($r=$

-0,215; $p < 0,05$). Следовательно, воспалительная реакция на 3 сутки, идущая при участии лейкоцитов, коррелирует с показателем микрогемоперфузии, т.е. чем больше была лейкоцитарная инфильтрация, тем выше был объем гемоперфузии раны на 3 сутки.

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 отделах 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 ($r = 0,262$; $p < 0,05$). Следовательно, в отличие от 3 суток, к исходу 7 дня исследования рост показателя микрогемоциркуляции сопряжен с повышением концентрации фибробластов, что, в свою очередь, предопределяло ускорение заживления ран.

На 14 сутки исследования высокий уровень гемоперфузии вокруг ран прямо коррелировал с числом лейкоцитов во всех фрагментах ран (в центре, краях и в целом по ране ($r = 0,258-0,318$; $p < 0,05$)), а также с их процентным содержанием во всех фрагментах ран ($r = 0,346-0,389$; $p < 0,05$) при обратной корреляции с показателем отношения фибробласты/лейкоциты в крае ран ($r = -0,322$; $p < 0,05$) в среднем по ране у животных, выведенных на 3 сутки ($r = -0,314$; $p < 0,05$) у животных, выведенных на 14 сутки. Следовательно, пролонгирование воспалительной реакции вплоть до 14 суток с избыточным содержанием лейкоцитов в этот период (как и на 3 сутки) коррелирует с высоким уровнем показателя микрогемоперфузии вокруг раны.

Наибольшая сила корреляций была зарегистрирована по морфометрическим показателям края ран, а из динамических точек – на 14 сутки.

Заключение

Актуальность темы связана с увеличением числа острых и хронических кожных ран в популяции, а также с потребностью разработки новых высокоэффективных лекарственных средств для их лечения [Cai Y-L. *et al.*, 2018; Nerlander M.P. *et al.*, 2019; Rosberg H.E. *et al.*, 2018; Wild H. *et al.*, 2020]. Несмотря на постоянно увеличивающееся количество лекарственных средств и методов, используемых для лечения ран, проблема эффективной регенерации до сих пор не решена [Alven S. *et al.*, 2020; Webster J. *et al.*, 2019; Westby M.J. *et al.*, 2018; Zhang L. *et al.*, 2019].

Поэтому актуальным и перспективным остается фундаментальное изучение процессов регенерации и стимулирующих заживление ран механизмов с разработкой совершенных средств и методов для их лечения. Цель диссертационного исследования - изучить механизмы заживления острых кожных ран и оценить эффективность применения мезенхимальных стволовых клеток и полимерного средства на основе хитозана и целлюлозы с интегрированными в их состав наночастицами диоксида церия.

Особенно остро проблема заживления ран стоит у людей второй половины жизни. Учитывая, что количество людей пожилого и старческого возраста в экономически развитых странах прогрессивно растет, на II Всемирной ассамблее Организации объединенных наций (ООН) по проблемам старения (2002) была принята «Программа ООН по исследованиям старения в XXI веке», в которой признана фундаментальная общность биологических процессов старения, что обосновывает экстраполировать результаты выполненных на животных экспериментальных исследований на человека.

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 во второй половине жизни [Силина Е.В., 2020; Gibon E, 2016, Oh J., 2014; Josephson A.M., 2019; Manturona N.E., 2018], эксперимент проведен на крысах не молодого, а зрелого пострепродуктивного 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.

Экспериментальное контрольно-сравнительное исследование выполнено на 112 белых крысах линии Wistar одного пола (самцы) и возраста (9 месяцев), весом в среднем (Me) 410 г. Моделирование кожных ран выполняли под общей анестезией. На выбритой коже спины на одинаковом расстоянии по обе стороны от позвоночника формировали квадратные раны одинаковых размеров. Всего было смоделировано 224 раны, площадь которых в среднем составила 129 мм². Все требования по гуманному обращению с животными, предъявляемые к подобного рода исследованиям были полностью выполнены; получено одобрение этического комитета.

В качестве сравнения лекарственных средств были выбраны разные по механизмам действия и способам применения формы. Большинство выбранных средств биологического происхождения, а их эффективность в отношении лечения ран ранее уже была доказана в ходе клинических и экспериментальных исследований.

Всего изучали 8 групп ран (исходно было по 28 животных в каждой группе): (1) Контроль_0 (K0) – интактные раны, заживающие под струпом без воздействия лекарственных средств, которые моделировали естественные процессы заживления; (2) Контроль_фр (Kфр) - в края ран в день моделирования (сутки 0) однократно инъекционно вводили изотонический физиологический раствор натрия хлорида (0,9% NaCl), что позволило оценивать результат введения жидкости в околораневое пространство, которое сопровождает местную анестезию по типу «лимонной корочки» выполняемую хирургами во время операции или введение лекарственных средств при пролонгированном лечении ран; (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 (системное действие МСК), которые гипотетически могли получать продуцируемые МСК биологически активные вещества через общий кровоток; (5) Полимерное соединение с диоксидом церия (ПСДЦ) - в края ран этой группы на 0, 1, 3, 7 сутки наружно на поверхность раны наносили биопрепарат, содержащий биосовместимые наночастицы диоксида церия (CeO_2), 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. Последние 2 препарата избраны в качестве препаратов сравнения, так как они хорошо известны, широко применяются в хирургической практике и в показаниях к применению звучит ранозаживление. 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 см^2), 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 21-23°C; влажность воздуха 50%±5%). Однотипным было и содержание животных. Животные содержались в индивидуальных клетках в стандартных условиях вивария.

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) путем быстрого обескровливания крысы при вскрытии правого желудочка сердца.

В работе представлен анализ показателей площадь ран, линейных размеров длины и ширины ран, а также показатели изменения площади ран относительно первоначального размера, регистрируемого на 0 сутки. На 14 сутки оценивали качество и итог заживления.

В сутки 0 и перед эвтаназией, осуществляемой на 3,7,14 день, исследовали микрогемодиализацию с использованием аппаратно-программного комплекса для электрофизиологических исследований MP150 (BIOPAC Systems, Inc, США), включающий модуль для лазер-доплеровской флоуметрии. Игольчатый датчик устанавливали на коже по центру каждой из 4 сторон квадратной раны (отступая всего на 1,5-2 мм от ее края). Значения показателей размеров ран и микрогемодиализации на 0 сутки в исследуемых группах было статистически неразличимым. Это лишнее раз доказывало физиологическую однородность изучаемых групп и повышало доверие к полученным в ходе исследования результатам.

Для гистологического анализа были сделаны три последовательных среза каждой раны у животных, выведенных на 3,7, 14 сутки. Срезы окрашивали по 3 разным методам: 1 - гематоксилин-эозином (для описательной световой микроскопии с оценкой эпителизации ран), 2 - только гематоксилином (для обработки в программе Image-J (National Institutes of Health, USA) с количественным анализом фибробластных и лейкоцитарных клеток (на 1 мм²) по их морфологическим характеристикам), 3 – по методу Ван-Гизона (оценка

коллагенизации). Для усиления объективизации и точности при дальнейшей морфометрии, количество окрашенных по одному из способов должно было быть не меньше 5. На каждом срезе выделяли три равные по протяженности области (центр ран и два их противоположных края).

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 $p < 0,05$.

Определено, что заживление интактной острой раны (без лечения, группа 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. Вероятно, это происходило из-за нарушения микроциркуляторного русла и межклеточных связей, которые необходимы для нормального заживления. 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, $p < 0,05$).

Назначение ДХ и ДГКТ оказалось мало эффективным, хотя и сопровождалось лучшим сокращением площади ран по сравнению с группой Kфр 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; $p > 0,05$). Очевидно, свою роль сыграл противомикробный компонент препарата, который оказывал воздействие и на клетки в краях раны. В группе ДГК 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 ($p > 0,05$). Учитывая хорошую клиническую историю, этот эффект был связан, скорее всего, с нарушением клеточного единства, которое наблюдалось и в группе с введением изотонического раствора хлористого натрия.

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. Таким образом, мы подтвердили механизмы влияния МСК на раны, описываемые и другими исследователями [*работы из обзора Ahmadi A.R. et al., 2019*]. 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. Это позволяет с большой долей уверенности утверждать, что введение суспензии МСК лучше осуществлять

путем внутримышечных инъекций, а повторные введения биологического материала производить с регулярностью 5-7 дней.

Установлена эффективность обеих полимерных изделий (ПСДЦ и ПСДЦ+МСК), при этом применение ПСП+МСК оказалось наиболее эффективным. 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 $11,9 \text{ мм}^2 [7,7 : 17,5] \text{ мм}^2$, 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 $8,5 \text{ мм}^2 [5,7 : 11,6] \text{ мм}^2$, 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. Ранозаживляющие средства с хитозаном и ранее показывали хороший эффект, что согласуется и с полученными нами результатами [Байкулов А.К. и соавт., 2016; Гладкова Е.В. и соавт., 2014; Попова Т.В. и соавт., 2016; Федосов П.А. и соавт., 2015; Хомулло Г.В. и соавт., 2014; Bagher Z., 2020; Ehterami A., 2019; Qi W. 2020; Kalantari K., 2020; Khorasani T.M. 2019; Masood N., 2019; Rasool A., 2019; Xue H. 2019; Zhang C., Yang X., 2020]. Добавление же в субстанцию ПСДЦ живых МСК достоверно усиливало ранозаживляющий эффект, добавляя использование новых природных механизмов восстановления поврежденного клеточного пула.

Тест ANOVA и апостериорные тесты выявили значимые множественные различия по показателю площадь ран в анализируемых группах на всех

анализируемых нами контрольных точках исследования. Через 24 часа после моделирования ран группы распределились на две подгруппы. 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: $ДХ = Кфр > К0 = ДГКТ > ПСДЦ \geq МСК \geq Контроль_мск > ПСДЦ+МСК$, 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 исследования тест Дункана выделил по показателю площадь ран 2 гомогенные подгруппы, без групп «переходных результатов». В лучшую группу 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 показали, что 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, $p < 0,05$), очевидно, за счет местнораздражающего действия входящего в состав ДХ и дополнительной инъекционной травматизацией при введении ДГКТ. Увеличение гемоперфузии по краю ран на 3 сутки относительно 0 дня коррелировало с увеличением размеров ран, явившись ранним прогностически неблагоприятным маркером.

На 7 сутки уровень перфузии 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, $p < 0,05$), то есть в группах с использованием биологических активаторов и нового ПСДЦ. 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. Корреляций перфузии с размером ран на 7 сутки не найдено.

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.

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 в эти сроки был взаимосвязан с ускорением темпов регенерации, что может служить маркером оптимистичного прогноза. Это подтверждалось при морфометрическом исследовании гистопрепаратов.

Гистологическая картина на 3 сутки после моделирования ран 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. 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.

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.

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 существенного 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 ($p > 0,05$).

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 регистрировали 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. В инъекционных группах МСК и ДГКТ численность фибробластов в тканях и дна и краев ран была больше, чем в группе Кфр, что отражалось на общей и морфологической картине. Это было расценено как иллюстрация стимулирования механизма устранения дефицита межучного вещества, ведь при травматическом разрушении краев раны потребуется большее количество коллагена на заполнение дополнительных тканевых «пустот». Неинвазивные группы не отличались от К0 по показателю процентного содержания фибробластов. Исключение составила группа ДХ, в краях ран которой процент фибробластов существенно ниже, чем в других группах. 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.

Морфометрический результат коррелировал с лучшими итогами заживлений. В группах ПСДЦ+МСК и ПСДЦ к 14 суткам эпителизировались 100% ран (все отделы покрыты многослойным ороговевающим эпителием), регистрировали наибольшее количество сформированных производных кожи (86-100%), а также наилучшее формирование и созревание коллагенового матрикса.

Корреляционный анализ показателей морфометрии и микрогемоциркуляции по животным, выведенным из эксперимента на 3, 7 и 14 сутки, установил, что 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 ($r= -0,215$; $p<0,05$). Следовательно, чем больше лейкоцитарная инфильтрация, тем выше был объем гемоперфузии раны на 3 сутки. На 7 сутки 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 краях 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 ($r=0,262$; $p<0,05$). Следовательно, в отличие от 3 суток, к 7 дню рост микрогемоперфузии сопряжен с повышением концентрации фибробластов, что предопределяло ускорение заживления ран. На 14 сутки высокий уровень гемоперфузии прямо коррелировал с числом лейкоцитов (в центре, краях и в целом по ране $r=0,258-0,318$; $p<0,05$), с их процентным содержанием во всех отделах ран ($r=0,346-0,389$; $p<0,05$) при обратной корреляции с показателем отношения фибробласты/лейкоциты в крае ран ($r=-0,322$; $p<0,05$). То есть пролонгирование воспалительной реакции вплоть до 14 суток с избыточным содержанием лейкоцитов в этот период (как и на 3 сутки) коррелировало с высоким уровнем показателя микрогемоперфузии вокруг раны. Наибольшая сила корреляций была зарегистрирована по морфометрическим показателям края ран, а из динамических точек – на 14 сутки.

Таким образом, проведенное исследование показало, что примененные в ходе эксперимента лекарственные средства принципиально не вторгаются в эволюционно отработанные механизмы заживления, но воздействуют как стимуляторы или ингибиторы на разных этапах закрытия ран, используя свойственные только им механизмы воздействия на живую клетку. Это позволяет предположить путь улучшения результатов лечения ран не только через создание новых более эффективных лекарственных субстанций и средств, но и через многокомпонентность лечения, базирующегося на знании физиологической стадии заживления, происходящей в конкретный временной отрезок. Вещества с природной основой показали лучший результат. Доказана эффективность и перспективность для клинического применения новых изучаемых в работе полимерных средств.

ВЫВОДЫ

1. При заживлении острой кожной раны без лечения под струпом признаки увеличения зоны воспаления регистрируются до 3 суток, позитивные изменения начинаются с 5 суток, к 7 дню 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. Максимальная эффективность достигнута 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 сокращений и условных обозначений

К0	Контрольная группа интактных ран
Кфр	Контрольная группа с введением изотонического физиологического раствора 0,9% NaCl в день моделирования 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 со стволовыми клетками
ДГКТ	Депротеинизированный гемодериват крови телят (препарат Актовегин®)
ДХ	Диоксометилтетрагидропиримидин + Хлорамфеникол (препарат Левомеколь®)
Me	медиана

Опубликованные по теме диссертации научные работы

В международных изданиях:

Web of Science, Scopus

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. Gavriluk, 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. **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:.3390/pharmaceutics13101534 [**Scopus, Web of Science; Q1**].

В иных международных / Chemical Abstracts:

1. **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.

В изданиях из Перечня Университета/Перечня ВАК при Минобрнауки России:

1. **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
2. **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

В сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

1. **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
2. **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.

Список литературы

1. Абземелева, Р. А. Динамика пролиферативной активности клеток эпидермиса и дермы при заживлении скальпированных ран при применении препарата «Винфар» / Р. А. Абземелева, Н. Р. Бакаева, В. А. Миханов. – Текст: непосредственный // Морфология. – 2016. – Т. 149. – № 3. – С. 7–8.
2. Абрамян, Ш. М. Возрастные особенности экспрессии маркёров аутофагии в клетках кожи пациентов с лифтингом лица / Ш. М. Абрамян, Е. Н. Волкова, С. Н. Блохин, С. Г. Морозов – Текст: непосредственный // Патогенез. – 2018. – Т. 16. – № 4. – С. 174-177.
3. Абрамян, Ш. М. Изучение состояния сигнальных путей апоптоза в клетках при проведении пластических операций на лице / Ш. М. Абрамян, С. Г. Морозов – Текст: непосредственный // Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии. – 2017. – № 1. – С. 70-71.
4. Алексеева, Н. Т. Аналитическая морфология репаративной регенерации в коже под действием различных региональных факторов. – Текст: непосредственный / Н. Т. Алексеева, Д. Б. Никитюк, С. В. Ключкова // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2015. – № 1. – С. 26–37.
5. Алексеева, Н. Т. Гистохимическая характеристика эпидермиса при заживлении кожных ран под действием различных региональных факторов / Н. Т. Алексеева, Д. Б. Никитюк, С. В. Ключкова. – Текст: непосредственный // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2016. – Т. 6. – № 3. – С. 10–14.
6. Алексеева, Н. Т. Морфологические особенности раневого процесса в коже при региональном лечебном воздействии: автореферат диссертации ... доктора медицинских наук: 14.01.17 / Наталия Тимофеевна Алексеева. – Оренбург, 2015. – 48 с. – Текст: непосредственный.
7. Аль, З. Оценка ранозаживляющей активности L- и D-изоформ аскорбиновой кислоты и их солей с хитозаном на модели ожоговой раны у крыс / З. Аль, О. Н. Малинкина, И. В. Зудина [и др.]. – Текст: непосредственный // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6. – С. 236.
8. Архипов, Д. В. Раны мягких тканей: современное состояние проблемы / Д. В. Архипов, А. А. Глухов, А. А. Андреев, А. П. Остроушко; Воронежский государственный медицинский университет им. Н. Н. Бурденко. – Текст: непосредственный // Многопрофильный стационар. – 2019. – Т. 6. – № 2. – С. 186–191.
9. Атякшин, Д. А. Оценка влияния кислотомодифицированных растворов на морфофункциональное состояние тучных клеток кожи крыс при лечении экспериментальных ран / Д. А. Атякшин, А. О. Чуян, А. А. Андреев, А. Р. Карапатьян. –

- Текст: непосредственный // Вестник Воронежского института высоких технологий. – 2017. – № 1 (20). – С. 8–10.
10. Афиногенов, Г. Е. Современный антисептический гидрогель в лечении инфекционных осложнений ран в хирургии / Г. Е. Афиногенов, А. Г. Афигенова, Д. Ю. Мадай [и др.]; Санкт-Петербургский государственный университет. – Текст: непосредственный // Вестник хирургии им. И. И. Грекова. – 2016. – Т. 175. – № 3. – С. 26–31.
 11. Байкулов, А. К. Исследования эффективности производных хитозана на процессы репаративной регенерации ожоговых ран в эксперименте Байку / А. К. Байкулов, Д. А. Бегматова, А. С. Ишмуратова [и др.]; Самаркандский медицинский институт. – Текст: непосредственный // International Scientific and Practical Conference World Science. – 2016. – Т. 3. – № 5 (9). – С. 53–58.
 12. Башкина, О. А. Нейроиммуноэндокринная регуляция физиологических и патофизиологических процессов в коже / О. А. Башкина, М. А. Самотруева, А. К. Ажикова, Л. Р. Пахнова. – Текст: непосредственный // Медицинская иммунология. – 2019. – Т. 21. – № 5. – С. 807–820.
 13. Бежин, А. И. Применение хитозан-коллагенового комплекса с нано-частицами серебра и химотрипсином в лечении гнойно-некротических ран / А. И. Бежин, В. А. Липатов, Э. В. Фрончек [и др.]. – Текст: непосредственный // Вестник новых медицинских технологий. – 2019. – Т. 26. – № 3. – С. 23–28.
 14. Бенсман, В. М. Способы закрытия лапаротомной раны при распространенном перитоните / В. М. Бенсман, Ю. П. Савченко, С. Н. Щерба [и др.]. – Текст: непосредственный // Хирургия: журнал им. Н. И. Пирогова. – 2016. – № 7. – С. 30–35.
 15. Блинова, М. И. Роль фибробластов в регенерации кожной ткани при заживлении ран М. И. Блинова, М. Г. Хотин, Н. А. Михайлова. – Текст: непосредственный // Гены и Клетки. – 2017. – Т. 12. – № 3. – С. 45.
 16. Бордаков, В. Н. Рана. Раневой процесс. Принципы лечения ран: учебно-методическое пособие / В. Н. Бордаков. – Минск: Издательство БГМУ, 2014. – 31 с. – Текст: непосредственный.
 17. Быков, И. М. Динамика показателей прооксидантно-антиоксидантной системы в раневом отделяемом и плазме крови при моделировании гнойной раны и ее лечении аппаратным способом в жидкой фазе / И. М. Быков, А. А. Басов, В. В. Малышко [и др.]; Кубанский государственный медицинский университет Минздрава РФ. – Текст: непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 163. – № 2. – С. 237–241.
 18. Быстров, С. А. Лечение гнойных ран с применением раневых покрытий на пенной основе с технологией гидрофайбер / С. А. Быстров, А. И. Безбородов, С. Е. Каторкин; Самарский

- государственный медицинский университет. – Текст: непосредственный // Хирургия: журнал им. Н. И. Пирогова. – 2017. – № 7. – С. 49–53.
19. Валиев, Т. М. Биологические эффекты супрамолекулярных гелей в отношении регенерации ран: обзор литературы / Т. М. Валиев, М. Б. Петрова, Е. М. Мохов; Тверской государственный медицинский университет Минздрава России. – Текст: непосредственный // Верхневолжский медицинский журнал. – 2019. – Т. 18. – № 2. – С. 31–33.
 20. Власов, А. П. Особенности течения репаративного процесса и метаболизма тканевых структур кожной раны на фоне применения Ремаксола / А. П. Власов, П. П. Зайцев, П. А. Власов [и др.]. – Текст: непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т. 80. – № 3. – С. 40–44.
 21. Габитов, В. Х. Способ ускорения регенерации хирургических ран комплексом перекиси водорода с наносеребром и хитозаном / В. Х. Габитов, У. У. Омурбек, С. К. Сулайманкулова; Кыргызско-Российский Славянский Университет им. Б. Н. Ельцина. – Текст: непосредственный // Евразийский союз ученых. – 2019. – № 7–2 (64). – С. 32–34.
 22. Гареев, И. Ф. Сочетанная кранио-абдоминальная травма: клиническая эпидемиология / И. Ф. Гареев, О. А. О. Бейлерли. – Текст: непосредственный // Российский нейрохирургический журнал им. профессора А. Л. Поленова. – 2018. – № 10 (5). – С. 25–26.
 23. Гладкова, Е.В. Особенности репаративной регенерации экспериментальных ран при использовании хитозана. / Гладкова Е.В., Бабушкина И.В., Мамонова И.А. [и др.]. – Текст: непосредственный// Фундаментальные исследования. - 2014. - № 6-7. - С. 1397-1400.
 24. Григорьян, А. Ю. Лечение экспериментальных гнойных ран иммобилизованными формами антисептиков А. Ю. Григорьян, А. И. Бежин, Т. А. Панкрушева [и др.]. – Текст: непосредственный // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6. – С. 222.
 25. Григорьян, А. Ю. Многокомпонентное раневое покрытие в лечении экспериментальной гнойной раны / А. Ю. Григорьян, А. И. Бежин, Т. А. Панкрушева [и др.]. – Текст: непосредственный // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – Т. 18. – № 3. – С. 29–36.
 26. Григорьян, А. Ю. Применение многокомпонентной пленки в лечении ран в эксперименте / А. Ю. Григорьян, А. И. Бежин, Т. А. Панкрушева [и др.]. – Текст: непосредственный // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – Т. 18. – № 2. – С. 60–68.
 27. Давыдов, Б. А. Цитологическая оценка влияния ангиоактивного препарата на течение фазы воспаления и скорость заживления полнослойных ран кожи / Б. А. Давыдов, К. А. Катков, К. С. Рандхава, В. Г. Шестакова. – Текст: непосредственный // Тверской медицинский журнал. – 2016. – № 2. – С. 82–86.

28. Дас, С. Настоящее и будущее заживления ран. Часть 1. Биоматериалы / С. Дас, А. Бейкер. – Текст: непосредственный // Косметика и медицина. – 2017. – № 1. – С. 38–48.
29. Дибиров, М. Д. Влияние актовегина на репарацию хронических ран различной этиологии / М. Д. Дибиров, Р. У. Гаджимурадов, О. Х. Халидов [и др.]. – Текст: непосредственный // Фарматека. – 2015. – № 10 (303). – С. 74–79.
30. Дибиров, М. Д. Комплексный подход при лечении больных осложненной формой синдрома диабетической стопы / М. Д. Дибиров, Р. У. Гаджимурадов, Ф. Ф. Хамитов [и др.]. – Текст: непосредственный // Московская медицина. – 2019. – № 2 (30). – С. 68–69.
31. Дибиров, М. Д. Лечение венозных трофических язв в старческом возрасте / М. Д. Дибиров, А. Х. Магдиев. – Текст: электронный // Флебология. – 2016. – № 10 (4). – С. 224–228. – URL: <https://www.mediasphera.ru/issues/flebologiya/2016/4/downloads/ru/1199769762016041224> (дата обращения: 18.03.2021).
32. Дибиров, М. Д. Роль метаболической терапии в ускоренном лечении хронических ран и трофических язв / М. Д. Дибиров, Р. У. Гаджимурадов, О. Х. Халидов [и др.]. – Текст: непосредственный // Инфекции в хирургии. – 2017. – Т. 15. – № 1. – С. 6–9.
33. Добрейкин, Е. А. Экспериментальное обоснование сочетанного применения наночастиц меди и низкоинтенсивного лазерного излучения при хирургическом лечении инфицированных ожоговых ран кожи: экспериментальное исследование: автореферат диссертации ... кандидата медицинских наук: 14.01.17 / Евгений Алексеевич Добрейкин. – Воронеж, 2015. – 30 с. – Текст: непосредственный.
34. Елисеенко, В. И. Патологическая анатомия и патогенез лазерной раны / В. И. Елисеенко. – Текст: непосредственный // Лазерная медицина. – 2017. – Т. 21. – № 4. – С. 5–10.
35. Ермолова, Д. А. Применение обогащенной тромбоцитами плазмы в лечении хронических ран: диссертация ... кандидата медицинских наук: 14.01.17 / Дарья Александровна Ермолова. – Москва, 2017. – 150 с. – Текст: непосредственный.
36. Еськова, А. Ю. Гистологические и иммуногистохимические особенности регенерации резаных ран под действием фермента транскляминазы в эксперименте / А. Ю. Еськова, В. Ю. Михайличенко, И. И. Фомочкина [и др.]. – Текст: непосредственный // Таврический медико-биологический вестник. – 2018. – Т. 21. – № 1. – С. 56–62.
37. Еськова, А. Ю. Регенерация глубоких резаных ран кожи при различных вариантах местной терапии / А. Ю. Еськова, О. В. Большакова, Е. П. Голубинская [и др.]. – Текст: непосредственный // Патогенез. – 2018. – Т. 16. – № 1. – С. 34–41.
38. Зайцева, Е. Л. Изучение влияния различных методов местного лечения на заживление ран у пациентов с нейропатической и нейроишемической формой синдрома диабетической стопы

- / Е. Л. Зайцева, А. Ю. Токмакова, М. В. Шестакова [и др.]. – Текст: непосредственный // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2016. – Т. 71. – № 6. – С. 466–471.
39. Зиновьев, Е.В. Опыт применения стволовых клеток при лечении ожогов кожи. / Зиновьев Е.В., Юдин В.Е., Асадулаев М.С., Цыган В.Н. [и др.] – Текст: непосредственный // Педиатр. – 2018. – Т. 9. – № 4. – С. 12-27.
40. Зиновьев, Е.В. Оценка эффективности раневых покрытий на основе бактериальной целлюлозы с фукоиданом при ожогах кожи. / Зиновьев Е.В., Лукьянов С.А., Цыган В.Н. [и др.] – Текст: непосредственный // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2019. – № 1 (65). – С. 148-152.
41. Иванов, В.К. Синтез и исследование термической устойчивости золь нанокристаллического диоксида церия, стабилизированных лимонной и полиакриловой кислотами / В.К. Иванов, О.С. Полежаева, А.С. Шапоров, А.Е. Баранчиков [и др.]. – Текст: непосредственный // 2010, 55, 328–332, doi:10.1134/S0036023610030046.
42. Игнатъева, Ю. А. Композиционные полимеры в качестве медицинских материалов для лечения ран: автореферат диссертации ... кандидата технических наук: 05.17.06 / Юлия Андреевна Игнатъева. – Санкт-Петербург, 2015. – 16 с. – Текст: непосредственный.
43. Кананыхина, Е. Ю. Количественная характеристика полноты регенерации кожи при заживлении раны на спине и животе крыс / Е. Ю. Кананыхина, Г. Б. Большакова. – Текст: непосредственный // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2016. – № 1 (17). – С. 27–36.
44. Кананыхина, Е. Ю. Морфофункциональные особенности формирования рубцовой ткани при заживлении ран различной локализации у крыс / Е. Ю. Кананыхина, Ф. С. Русанов, Г. Б. Большакова. – Текст: непосредственный // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2017. – № 4 (24). – С. 44–51.
45. Карапетян, Г. Э. Комплексное лечение и особенности заживления ран на фоне хронической венозной недостаточности с применением озона, ультразвука и криотерапии: экспериментально-клиническое исследование: автореферат диссертации ... доктора медицинских наук: 14.01.17 / Георгий Эдуардович Карапетян. – Красноярск, 2016. – 28 с. – Текст: непосредственный.
46. Кательницкий, И. И. Возможности применения VАС-терапии в лечении трофических язв и гнойных ран у больных с синдромом критической ишемии нижних конечностей / И. И. Кательницкий, А. А. Зорькин, И. Л. Агапов [и др.]. – Текст: непосредственный // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н. И. Пирогова. – 2018. – Т. 13. – № 4. – С. 58–61.

47. Каторкин, С. Е. Оценка эффективности применения современных перевязочных материалов в комплексном лечении гнойных ран / С. Е. Каторкин, С. А. Быстров, О. Е. Лисин [и др.]. – Текст: непосредственный // Стационарозамещающие технологии: амбулаторная хирургия. – 2019. – № 1–2. – С. 146–152.
48. Кокорина, О. В. Применение геля на основе хитозана: особенности регенерации послеоперационной раны на слизистой оболочке полости рта / О. В. Кокорина, В. В. Дворянчиков, Т. С. Соловьева, А. Н. Касаткин. – Текст: непосредственный // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2016. – № 4 (56). – С. 122–126.
49. Копасов, А. Е. Экспрессия хемокинов в нейтрофилах и клетках подкожной жировой клетчатки при абдоминопластике у пациентов с ожирением и нормальной массой тела / А.Е. Копасов, С.Н. Блохин, Е.Н. Волкова, С.Г. Морозов – Текст: непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2019. – Т. 167. – № 6. – С. 682-685.
50. Королькова, Т. Н. Изучение иммуногистохимических показателей в эпидермисе и дерме при применении средств для регенерации кожи / Т. Н. Королькова, Н. В. Калмыкова, Е. В. Круглик, Е. В. Зиновьев; Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова. – Текст: непосредственный // Клиническая дерматология и венерология. – 2019. – Т. 18. – № 4. – С. 460–468.
51. Костоломова, Е. Г. Некоторые иммунофизиологические механизмы регенерации ран в условиях применения ранозаживляющего средства «Cellgel» / Е. Г. Костоломова, Ю. Г. Суховой, С. В. Гольцов [и др.]. – Текст: непосредственный // Российский иммунологический журнал. – 2016. – Т. 10 (19). – № 3. – С. 289–291.
52. Костяков, Д. В. Патогенетическое лечение ран, причиненных укусами собак: автореферат диссертации ... кандидата медицинских наук: 14.03.03 / Денис Валерьевич Костяков. – Санкт-Петербург, 2017. – 19 с. – Текст: непосредственный.
53. Кошелева, Н. В. Лазерная микрохирургия клеточных сфероидов для регенеративной медицины / Н. В. Кошелева, И. В. Ильина, С. Г. Морозов [и др.]. – Текст: непосредственный // Гены и Клетки. – 2019. – Т. 14. – № 5. – С. 123-124.
54. Кошелева, Н. В. Разработка клеточной модели на основе лазерной микрохирургии сфероидов для изучения процессов репарации. Н. В. Кошелева, И. В. Ильина, С. Г. Морозов [и др.]. – Текст: непосредственный // Онтогенез. – 2017. – Т. 48. – № 1. – С. 63-72.
55. Кузнецова, Л.В. Применение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в стоматологии. / Кузнецова Л.В., Малышев И.Ю., Янушевич О.О.// – Текст: непосредственный. Российская стоматология. - 2017. - Т. 10. - № 2. - С. 49-57.

56. Лыков, А. П. Эффект плазмы больных трофическими язвами на функциональные свойства, клеток вовлеченных в заживление ран / А. П. Лыков, М. А. Суровцева, О. В. Повещенко [и др.]. – Текст: непосредственный // Гены и Клетки. – 2019. – Т. 14. – № 5. – С. 137.
57. Максимова, Н. В. Оценка клинико-экономической эффективности применения биопластического материала коллост в лечении пациентов с синдромом диабетической стопы / Н. В. Максимова, Ю. А. Крстич, В. А. Ступин. – Текст: непосредственный // Медицинские технологии. Оценка и выбор. – 2017. – № 1 (27). – С. 59–66.
58. Малышко, В. В. Повышение эффективности лечения гнойных ран с использованием аппаратно-программного комплекса и наночастиц серебра: экспериментальное исследование: диссертация ... кандидата медицинских наук: 03.01.04 / Вадим Владимирович Малышко. – Краснодар, 2017. – 196 с. – Текст: непосредственный.
59. Мантурова, Н. Е. Инволюционные изменения коллагеново-эластического каркаса кожи, маркеров клеточного обновления и эндотелиоцитарной активности в эпидермисе и дерме: патоморфологическое исследование / Н. Е. Мантурова, В. А. Ступин, П. Ф. Литвицкий [и др.]. – Текст: непосредственный // Патогенез. – 2018. – Т. 16. – № 2. – С. 78–84.
60. Мединцев, А. Е. Морфофункциональные аспекты регенерации асептических ран под воздействием тканевых препаратов: автореферат диссертации ... кандидата ветеринарных наук: 06.02.01 / Александр Евгеньевич Мединцев. – Уфа, 2015. – 23 с. – Текст: непосредственный.
61. Митряшов, К. В. Особенности микробного пейзажа «пограничной» ожоговой раны в разные фазы раневого процесса / К. В. Митряшов, С. В. Охотина, П. А. Грибань [и др.]. – Текст: непосредственный // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2016. – № 1 (63). – С. 59–61.
62. Миханов, В. А. Регенерация глубоких линейных ран кожи крыс при местном воздействии метаболитами культуры *Bacillus subtilis* 804 / В. А. Миханов, В. С. Полякова, Р. А. Абземелева [и др.]. – Текст: непосредственный // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2019. – Т. 8. – № 2. – С. 55–59.
63. Морозов, А. М. Современные методы стимуляции процесса регенерации послеоперационных ран / А. М. Морозов, А. Н. Сергеев, Н. А. Сергеев [и др.]. – Текст: непосредственный // Сибирское медицинское обозрение. – 2020. – № 3 (123). – С. 7.
64. Морозов, С. Г. Киназа MTOR и ассоциированные с ней белки в клетках кожи, выделенных при абдоминопластике у пациенток с нормальной массой тела и ожирением / С. Г. Морозов, А. Е. Копасов – Текст: непосредственный // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2020. – Т. 64. – № 3. – С. 40–46.

65. Москалев, А.В. Стволовые клетки и их физиологические эффекты / Москалев А.В., Гумилевский Б.Ю., Апчел А.В., Цыган В.Н. // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2019. - № 4 (68). - С. 172-180.
66. Моторина, И. Г. Комплексное лечение хронических ран: монография / И. Г. Моторина, Л. К. Куликов, С. С. Казанков [и др.]; Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования. – Иркутск, 2018. – 108 с. – Текст: непосредственный.
67. Мошкин, А. С. Эффективность применения оксидных наноструктур металлов в лечении гнойных ран / А. С. Мошкин, Н. Н. Шевердин, А. Г. Алексеев, М. А. Халилов. – Текст: непосредственный // Морфология. – 2017. – Т. 151. – № 3. – С. 88–88.
68. Науменко, Л. Ю. Влияние терапии отрицательным давлением на процессы воспаления и регенерации в раннем периоде заживления огнестрельных ран конечностей / Л. Ю. Науменко, А. М. Горегляд. – Текст: непосредственный // Травма. – 2018. – Т. 19. – № 4. – С. 65–70.
69. Ниязов, Б. С. Диагностика и лечение гнойных ран: обзор литературы / Б. С. Ниязов, О. Р. Динлосан; Кыргызский государственный медицинский институт переподготовки и повышения квалификации. – Текст: непосредственный // Научная дискуссия: инновации в современном мире. – 2016. – № 11 (54). – С. 99–109.
70. Ниязов, Б. С. Сравнительная оценка течения раневого процесса при применении мази Левомеколь в лечении гнойных ран в период деадаптации / Б. С. Ниязов, О. Р. Динлосан, С. Б. Ниязова [и др.]; Кыргызский государственный медицинский институт переподготовки и повышения квалификации. – Текст: непосредственный // Вестник КГМА им. И. К. Ахунбаева. – 2017. – № 5. – С. 125–128.
71. Новиков, И. В. Применение комбинированных способов местного лечения у пациентов с различными вариантами локальных ожоговых ран: диссертация ... кандидата медицинских наук: 14.01.17 / Иосиф Витальевич Новиков. – Самара, 2019. – 127 с. – Текст: непосредственный.
72. Носенко, М. А. Провоспалительные цитокины и заживление кожных ран у мышей / М. А. Носенко, С. Г. Амбарян, М. С. Друзкая. – Текст: непосредственный // Молекулярная биология. – 2019. – Т. 53. – № 5. – С. 741–754.
73. Нузова, О. Б. Лечение гнойных ран у больных сахарным диабетом / О. Б. Нузова, А. В. Студеникин, А. А. Стадников, Н. И. Колосова. – Текст: непосредственный // Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке. – 2016. – Т. 18. – № 11. – С. 48–51.

74. Нурмаков, Д. А. Лечение гнойных ран: обзор литературы / Д. А. Нурмаков. – Текст: непосредственный // Вестник Казахского национального медицинского университета. – 2016. – № 3–1. – С. 134–138.
75. Образцова, А. Е. Морфофункциональные особенности репаративного процесса при заживлении кожных ран с учетом возможных рубцовых деформаций: обзор литературы / А. Е. Образцова, А. А. Ноздреватых. – Текст: непосредственный // Вестник новых медицинских технологий: электронное издание. – 2021. – № 1. – С. 98–107.
76. Олтаржевская, Н. Д. Возможности применения полисахаридов при лечении ран / Н. Д. Олтаржевская, М. А. Коровина [и др.]. – Текст: непосредственный // Раны и раневые инфекции: журнал им. профессора Б. М. Костючёнка. – 2019. – Т. 6. – № 2. – С. 24–31.
77. Орлов, А. Г. Лечение хронических ран - взгляд через века / А. Г. Орлов, А. Н. Липин, К. Л. Козлов. – Текст: непосредственный // Кубанский научный медицинский вестник. – 2016. – № 5 (160). – С. 147–153.
78. Патент № 79701 Российская Федерация, МПК G09B 23/28 (2006.01). Устройство для моделирования раневой поверхности заданных размеров у лабораторных животных: № 2008125641/22: заявл. 24.06.2008: опубл. 10.01.2009 / Хруслов М. В., Калущий П. В., Иванов А. В., Зюзя Е. В. – 7 с.: ил. – URL: https://patents.s3.yandex.net/RU79701U1_20090110.pdf (дата обращения: 05.03.2020). – Текст: электронный.
79. Паюшина, О. В. Влияние мезенхимных стромальных клеток и кондиционированной ими среды на заживление кожных ран / О. В. Паюшина, Н. Н. Буторина, О. Н. Шевелева, Е. И. Домарацкая. – Текст: непосредственный // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2018. – № 2. – С. 117–120.
80. Петров, Ю. П. Поведение клеток монослоинной линии гепатомы заидела в области экспериментальной раны / Ю. П. Петров, Н. П. Терюкова, С. А. Снопов. – Текст: непосредственный // Цитология. – 2018. – Т. 60. – № 4. – С. 297–307.
81. Пешиков, О. В. Развитие хирургии и лечение ран: учебное пособие для обучающихся по специальности 31.05.01 – Лечебное дело / О. В. Пешиков, А. Ю. Маркина. – Челябинск: Издательство Южно-Уральского государственного медицинского университета, 2016. – 79 с. – Текст: непосредственный.
82. Попова, Т.В. Влияние новой мазевой композиции аг/тага и хитозан-геля на лечение экспериментальных ран различной этиологии. / Попова Т.В., Толстикова Т.Г., Летягин А.Ю., Жукова Н.А., Бгатова Н.П., Рачковская Л.Н., Котлярова А.А., Бурмистров В.А. – Текст: непосредственный // Бюллетень сибирской медицины. - 2016. - Т. 15. № 1. - С. 47-54.

83. Пьянкова, А. И. Потерянные годы здоровой жизни в результате дорожно-транспортных происшествий в России / А. И. Пьянкова, Т. А. Фаттахов. – Текст: электронный // Профилактическая медицина. – 2017. – № 20 (5). – С. 30–36. – URL: <https://www.mediasphera.ru/issues/profilakticheskaya-meditsina/2017/5/downloads/ru/1230549482017051030> (дата обращения: 18.03.2021).
84. Сагдиев, Р. Д. Применение фотодинамической терапии в лечении гнойных ран / Р. Д. Сагдиев; Башкирский государственный медицинский университет. – Текст: непосредственный // Медицинский вестник Башкортостана. – 2017. – Т. 12. – № 6 (72). – С. 43–45.
85. Силина, Е. В. Применение нативного коллагена в клинической практике для лечения хронических ран / Е. В. Силина, В. А. Ступин, Л. С. Золотарева, А. Н. Комаров. – Текст: непосредственный // Хирургия: журнал им. Н. И. Пирогова. – 2017. – № 9. – С. 78–84.
86. Силина, Е. В. Роль коллагена в механизмах заживления хронических ран при синдроме диабетической стопы / Е. В. Силина, В. А. Ступин, Р. Б. Габитов. – Текст: непосредственный // Клиническая медицина. – 2018. – Т. 96. – № 2. – С. 106–115.
87. Силина, Е. В. Физиология старения кожи / Е. В. Силина, Н. Е. Мантурова, Н. В. Моргулис, В. А. Ступин; Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова. – Текст: непосредственный // Пластическая хирургия и эстетическая медицина. – 2020. – № 2. – С. 40–45.
88. Стекольников, А. А. Лечение экспериментальных ран у крупного рогатого скота с применением иммуномодуляторов РВ-1, РВ-2 и перекиси водорода / А. А. Стекольников, В. В. Решетняк, В. В. Бурдейный. – Текст: непосредственный // Международный вестник ветеринарии. – 2018. – № 1. – С. 98–103.
89. Студеникин, А. В. Клинико-морфологические особенности репарации тканей гнойных ран нижних конечностей на фоне сахарного диабета при лечении милиацилом и КВЧ-терапией: автореферат диссертации ... кандидата медицинских наук: 14.01.07 / Александр Викторович Студеникин. – Оренбург, 2017. – 29 с. – Текст: непосредственный.
90. Ступин, В. А. Диагностика и лечение первых признаков ишемии как профилактика развития синдрома диабетической стопы / В. А. Ступин, К. А. Корейба, А. Р. Минабутдинов. – Текст: непосредственный // Практическая медицина. – 2017. – № 6 (107). – С. 85–88.
91. Ступин, В. А. Комплексное лечение трофических язв и ран у больных с синдромом диабетической стопы / В. А. Ступин, Н. Е. Мантурова, С. В. Горюнов [и др.]. – Текст: непосредственный // РМЖ. – 2019. – Т. 27. – № 11. – С. 44–48.

92. Ступин, В. А. Синдром диабетической стопы (эпидемиология, патофизиология, диагностика и лечение): монография / В.А. Ступин, Е.В. Силина, К.А. Корейба, С.В. Горюнов М.: Литтера, 2019 – 201 с. – Текст: непосредственный.
93. Ступин, В. А. Современные методы лечения хронических ран при синдроме диабетической стопы / В. А. Ступин, С. В. Горюнов, С. Ю. Жидких, А. Е. Богданов. – Текст: непосредственный // Инфекции в хирургии. – 2018. – Т. 16. – № 1–2. – С. 89–90.
94. Ступин, В. А. Эффективность и безопасность местного применения коллагенового биоматериала в комплексном лечении синдрома диабетической стопы: итоги многоцентрового рандомизированного клинического исследования / В. А. Ступин, Е. В. Силина, В. А. Горский [и др.]. – Текст: электронный // Хирургия: журнал им. Н. И. Пирогова. – 2018. – № 6. – С. 91–100. – URL: <https://www.mediasphera.ru/issues/khirurgiya-zhurnal-im-n-i-pirogova/2018/6/downloads/ru/1002312072018061091> (дата обращения: 18.03.2021).
95. Судаков, Д. В. Новые данные в лечении гнойных ран у больных микрохирургического профиля / Д. В. Судаков, А. В. Черных, Е. И. Закурдаев, А. Н. Тихонов. – Текст: непосредственный // Центральный научный вестник. – 2017. – Т. 2. – № 1 (18). – С. 9–11.
96. Суздальцева, Ю. Г. Способность мезенхимальных клеток человека, выделенных из разных источников, к дифференцировке в ткани мезодермального происхождения / Ю.Г. Суздальцева, В.В. Бурунова, И.В. Вахрушев, В.Н. Ярыгин, К.Н. Ярыгин – Текст: электронный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины - 2007;143(1):114–121.
97. Супильников, А. А. Значение интегральных гематологических индексов для прогнозирования заживления послеоперационной раны в эксперименте / А. А. Супильников, В. Н. Шабалин. – Текст: непосредственный // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2018. – Т. 62. – № 3. – С. 49–54.
98. Тараско, А. Д. Раны в амбулаторной практике хирурга: руководство для врачей / А. Д. Тараско, Н. В. Мальцева, О. Н. Воробьева; Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования. – Кемерово: Кузбассвуиздат, 2016. – 305 с. – ISBN 978-5-202-01358-4. – Текст: непосредственный.
99. Толстых, П. И. Классификация длительно не заживающих и хронических ран (язв) нижних конечностей / П. И. Толстых, О. Б. Тамразова, А. В. Гейниц [и др.]. – Текст: непосредственный // Лазерная медицина. – 2012. – Т. 16. – Вып. 3. – С. 47–63.
100. Третьяков, А. А. Комплексное лечение трофических язв нижних конечностей и длительно незаживающих ран: обзор литературы / А. А. Третьяков, А. Н. Неверов, С. В. Петров, И. З. Гатиатуллин. – Текст: непосредственный // Оренбургский медицинский вестник. – 2016. – Т. 4. – № 4 (16). – С. 62–68.

101. Федосов, П.А. Изучение ранозаживляющего действия геля на основе хитозана с таурином и аллантоином / Федосов П.А., Сливкин А.И., Николаевский В.А., Провоторова С.И., Бузлама А.В., Михайлов Е.В. // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=21247> (дата обращения: 06.05.2021).
102. Хан, Дж. Хроническое заживление ран: обзор текущего лечения и лечения / Дж. Хан, Р. Селли. – Текст: непосредственный // Advances in Therapy. – 2017. – № 34 (3). – С. 599–610.
103. Хилова, Ю. К. Значение апоптоза фибробластов при заживлении огнестрельных ран / Ю. К. Хилова. – Текст: непосредственный // Морфология. – 2018. – Т. 153. – № 3. – С. 292–293.
104. Хомулло Г.В., Ультраструктурная организация фибробластов новообразованной ткани при заживлении ран кожи у животных в условиях применения хитозана. / Хомулло Г.В., Довгилева О.М., Петрова М.Б. – Текст: непосредственный // Верхневолжский медицинский журнал. 2014. Т. 12. № 2. С. 41-45.
105. Чепурненко, М. Н. Характеристики реактивных изменений клеток и тканей в раневом процессе / М. Н. Чепурненко, Д. А. Чепурненко. – Текст: непосредственный // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2020. – № 5. – С. 63–67.
106. Чистяков, А. Л. Возможности лечения ран в реконструктивно-восстановительной хирургии лица и шеи: автореферат диссертации ... доктора медицинских наук: 14.01.17 / Андрей Леонидович Чистяков. – Москва, 2016. – 46 с. – Текст: непосредственный.
107. Шаповалова, Е. Ю. Влияние полинуклеотидов на содержание макрофагов в тканях регенерирующей ишемизированной раны / Е. Ю. Шаповалова, Т. А. Бойко, Ю. Г. Барановский [и др.]. – Текст: непосредственный // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 6. – С. 140.
108. Шаповалова, Е. Ю. Морфологическая характеристика заживления ишемизированной экспериментальной раны после применения ауто- и гетерофибробластов и дермального эквивалента / Е. Ю. Шаповалова, Т. А. Бойко, Ю. Г. Барановский, И. А. Лугин. – Текст: непосредственный // Казанский медицинский журнал. – 2018. – Т. 99. – № 1. – С. 53–59.
109. Шаповалова, Е. Ю. Морфологические особенности регенерации тканей в модельной ишемизированной ране кожи под влиянием полинуклеотидов / Е. Ю. Шаповалова, Т. А. Бойко, Ю. Г. Барановский [и др.]. – Текст: непосредственный // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2017. – Т. 7. – № 4. – С. 85–90.
110. Шевелева, О. Н. Фибробласты кожи зародышей и их участие в регенерации кожных ран и скелетных мышц / О. Н. Шевелева, С. Г. Рамазанова, О. В. Паюшина, Н. Н. Буторина;

- Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН. – Текст: непосредственный // Медицинский академический журнал. – 2016. – Т. 16. – № 4. – С. 244–245.
- 111.Шестакова, В. Г. Интенсивность ангиогенеза при заживлении кожных ран у крыс на фоне введения плазмидной ДНК VEGF 165 / В. Г. Шестакова, Р. В. Деев, В. В. Банин. – Текст: непосредственный // Морфология. – 2016. – Т. 149. – № 3. – С. 239–239.
- 112.Шмакова, Т. В. Клеточные механизмы безрубцового заживления кожных ран млекопитающих / Т. В. Шмакова, Е. Ю. Кананыхина, Г. Б. Большакова; Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова. – Текст: непосредственный // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2019. – № 8 (8). – С. 5–11.
- 113.Шнякина, Т. Н. Гематологические и клинические исследования при лечении экспериментальной ожоговой раны у собак / Т. Н. Шнякина, Н. М. Безина, Н. П. Щербаков. – Текст: непосредственный // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2017. – № 4 (150). – С. 127–131.
- 114.Шурыгина, И. А. Фибробласты и их роль в развитии соединительной ткани / И. А. Шурыгина, М. Г. Шурыгин, Н. И. Аюшинова, О. В. Каня. – Текст: непосредственный // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – № 3. – С. 8–12.
- 115.Щербаков, А. Б. Синтез и антиоксидантная активность биосовместимых водных золь нанокристаллического церия, стабилизированных мальтодекстрином / А.В. Щербаков, Н.М. Жолобак, В.К. Иванов [и др.]. – Текст: непосредственный // Журнал неорганической химии. – 2012, Т.57, 1411–1418, doi:10.1134/S0036023612110137.
- 116.Яглова, Н. В. Биология секреции тучных клеток / Н. В. Яглова, В. В. Яглов. – Текст: непосредственный // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2012. – № 4. – С. 5–10.
- 117.Ярец, Ю. И. Информативность цитологического и гистологического методов исследования для оценки состояния воспалительной и пролиферативной фаз репарации гранулирующей раны / Ю. И. Ярец, И. А. Славников, З. А. Дундаров, Н. Н. Шibaева; Гомельский государственный медицинский университет. – Текст: непосредственный // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. – 2018. – № 1 (19). – С. 86–94.
- 118.Ярец, Ю. И. Лабораторные критерии готовности раны к проведению аутодермопластики / Ю. И. Ярец. – Текст: непосредственный // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2017. – Т. 15. – № 5. – С. 544–550.
- 119.Ярыгин, К. Н. Сравнительное исследование фибробластов кожи взрослого человека и фибробластоподобных клеток пуповины. / К.Н. Ярыгин, Ю.Г. Суздальцева, В.В. Бурунова [и

- др.]. – Текст: непосредственный // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2006;141(1):161–166.
120. Abbade, L. P. Venous ulcer: epidemiology, physiopathology, diagnosis and treatment / L. P. Abbade, S. Lastória. – Text: direct // International Journal of Dermatology. – 2005. – № 44 (6). – P. 449–456.
 121. Abdul Wahid, S. F. Cell-based therapies for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease / S. F. Abdul Wahid, Z. K. Law, N. A. Ismail, N. M. Lai. – Text: direct // Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2019. – № 12 (12). – P. 117–142.
 122. Aderibigbe, B. A. Alginate in wound dressings / B. A. Aderibigbe, B. Buyana. – Text: direct // Pharmaceutics. – 2018. – № 10. – P. 42.
 123. Aghdash, S. Epidemiology of road traffic Injuries among elderly people: a systematic review and meta-analysis / S. Aghdash, M. H. Aghaei, H. Sadeghi-Bazarghani. – Text: direct // Bulletin of Emergency & Trauma. – 2018. – № 6 (4). – P. 279–291.
 124. Ahmadi, A. R. Stem cells in burn wound healing: a systematic review of the literature / A. R. Ahmadi, M. Chicco, J. Huang [et. al.]. – Text: direct // Burns. – 2019. – Vol. 45. – № 5. – P. 1014–1023.
 125. Alven, S. Chitosan and cellulose-based hydrogels for wound management / S. Alven, B. A. Aderibigbe. – Text: direct // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – № 21 (24). – P. 9656.
 126. Antonopoulos, C. N. Predictors of wound healing following revascularization for chronic limb-threatening Ischemia / C. N. Antonopoulos, A. Lazaris, M. Venermo, G. Geroulakos. – Text: direct // Vascular and Endovascular Surgery. – 2019. – № 53 (8). – P. 649–657.
 127. Aziz, J. Systematic review of controlled clinical studies using umbilical cord blood for regenerative therapy: Identifying barriers to assessing efficacy / J. Aziz, G. Liao, Z. Adams [et. al.]. – Text: direct // Cytotherapy. – 2019. – № 21 (11). – P. 1112–1121.
 128. Babaei, S. Pentoxifylline improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats / S. Babaei, N. Bayat, M. Nouruzian. – Text: direct // European Journal of Pharmacology. – 2013. – № 700. – P. 165–172.
 129. Bagher, Z. Wound healing with alginate/chitosan hydrogel containing hesperidin in rat model / Z. Bagher, A. Ehterami, M. Hossein [et. al.]. – Text: direct // Journal of Drug Delivery Science and Technology. – 2020. – № 55. – P. 101–379.
 130. Bai, Q. Potential Applications of Nanomaterials and Technology for Diabetic Wound Healing. / Q. Bai, K. Han, K. Dong [et. al.]. – Text: direct // Int J Nanomedicine. – 2020. – № 15. – P. 9717–9743.

131. Bainbridge, P. Wound healing and the role of fibroblasts / P. Bainbridge. – Text: direct // Journal of Wound Care. – 2013. – № 22 (8). – P. 407–412.
132. Baldim, V. The enzyme-like catalytic activity of cerium oxide nanoparticles and its dependency on Ce³⁺ surface area concentration / V. Baldim, F. Bedioui, N. Mignet [et. al.]. – Text: direct // Nanoscale. – 2018. – № 10. – P. 6971–6980.
133. Baron, J. M. Optimal support of wound healing: new Insights / J. M. Baron, M. Glatz, E. Proksch. – Text: direct // Dermatology. – 2020. – № 17. – P. 1–8.
134. Beers, E. H. Palliative wound care: less is more / E. H. Beers. – Text: direct // Surgical Clinics of North America. – 2019. – № 99 (5). – P. 899–919.
135. Belikan, P. Intramuscular Injection of combined Calf Blood Compound (CFC) and homeopathic drug Tr14 accelerates muscle regeneration In Vivo / P. Belikan. – Text: direct // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – № 21 (6). – P. 2112.
136. Bernardi, L. Transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells in refractory crohn's disease: systematic review / L. Bernardi, C. H. Santos, V. A. Z. Pinheiro [et. al.]. – Text: direct // Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva. – 2019. – № 32 (4). – P. 69–76.
137. Bi, H. Stromal vascular fraction promotes migration of fibroblasts and angiogenesis through regulation of extracellular matrix in the skin wound healing process / H. Bi, H. Li, C. Zhang. – Text: direct // Stem Cell Research & Therapy. – 2019. – № 10 (1). – P. 302.
138. Bonham, P. A. Assessment and management of patients with venous, arterial, and diabetic/neuropathic lower extremity wounds / P. A. Bonham. – Text: direct // AACN Clinical Issues. – 2003. – № 14. – P. 442–456.
139. Brock, J. Update on the role of Actovegin in musculoskeletal medicine: a review of the past 10 years / J. Brock, D. Golding, P. M. Smith [et. al.]. – Text: direct // Clinical Journal of Sport Medicine. – 2020. – № 30 (1). – P. 83–90.
140. Cai, Y.-L. Military trauma and surgical procedures in conflict area: a review for the utilization of forward surgical team / Y.-L. Cai, J.-T. Ju, W.-B. Liu, J. Zhang. – Text: direct // Military Medicine. – 2018. – № 183. – P. 97–106.
141. Cañedo-Dorantes, L. Skin acute wound healing: a comprehensive review / L. Cañedo-Dorantes, M. Cañedo-Ayala. – Text: direct // International Journal of Inflammation. – 2019. – Vol. 2019. – P. 15.
142. Charbgoon, F. Cerium oxide nanoparticles: green synthesis and biological applications / F. Charbgoon, M. B. Ahmad, M. Darroudi. – Text: direct // International Journal of Nanomedicine. – 2017. – № 12. – P. 1401–1413.
143. Collins, T. J. ImageJ for microscopy / T. J. Collins. – Text: direct // BioTechniques. – 2007. – № 43 (1). – P. 25–30.

144. Correia, A. T. Effects of the chronic exposure to cerium dioxide nanoparticles in *Oncorhynchus mykiss*: assessment of oxidative stress, neurotoxicity and histological alterations / A. T. Correia, D. Rebelo, J. Marques, B. Nunes. – Text: direct // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. – 2019. – № 68. – P. 27–36.
145. Dai, T. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects / T. Dai, M. Tanaka, Y. Huang, M. Hamblin. – Text: direct // *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. – 2011. – № 9. – P. 857–879.
146. Das, S. Biomaterials and nanotherapeutics for enhancing skin wound healing / S. Das, A. B. Baker. – Text: direct // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2016. – № 4. – P. 82.
147. Das, S. Cerium oxide nanoparticles: applications and prospects in nanomedicine / S. Das, J. M. Dowding, K. E. Klump [et. al.]. – Text: direct // *Nanomedicine*. – 2013. – № 8. – P. 1483–1508.
148. Davan, R. Cerium oxide nanoparticles promotes wound healing activity in In-Vivo animal model / R. Davan, R. G. Prasad, V. S. Jakka [et. al.]. – Text: direct // *Journal of Bionanoscience*. – 2012. – № 6 (2). – P. 78–83.
149. Demidova-Rice, T. N. Acute and Impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery / T. N. Demidova-Rice, M. R. Hamblin, I. M. Herman. – Text: direct // *Advances in Skin & Wound Care*. – 2012. – № 25. – P. 304–314.
150. de Munter, J. Increased oxidative stress in the prefrontal cortex as a shared feature of depressive- and ptsd-like syndromes: effects of a standardized herbal antioxidant / de Munter J., Pavlov D., Morozov S. [et. al.]. – Text: direct // *Frontiers in Nutrition*. – 2021. – № 8. – 661455.
151. Dhivya, S. Wound dressings – a review / S. Dhivya, V. V. Padma, E. Santhini. – Text: direct // *Biomedicine*. – 2015. – № 5. – P. 24–28.
152. Diegelmann, R. F. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing / R. F. Diegelmann, M. C. Evans. – Text: direct // *Frontiers in Bioscience*. – 2004. – № 1. – P. 283–289.
153. Dovi, J. V. Neutrophil function in the healing wound: adding insult to Injury? / J. V. Dovi, A. M. Szpaderska, L. A. DiPietro. – Text: direct // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2004. – № 92 (2). – P. 275–280.
154. Duscher, D. Stem cells in wound healing: the future of regenerative medicine? A mini-review / D. Duscher, J. Barrera, V. W. Wong. – Text: direct // *Gerontology*. – 2016. – № 62 (2). – P. 216–225.
155. Dutta, D. Green synthesized cerium oxide nanoparticle: a prospective drug against oxidative harm / D. Dutta, R. Mukherjee, M. Patra [et. al.]. – Text: direct // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2016. – Vol. 147. – P. 45–53.

156. Ehterami, A. Chitosan/alginate hydrogels containing alpha-tocopherol for wound healing in rat model / A. Ehterami, M. Salehi, S. Farzamfar [et. al.]. – Text: direct // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2019. – № 51. – P. 204–213.
157. Eming, S. A. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation / S. A. Eming, P. Martin, M. Tomic-Canic. – Text: direct // *Science Translational Medicine*. – 2014. – № 6 (265). – P. 1–16.
158. Ennis, W. J. Advanced technologies to Improve wound healing: electrical stimulation, vibration therapy, and ultrasound – what is the evidence? / W. J. Ennis, C. Lee, K. Gellada [et. al.]. – Text: direct // *Plastic and Reconstructive Surgery*. – 2016. – № 138 (3). – P. 94–104.
159. Erdagi, S. I. Genipin crosslinked gelatin-diosgenin-nanocellulose hydrogels for potential wound dressing and healing applications / S. I. Erdagi, F. A. Ngwabebhoh, U. Yildiz. – Text: direct // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – № 149. – P. 651–663.
160. Ermakov, A.M.; The first inorganic mitogens: Cerium oxide and cerium fluoride nanoparticles stimulate planarian regeneration via neoblastic activation / Ermakov, A.M., Popov, A.L., Ivanov, V. [et. al.]. // *Mater. Sci. Eng.* – 2019. - 104, 109924, doi:10.1016/j.msec.2019.109924.
161. Estevez, A. Y. Antioxidant enzyme-mimetic activity and neuroprotective effects of cerium oxide nanoparticles stabilized with various ratios of citric acid and EDTA / A. Y. Estevez, M. Ganesana, J. F. Trentini [et. al.]. – Text: direct // *Biomolecules*. – 2019. – № 9 (10). – P. 562.
162. Fan, X. pH-responsive cellulose-based dual drug-loaded hydrogel for wound dressing / X. Fan, L. Yang, T. Wang [et. al.]. – Text: direct // *European Polymer Journal*. – 2019. – № 121. – P. 109–290.
163. Firan, F. C. Current synthesis and systematic review of main effects of Calf Blood deproteinized medicine (Actovegin®) in Ischemic stroke / F. C. Firan, A. Romila, G. Onose. – Text: direct // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – № 21 (9). – P. 31–81.
164. Frykberg, R. G. Challenges in the treatment of chronic wounds / R. G. Frykberg, J. Banks. – Text: direct // *Advances in Skin & Wound Care (New Rochelle)*. – 2015. – № 4. – P. 560–582.
165. Garraud, O. Wound healing: time to look for intelligent, 'natural' immunological approaches? / O. Garraud, W.N. Hozzein, G. Badr. – Text: direct // *BMC Immunol.* – 2017; №18(1):23. – P.39-46.
166. Gibon, E. Aging, Inflammation, stem cells, and bone healing / E. Gibon, L. Lu, S. B. Goodman. – Text: direct // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2016. – № 7. – P. 44.
167. Golyshkin, D. Nanocrystalline cerium dioxide efficacy for prophylaxis of erosive and ulcerative lesions in the gastric mucosa of rats Induced by stress / D. Golyshkin, N. Kobylak, O. Virchenko [et. al.]. – Text: direct // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2016. – № 84. – P. 1383–1392.

168. Grace, J. L. Exploiting macromolecular design to optimize the antibacterial activity of alkylated cationic oligomers / J. L. Grace, E. K. Schneider-Futschik, A. G. Elliott [et. al.]. – Text: direct // *Biomacromolecules*. – 2018. – № 19 (12). – P. 4629–4640.
169. Guekht, A. ARTEMIDA Trial (a randomized trial of efficacy, 12 months International double-blind actovegin): a randomized controlled trial to assess the efficacy of actovegin in poststroke cognitive Impairment / A. Guekht, I. Skoog, S. Edmundson [et. al.]. – Text: direct // *Stroke*. – 2017. – № 48 (5). – P. 1262–1270.
170. Guo, J. Adipose-derived mesenchymal stem cells accelerate diabetic wound healing in a similar fashion as bone marrow-derived cells / J. Guo, H. Hu, J. Gorecka [et. al.]. – Text: direct // *AJP Cell Physiology*. – 2018. – № 315 (6). – P. 885–896.
171. Gupta, A. Synthesis of silver nanoparticles using curcumin-cyclodextrins loaded into bacterial cellulose-based hydrogels for wound dressing applications / A. Gupta, S. M. Briffa, S. Swingler [et. al.]. – Text: direct // *Biomacromolecules*. – 2020. – № 21. – P. 1802–1811.
172. Haalboom, M. Chronic wounds: Innovations in diagnostics and therapeutics / M. Haalboom. – Text: direct // *Current Medicinal Chemistry*. – 2018. – № 25 (41). – P. 5772–5781.
173. Hafner, J. Ulcus cruris: die häufigen, makrovaskulären ursachen: leg ulcers (ulcus cruris): the frequent macrovascular causes / J. Hafner, C. Buset, F. Anzengruber [et. al.]. – Text: direct // *Therapeutische Umschau*. – 2018. – № 75 (8). – P. 506–514.
174. Hall, J. Point prevalence of complex wounds in a defined United Kingdom population / J. Hall, H. L. Buckley, K. A. Lamb [et. al.]. – Text: direct // *Wound Repair and Regeneration*. – 2014. – № 22 (6). – P. 694–700.
175. Hamdi, M. A novel blue crab chitosan/protein composite hydrogel enriched with carotenoids endowed with distinguished wound healing capability: In vitro characterization and in vivo assessment / M. Hamdi, A. Feki, S. Bardaa [et. al.]. – Text: direct // *Materials Science and Engineering C*. – 2020. – № 113. – P. 464–475.
176. Han, G. Chronic wound healing: a review of current management and treatments / G. Han, R. Ceilley. – Text: direct // *Advances in Therapy*. – 2017. – № 34 (3). – P. 599–610.
177. Hart, J. Inflammation: Its role in the healing of acute wounds / J. Hart. – Text: direct // *Journal of Wound Care*. – 2002. – № 11. – P. 205–209.
178. Heckman, K. L. Custom cerium oxide nanoparticles protect against a free radical mediated autoimmune degenerative disease in the brain / K. L. Heckman, W. DeCoteau, A. Estevez [et. al.]. – Text: direct // *ACS Nano*. – 2013. – № 7. – P. 10582–10596.
179. Helenius, G. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose / G. Helenius, H. Backdahl, A. Bodin [et. al.]. – Text: direct // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 2006. – № 76A. – P. 431–438.

- 180.Hesketh, M. Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing / M. Hesketh, K. B. Sahin, Z. E. West, R. Z. Murray. – Text: direct // International Journal of Molecular Sciences. – 2017. – № 18 (7). – P. 15–45.
- 181.Heyer, K. Epidemiology of chronic wounds in Germany: analysis of statutory health insurance data / K. Heyer, K. Herberger, K. Protz [et. al.]. – Text: direct // Wound Repair and Regeneration. – 2016. – № 24 (2). – P. 434–442.
- 182.Huang, S. Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration / S. Huang, X. Fu. – Text: direct // Journal of Controlled Release. – 2010. – № 142. – P. 149–159.
- 183.Hussain, Z. Recent advances in polymer-based wound dressings for the treatment of diabetic foot ulcer: an overview of state-of-the-art / Z. Hussain, H. E. Thu, A. N. Shuid [et. al.]. – Text: direct // Current Drug Targets. – 2017. – № 19. – P. 527–550.
- 184.Jackson, W. M. Mesenchymal stem cell therapy for attenuation of scar formation during wound healing / W. M. Jackson, L. J. Nesti, R. S. Tuan. – Text: direct // Stem Cell Research & Therapy. – 2012. – № 3 (3). – P. 20.
- 185.Johnston-Peck, A. C. In situ oxidation and reduction of cerium dioxide nanoparticles studied by scanning transmission electron microscopy / A. C. Johnston-Peck. – Text: direct // Micron. – 2018. – № 115. – P. 54–63.
- 186.Joorabloo, A. Fabrication of heparinized nano ZnO/poly (vinylalcohol)/carboxymethyl cellulose bionanocomposite hydrogels using artificial neural network for wound dressing application / A. Joorabloo, M. Taghi, H. Adeli [et. al.]. – Text: direct // Journal of Industrial and Engineering Chemistry. – 2019. – № 70. – P. 253–263.
- 187.Joseph, B. Polymer sutures for simultaneous wound healing and drug delivery – a review / B. Joseph, A. George, S. Gopi [et. al.]. – Text: direct // International Journal of Pharmaceutics. – 2017. – Vol. 524. – № 1–2. – P. 454–466.
- 188.Josephson, A. M. Age-related Inflammation triggers skeletal stem/progenitor cell dysfunction / A. M. Josephson, V. Bradaschia-Correa, S. Lee [et. al.]. – Text: direct // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2019. – № 116 (14). – P. 6995–7004.
- 189.Kalantari, K. Chitosan/PVA hydrogels Incorporated with green synthesized cerium oxide nanoparticles for wound healing applications / K. Kalantari, E. Mostafavi, B. Saleh [et. al.]. – Text: direct // European Polymer Journal. – 2020. – № 20. – P. 109–853.
- 190.Kanji, S. Advances of stem cell therapeutics in cutaneous wound healing and regeneration / S. Kanji, H. Das. – Text: direct // Stem Cells International. – 2017. – Vol. 2017. – P. 14.
- 191.Kanji, S. Nanofiber-expanded human umbilical cord blood-derived CD34+ cell therapy accelerates murine cutaneous wound closure by attenuating pro-inflammatory factors and secreting IL-10 / S.

- Kanji, M. Das, R. Aggarwal. – Text: direct // Stem Cell Research. – 2014. – № 12 (1). – P. 275–288.
192. Kar, A. K. Polymer-assisted In situ synthesis of silver nanoparticles with Epigallocatechin Gallate (EGCG) Impregnated wound patch potentiate controlled Inflammatory responses for brisk wound healing / A. K. Kar, A. Singh, N. Dhiman [et. al.]. – Text: direct // International Journal of Nanomedicine. – 2019. – № 14. – P. 9837–9854.
193. Karppinen, S. M. Toward understanding scarless skin wound healing and pathological scarring / S. M. Karppinen, R. Heljasvaara, D. Gullberg [et. al.]. – Text: direct // Faculty of 1000 Research. – 2019. – № 8. – P. 787.
194. Kavros, S. J. Diagnostic and therapeutic ultrasound on venous and arterial ulcers: a focused review / S. J. Kavros, R. Coronado. – Text: direct // Advances in Skin & Wound Care. – 2018. – № 10. – P. 39–46.
195. Kaygusuz, H. Antimicrobial cerium Ion-chitosan crosslinked alginate biopolymer films: a novel and potential wound dressing / H. Kaygusuz, E. Torlak, G. Akın-Evingür [et. al.]. – Text: direct // International Journal of Biological Macromolecules. – 2017. – № 105 (1). – P. 1161–1165.
196. Khorasani, T. M. Design and optimization of process parameters of polyvinyl (alcohol)/chitosan/nano zinc oxide hydrogels as wound healing materials / T. M. Khorasani, A. Joorabloo, H. Adeli [et. al.]. – Text: direct // Carbohydrate Polymers. – 2019. – № 207. – P. 542–554.
197. Kim, S. Y. Macrophages in wound healing: activation and plasticity / S. Y. Kim, M. G. Nair. – Text: direct // Immunology and Cell Biology. – 2019. – № 97 (3). – P. 258–267.
198. Koh, T. J. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage / T. J. Koh, L. A. DiPietro. – Text: direct // Expert Reviews in Molecular Medicine. – 2011. – № 13. – P. 23.
199. Koivuniemi, R. Clinical study of nanofibrillar cellulose hydrogel dressing for skin graft donor site treatment / R. Koivuniemi, T. Hakkarainen, J. Kiiskinen [et. al.]. – Text: direct // Advances in Skin & Wound Care. – 2020. – № 9. – P. 199–210.
200. Kurita, M. In vivo reprogramming of wound-resident cells generates skin epithelial tissue / M. Kurita, T. Araoka, T. Hishida. – Text: direct // Nature. – 2018. – № 561 (7722). – P. 243–247.
201. Landen, N. X. Transition from Inflammation to proliferation: a critical step during wound healing / N. X. Landen, D. Li, M. Stähle. – Text: direct // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2016. – № 73 (20). – P. 3861–3885.
202. Lee, Y. S. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells ameliorate psoriasis-like skin inflammation in mice / Y. S. Lee, S. K. Sah, J. H. Lee [et. al.]. – Text: direct // Biochemistry and Biophysics Reports. – 2016. – № 9. – P. 281–288.

- 203.Li, J. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce systemic Inflammation and attenuate LPS-induced acute lung injury in rats / J. Li, D. Li, X. Liu [et. al.]. – Text: direct // Journal of Inflammation. – 2012. – № 9 (1). – P. 33.
- 204.Li, L. The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons / L. Li, M. Rutlin, V. E. Abaira [et. al.]. – Text: direct // Cell. – 2011. – № 147. – P. 1615–1627.
- 205.Li, X. X. Fabrication of Ag–ZnO carboxymethyl cellulose/K-carrageenan/graphene oxide/konjac glucomannan hydrogel for effective wound dressing in nursing care for diabetic foot ulcers / X. X. Li, J. Y. Dong, Y. H. Li [et. al.]. – Text: direct // Applied Nanoscience. – 2020. – № 10. – P. 729–738.
- 206.Liu, L. Meta-analysis of preclinical studies of mesenchymal stromal cells to treat rheumatoid arthritis / L. Liu, C. W. Wong, M. Han. – Text: direct // EBioMedicine. – 2019. – № 47. – P. 563–577.
- 207.Lucas, T. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair / T. Lucas, A. Waisman, R. Ranjan. – Text: direct // The Journal of Immunology. – 2010. – № 184 (7). – P. 3964–3977.
- 208.Lukin, A. V. Morphometry results of formed osteodefects when using nanocrystalline CeO₂ in the early stages of regeneration / A. V. Lukin, G. I. Lukina, A. V. Volkov [et. al.]. – Text: direct // International Dental Journal. – 2019. – Vol. 2019. – № 1. – P. 1–9.
- 209.Lynch, M. D. Fibroblast heterogeneity: Implications for human disease / M. D. Lynch, F. M. Watt. – Text: direct // The Journal of Clinical Investigation. – 2018. – № 128 (1). – P. 26–35.
- 210.Manturona, N. E. Age dependent changes of cell update markers and endothelial activity related to the involutionary transformations of the skin system / N. E. Manturona, V. A. Stupin, A. V. Kononov [et. al.]. – Text: direct // Biomedical Research (India). – 2018. – Vol. 29. – № 20. – P. 3684–3687.
- 211.Martinengo, L. Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies / L. Martinengo, M. Olsson, R. Bajpai [et. al.]. – Text: direct // Annals of Epidemiology. – 2019. – № 29. – P. 8–15.
- 212.Masood, N. Silver nanoparticle Impregnated chitosan-PEG hydrogel enhances wound healing in diabetes Induced rabbits / N. Masood, R. Ahmed, M. Tariq [et. al.]. – Text: direct // International Journal of Pharmaceutics. – 2019. – № 559. – P. 23–36.
- 213.Matica, M. A. Chitosan as a wound dressing starting material: antimicrobial properties and mode of action / M. A. Matica, F. L. Aachmann, A. Tøndervik [et. al.]. – Text: direct // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – № 20 (23). – P. 58–89.

214. Matthay, M. A. Mesenchymal stem (stromal) cells: biology and preclinical evidence for therapeutic potential for organ dysfunction following trauma or sepsis / M. A. Matthay, S. Pati, J. W. Lee. – Text: direct // Stem Cells. – 2017. – № 35 (2). – P. 316–324.
215. Mauck, K. F. Systematic review and meta-analysis of surgical Interventions versus conservative therapy for venous ulcers / K. F. Mauck, N. Asi, C. Undavalli. – Text: direct // Journal of Vascular Surgery. – 2014. – № 60 (2). – P. 60–70.
216. Maver, T. A review of herbal medicines in wound healing. / T. Maver, U. Maver, K. Stana Kleinschek [et. al.]. – Text: direct // Int J Dermatol. – 2015. – № 54(7). – P. 740–751.
217. Mehrabani, G. M. Chitin/silk fi broin/TiO₂ bio-nanocomposite as a biocompatible wound dressing bandage with strong antimicrobial activity / G. M. Mehrabani, R. Karimian, R. Rakhshaei [et. al.]. – Text: direct // International Journal of Biological Macromolecules. – 2018. – № 116. – P. 966–976.
218. Milazzo, M. Biodegradable polymeric micro/nano-structures with Intrinsic antifouling/antimicrobial properties: relevance in damaged skin and other biomedical applications / M. Milazzo, G. Gallone, E. Marcello [et. al.]. – Text: direct // Journal of Functional Biomaterials. – 2020. – № 11 (3). – P. 60.
219. Miscianinov, V. MicroRNA-148b targets the TGF- β pathway to regulate angiogenesis and endothelial-to-mesenchymal transition during skin wound healing / V. Miscianinov, A. Martello, L. Rose. – Text: direct // Molecular Therapy. – 2018. – № 26 (8). – P. 1996–2007.
220. Morton, L. M. Wound healing and treating wounds: differential diagnosis and evaluation of chronic wounds / L. M. Morton, T. J. Phillips. – Text: direct // Journal of the American Academy of Dermatology. – 2016. – № 74 (4). – P. 589–605.
221. Muhammad, S. A. Therapeutic efficacy of mesenchymal stromal cells and secretome in pulmonary arterial hypertension: a systematic review and meta-analysis / S. A. Muhammad, A. Y. Abbas, Y. Saidu [et. al.]. – Text: direct // Biochimie. – 2020. – № 168. – P. 156–168.
222. Munoz, L. D. Skin resident $\gamma\delta$ T cell function and regulation in wound repair / L. D. Munoz, M. J. Sweeney, J. M. Jameson. – Text: direct // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – № 21 (23). – P. 9286.
223. Mustoe, T. A. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis / T. A. Mustoe, K. O'Shaughnessy, O. Kloeters. – Text: direct // Plastic and Reconstructive Surgery. – 2006. – № 117 (7). – P 35–41.
224. Naderi, N. Nanoparticles in wound healing; from hope to promise, from promise to routine. / N. Naderi, D. Karponis, A. Mosahebi, A.M. Seifalian – Text: direct // Front Biosci (Landmark Ed). – 2018. – № 23. P. 1038–1059.

225. Naz, S. Cerium oxide nanoparticles: a «radical» approach to neurodegenerative disease treatment / S. Naz, J. Beach, B. Heckert [et. al.]. – Text: direct // *Nanomedicine*. – 2017. – № 12. – P. 545–553.
226. Nelson, B. C. Antioxidant cerium oxide nanoparticles in biology and medicine / B. C. Nelson, M. E. Johnson, M. L. Walker [et. al.]. – Text: direct // *Antioxidants (Basel)*. – 2016. – Vol. 17. – № 5 (2). – P. 15.
227. Nerlander, M. P. Epidemiology of trauma patients from the mosul offensive, 2016–2017: results from a dedicated trauma center in Erbil, Iraqi Kurdistan / M. P. Nerlander, R. M. Haweizy, M. A. Wahab. – Text: direct // *World Journal of Surgery*. – 2019. – № 43. – P. 368–373.
228. Nethi, S. K. Recent advances in Inorganic nanomaterials for wound-healing applications / S. K. Nethi, S. Das, C. R. Patra, S. Mukherjee. – Text: direct // *Biomaterials Science*. – 2019. – Vol. 1. – № 7 (7). – P. 2652–2674.
229. Nie, C. Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis / C. Nie, D. Yang, J. Xu [et. al.]. – Text: direct // *Cell Transplantation*. – 2011. – № 20 (2). – P. 205–216.
230. Norman, G. Antibiotics and antiseptics for surgical wounds healing by secondary intention / G. Norman, J. C. Dumville, D. P. Mohapatra [et. al.]. – Text: direct // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2016. – № 3 (3). – P. 39–49.
231. Norman, G. Dressings and topical agents for treating venous leg ulcers / G. Norman, M. J. Westby, A. D. Rithalia [et. al.]. – Text: direct // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2018. – № 6 (6). – P. 209–211.
232. Nosenko, M. A. Proinflammatory cytokines and skin wound healing in mice / M. A. Nosenko, S. G. Ambaryan, M. S. Drutskaya. – Text: direct // *Molecular Biology*. – 2019. – № 53. – P. 653–664.
233. Nourian, D. A. Skin tissue engineering: wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies / D. A. Nourian, B. F. Mirahmadi, M. Chehelgerdi, D. S. Raeisi. – Text: direct // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2019. – № 10 (1). – P. 111.
234. Novello, S. Clinical application of mesenchymal stem cells in periodontal regeneration: a systematic review and meta-analysis / S. Novello, A. Debouche, M. Philippe [et. al.]. – Text: direct // *Journal of Periodontal Research*. – 2020. – № 55 (1). – P. 1–12.
235. Ogawa, R. Keloid and hypertrophic scars are the result of chronic Inflammation in the reticular dermis / R. Ogawa. – Text: direct // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – № 18 (3). – P. 606.
236. Oh, J. Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities / J. Oh, Y. D. Lee, A. J. Wagers. – Text: direct // *Nature Medicine*. – 2014. – № 20. – P. 870–880.

- 237.Olsson, M. The humanistic and economic burden of chronic wounds: a systematic review / M. Olsson, K. Järbrink, U. Divakar [et. al.]. – Text: direct // Wound Repair and Regeneration. – 2019. – № 27 (1). – P. 114–125.
- 238.Patel, S. Mechanistic Insight into diabetic wounds: pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing / S. Patel, S. Srivastava, M. R. Singh, D. Singh. – Text: direct // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2019. – № 112. – P. 108–615.
- 239.Patent 7833790-B2 United States. Wound dressing comprising oxidized cellulose and human recombinant collagen cullen / M. B. Cullen, D. W. Silcock, C. Boyle. – Filed 8.08.2006; Pub. 16.11.2010. – URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/US7833790#section=Information-Sources> (date of treatment: 19.03.2021). – Text: electronic.
- 240.Pérez, R. A. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration / R. A. Pérez, J. E. Won, J. C. Knowles, H. W. Kim. – Text: direct // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2013. – № 65. – P. 471–496.
- 241.Peter-Riesch, B. The diabetic foot: the never-ending challenge / B. Peter-Riesch. – Text: direct // Endocrine Development. – 2016. – № 31. – P. 108–134.
- 242.Plikus, M. V. Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing / M. V. Plikus, C. F. Guerrero-Juarez, M. Ito [et. al.]. – Text: direct // Science. – 2017. – № 355. – P. 748–752.
- 243.Prockop, D. J. Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSCs): role as guardians of Inflammation / D. J. Prockop, J. Y. Oh. – Text: direct // Molecular Therapy. – 2012. – № 20 (1). – P. 14–20.
- 244.Qi, W. Controlled releasing of SDF-1 α in chitosan-heparin hydrogel for endometrium Injury healing in rat model / W. Qi, L. Xu, S. Zhao [et. al.]. – Text: direct // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – № 143. – P. 63–172.
- 245.Raffetto, J. D. Why venous leg ulcers have difficulty healing: overview on pathophysiology, clinical consequences, and treatment / J. D. Raffetto, D. Ligi, R. Maniscalco [et. al.]. – Text: direct // Journal of Clinical Medicine. – 2020. – № 10 (1). – P. 29.
- 246.Rasool, A. Stimuli responsive biopolymer (chitosan) based blend hydrogels for wound healing application / A. Rasool, S. Ata, A. Islam. – Text: direct // Carbohydrate Polymers. – 2019. – № 203. – P. 423–429.
- 247.Rather, H. A. Antioxidative study of cerium oxide nanoparticle functionalised PCL-gelatin electrospun fibers for wound healing application / H. A. Rather, R. Thakore, R. Singh [et. al.]. – Text: direct // Bioactive Materials. – 2017. – № 3 (2). – P. 201–211.
- 248.Reed, K. Exploring the properties and applications of nanoceria: Is there still plenty of room at the bottom? / K. Reed, A. Cormack, A. Kulkarni [et. al.]. – Text: direct // Environmental Science: Nano. – 2014. – № 1. – P. 390–405.

249. Reed, K. Modeling the kinetic behavior of reactive oxygen species with cerium dioxide nanoparticles / K. Reed, N. Bush, Z. Burns [et. al.]. – Text: direct // *Biomolecules*. – 2019. – № 9 (9). – P. 447.
250. Reichl, F. Actovegin® reduces PMA-Induced Inflammation on human cells / F. Reichl, C. Högg, F. Liu. – Text: direct // *European Journal of Applied Physiology*. – 2020. – № 120. – P. 1671–1680.
251. Reinke, J. M. Wound repair and regeneration / J. M. Reinke, H. Sorg. – Text: direct // *European Surgical Research*. – 2012. – № 49 (1). – P. 35–43.
252. Ribeiro, D. M. L. Polysaccharide-based formulations for healing of skin-related wound Infections: lessons from animal models and clinical trials / D. M. L. Ribeiro, J. A. R. Carvalho, V. de Macedo [et. al.]. – Text: direct // *Biomolecules*. – 2019. – № 10 (1). P. 63.
253. Ricco, J. B. The diabetic foot: a review / J. B. Ricco, L. Thanh Phong, F. Schneider [et. al.]. – Text: direct // *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. – 2013. – Vol. 54. – P. 755–762.
254. Richardson, R. Adult zebrafish as a model system for cutaneous wound-healing research / R. Richardson, K. Slanchev, C. Kraus [et. al.]. – Text: direct // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2013. – № 133. – P. 1655–1665.
255. Ridiandries, A. The role of chemokines in wound healing / A. Ridiandries, J. T. M. Tan, C. A. Bursill. – Text: direct // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – № 19 (10). – P. 3217.
256. Rodrigues, M. Wound healing: a cellular perspective / M. Rodrigues, N. Kosaric, C. A. Bonham, G. C. Gurtner. – Text: direct // *Physiological Reviews*. – 2019. – № 99 (1). – P. 665–706.
257. Rogers, L. C. The right to bear legs / L. C. Rogers, L. A. Lavery, D. G. Armstrong. – Text: direct // *Journal of the American Podiatric Medical Association*. – 2008. – № 98. – P. 166–168.
258. Römer, I. Impact of particle size, oxidation state and capping agent of different cerium dioxide nanoparticles on the phosphate-induced transformations at different pH and concentration / I. Römer, S. M. Briffa, Y. A. R. Dasilva [et. al.]. – Text: direct // *PLOS One*. – 2019. – № 14 (6). – P. 11–17.
259. Rosberg, H. E. An Increasing number of hand Injuries in an elderly population – a retrospective study over a 30-year period / H. E. Rosberg, L. B. Dahlin. – Text: direct // *BMC Geriatrics*. – 2018. – № 18 (1). – P. 68.
260. Sadeghi, S. Carboxymethyl cellulose-human hair keratin hydrogel with controlled clindamycin release as antibacterial wound dressing / S. Sadeghi, J. Nourmohammadi, A. Ghaee, N. Soleimani. – Text: direct // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – № 147. – P. 1239–1247.

261. Sahana, T. G. Biopolymers: applications in wound healing and skin tissue engineering / T. G. Sahana, P. D. Rekha. – Text: direct // *Molecular Biology Reports*. – 2018. – № 45 (6). – P. 2857–2867.
262. Sannino, A. Biodegradable cellulosebased hydrogels: design and applications / A. Sannino, C. Demitri, M. Madaghiele. – Text: direct // *Materials*. – 2009. – № 2. – P. 353–373.
263. Schafer, M. Oxidative stress in normal and Impaired wound repair / M. Schafer, S. Werner. – Text: direct // *Pharmacological Research*. – 2008. – № 58 (2). – P. 165–171.
264. Schmidtchen, A. The humanistic and economic burden of chronic wounds: a protocol for a systematic review / A. Schmidtchen, C. Pang, G. Ni [et. al.]. – Text: direct // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2017. – № 6. – P. 7.
265. Schneider, C. A. NIH Image to ImageJ: 25 years of Image analysis / C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri. – Text: direct // *Nature Methods*. – 2012. – № 9 (7). – P. 671–675.
266. Seifert, A. W. Skin regeneration in adult axolotls: a blueprint for scar-free healing in vertebrates / A. W. Seifert, J. R. Monaghan, S. R. Voss, M. Maden. – Text: direct // *PLOS One*. – 2012. – № 7. – P. 54–61.
267. Seifert, A. W. Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (acomys) / A. W. Seifert, S. G. Kiama, M. G. Seifert [et. al.]. – Text: direct // *Nature*. – 2012. – № 489. – P. 561–565.
268. Sell, S. The use of natural polymers in tissue engineering: a focus on electrospun extracellular matrix analogues / S. Sell, P. Wolfe, K. Garg [et. al.]. – Text: direct // *Polymers for Advanced Technologies*. – 2010. – № 2. – P. 522–553.
269. Sen, C. K. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy / C. K. Sen, G. M. Gordillo, S. Roy. – Text: direct // *Wound Repair and Regeneration*. – 2009. – № 17 (6). – P. 763–771.
270. Serra, M. B. From Inflammation to current and alternative therapies Involved in wound healing / M. B. Serra, W. A. Barroso, N. N. da Silva. – Text: direct // *International Journal of Inflammation*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 17.
271. Shukla, S. K. Pharmacological control of Inflammation in wound healing / S. K. Shukla, A. K. Sharma, V. Gupta, M. H. Yashavarddhan. – Text: direct // *Journal of Tissue Viability*. – 2019. – № 28 (4). – P. 218–222.
272. Silina, E. Mesenchymal Stem Cells Application in Wound Tissue Healing in Old Animals. / E. Silina, N. Manturova, V. Stupin // *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*. – 2020. – № 13. – P. 103–116

273. Silina, E. V. Efficacy of a novel smart polymeric nanodrug in the treatment of experimental wounds in rats / E. V. Silina, N. E. Manturova, V. I. Vasin [et. al.]. – Text: direct // *Polymers*. – 2020. – № 12. – P. 11–26.
274. Silina, E. V. Multicomponent polysaccharide essential formula of wound healing medicines enriched with fibroblast growth factor / E. V. Silina, N. V. Khokhlov, V. A. Stupin [et. al.]. – Text: direct // *International Journal of Biomedicine*. – 2019. – № 9 (3). – P. 247–250.
275. Sorg, H. Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts / H. Sorg, D. J. Tilkorn, S. Hager [et. al.]. – Text: direct // *European Surgical Research*. – 2017. – Vol. 58. – № 1–2. – P. 81–94.
276. Stoica, A. E. Scar-free healing: current concepts and future perspectives / A. E. Stoica, A. M. Grumezescu, A. O. Hermenean [et. al.]. – Text: direct // *Nanomaterials (Basel)*. – 2020. – № 10 (11). – P. 21–79.
277. Strbo, N. Innate and adaptive Immune responses in wound epithelialization / N. Strbo, N. Yin, O. Stojadinovic. – Text: direct // *Adv Wound Care (New Rochelle)*. – 2014. – № 3 (7). – P. 492–501.
278. Stunova, A. Dermal fibroblasts – a heterogeneous population with regulatory function in wound healing / A. Stunova, L. Vistejnova. – Text: direct // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. – 2018. – № 39. – P. 137–150.
279. Stupin, V. A. Biological mechanisms of the chronic wound and diabetic foot healing: the role of collagen / V. A. Stupin, R. B. Gabitov, T. G. Sinelnikova, E. V. Silina. – Text: direct // *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*. – 2018. – № 19 (4). – P. 373–382.
280. Su, W. H. Human umbilical cord mesenchymal stem cells extricate bupivacaine-Impaired skeletal muscle function via mitigating neutrophil-mediated acute Inflammation and protecting against fibrosis / W. H. Su, C. J. Wang, H. C. Fu. – Text: direct // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – № 20 (17). – P. 2454–2464.
281. Su, W. H. Nonsteroidal anti-Inflammatory drugs for wounds: pain relief or excessive scar formation? / W. H. Su, M. H. Cheng, W. L. Lee [et. al.]. – Text: direct // *Mediators of Inflammation*. – 2010. – Vol. 2010. – P. 779–783.
282. Sulaeva, I. Fabrication of bacterial cellulose-based wound dressings with Improved performance by impregnation with alginate / I. Sulaeva, H. Hettegger, A. Bergen [et. al.]. – Text: direct // *Materials Science and Engineering*. – 2020. – № 110. – P. 97–112.
283. Sun, M. Possible contribution of fibrocytes to increased type I collagen synthesis during the early stage of dermal wound repair in human skin / M. Sun, P. Wang, T. Okubo. – Text: direct // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2018. – № 138 (1). – P. 240–242.

284. Suzdaltseva, Y. Locally delivered umbilical cord mesenchymal stromal cells reduce chronic Inflammation in long-term nonhealing wounds: a randomized study / Y. Suzdaltseva, S. L. Kiselev, S. Zhidkih, V. Stupin. – Text: direct // Stem Cells International. – 2020. – Vol. 2020. – P. 11.
285. Tabata, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications / Y. Tabata. – Text: direct // Journal of the Royal Society Interface. – 2009. – № 6. – P. 311–324.
286. Takeo, M. Wound healing and skin regeneration / M. Takeo, W. Lee, M. Ito. – Text: direct // Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. – 2015. – № 5 (1). – P. 232–267.
287. Tapeinos, C. CeO₂ nanoparticles-loaded pH-responsive microparticles with antitumoral properties as therapeutic modulators for osteosarcoma / C. Tapeinos, M. Battaglini, M. Prato [et. al.]. – Text: direct // ACS Omega. – 2018. – № 3 (8). – P. 8952–8962.
288. Thulabandu, V. Dermal fibroblast in cutaneous development and healing / V. Thulabandu, D. Chen, R. P. Atit. – Text: direct // Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology. – 2018. – № 7 (2). – P. 10.
289. Trent, J. T. Venous ulcers: pathophysiology and treatment options / J. T. Trent, A. Falabella, W. H. Eaglstein, R. S. Kirsner. – Text: direct // Ostomy Wound Management. – 2005. – № 51. – P. 38–54.
290. Van Battum, P. Differences in minor amputation rate in diabetic foot disease throughout Europe are in part explained by differences in disease severity at presentation / P. Van Battum, N. Schaper, L. Prompers [et. al.]. – Text: direct // Diabetic Medicine. – 2011. – № 28. – P. 199–205.
291. Van Gent, W. B. Management of venous ulcer disease / W. B. Van Gent, E. D. Wilschut, C. Wittens. – Text: direct // The BMJ. – 2010. – № 341. – P. 604–605.
292. Velnar, T. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms / T. Velnar, T. Bailey, V. Smrkolj. – Text: direct // Journal of International Medical Research. – 2009. – № 37. – P. 1528–1542.
293. Velnar, T. Tissue augmentation in wound healing: the role of endothelial and epithelial cells / T. Velnar, L. Gradisnik. – Text: direct // Medical Archives. – 2018. – № 72 (6). – P. 444–448.
294. Vestweber, D. How leukocytes cross the vascular endothelium / D. Vestweber. – Text: direct // Nature Reviews Immunology. – 2015. – № 15 (11). – P. 692–704.
295. Volmer-Thole, M. Neuropathy and diabetic foot syndrome / M. Volmer-Thole, R. Lobmann. – Text: direct // International Journal of Molecular Sciences. – 2016. – № 17 (6). – P. 917.
296. Walton, E.W. Topical phytochemicals: applications for wound healing. / E.W. Walton / Adv Skin Wound Care. – 2014. – №27(7). – P. 328–332.
297. Wang, L. T. Human Mesenchymal Stem Cells (MSCs) for treatment towards immune – and inflammation-mediated diseases: review of current clinical trials / L. T. Wang, C. H. Ting, M. L. Yen. – Text: direct // Journal of Biomedical Science. – 2016. – № 23 (1). – P. 76.

298. Wang, P. Wound healing / P. Wang, B. Huang, H. Horng [et. al.]. – Text: direct // Journal of the Chinese Medical Association. – 2018. – № 81 (2). – P. 94–101.
299. Wang, Y. Burn Injury: challenges and advances in burn wound healing, Infection, pain and scarring / Y. Wang, J. Beekman, J. Hew [et. al.]. – Text: direct // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2018. – № 123. – P. 3–17.
300. Webster, J. Negative pressure wound therapy for surgical wounds healing by primary closure / J. Webster, Z. Liu, G. Norman [et. al.]. – Text: direct // Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2019. – № 3 (3). – P. 629–639.
301. Westby, M. J. Dressings and topical agents for treating pressure ulcers / M. J. Westby, J. C. Dumville, M. O. Soares [et. al.]. – Text: direct // Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2017. – № 6 (6). – P. 119–147.
302. Wild, H. Epidemiology of Injuries sustained by civilians and local combatants in contemporary armed conflict: an appeal for a shared trauma registry among humanitarian actors / H. Wild, B. T. Stewart, C. LeBoa [et. al.]. – Text: direct // World Journal of Surgery. – 2020. – № 44 (6). – P. 1863–1873.
303. Wilgus, T. A. Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions / T. A. Wilgus, S. Roy, J. C. McDaniel. – Text: direct // Adv Wound Care (New Rochelle). – 2013. – № 2 (7). – P. 379–388.
304. Word, R. Medical and surgical therapy for advanced chronic venous Insufficiency / R. Word. – Text: direct // Surgical Clinics of North America. – 2010. – № 90. – P. 1195–1214.
305. Xiaomin, M. Hollow, rough, and nitric oxide-releasing cerium oxide nanoparticles for promoting multiple stages of wound healing / M. Xiaomin, C. Yan, J. Hui [et. al.]. – Text: direct // Advanced Healthcare Materials. – 2019. – № 8 (16). – P. 1478–1487.
306. Xue, H. Chitosan-coated cerium oxide nanocubes accelerate cutaneous wound healing by curtailing persistent Inflammation / H. Xue, L.-D. Li, G.-M. Lyu [et. al.]. – Text: direct // Inorganic Chemistry Frontiers. – 2017. – № 5 (2). – P. 77–78.
307. Xue, H. Quaternized chitosan-matrigel-polyacrylamide hydrogels as wound dressing for wound repair and regeneration / H. Xue, L. Hu, Y. Xiong [et. al.]. – Text: direct // Carbohydrate Polymers. – 2019. – № 226. – P. 115–302.
308. Xue, M. Extracellular matrix reorganization during wound healing and Its Impact on abnormal scarring / M. Xue, C. J. Jackson. – Text: direct // Adv Wound Care (New Rochelle). – 2015. – № 4 (3). – P. 119–136.

309. Yang, H. Stable and biocompatible hydrogel composites based on collagen and dialdehyde carboxymethyl cellulose in a biphasic solvent system / H. Yang, L. Shen, H. Bu, G. Li. – Text: direct // Carbohydrate Polymers. – 2019. – № 222. – P. 63.
310. Yokoyama, H. Prx-1 expression in *Xenopus laevis* scarless skin–wound healing and Its resemblance to epimorphic regeneration / H. Yokoyama, T. Maruoka, A. Aruga [et. al.]. – Text: direct // Journal of Investigative Dermatology. – 2011. – № 131. – P. 2477–2485.
311. Zgheib, C. Use of cerium oxide nanoparticles conjugated with microRNA-146a to correct the diabetic wound healing Impairment / C. Zgheib, S. A. Hilton, L. C. Dewberry [et. al.]. – Text: direct // Journal of The American College of Surgeons. – 2019. – № 228 (1). – P. 107–115.
312. Zhang, C. Preparation and characterization of carboxymethyl chitosan/collagen peptide/oxidized konjac composite hydrogel / C. Zhang, X. Yang, W. Hu [et. al.]. – Text: direct // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – № 149. – P. 31–40.
313. Zhang, L. A systematic review and meta-analysis of clinical effectiveness and safety of hydrogel dressings in the management of skin wounds / L. Zhang, H. Yin, X. Lei. – Text: direct // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2019. – № 7. – P. 342.
314. Zhang, N. Modulating cationicity of chitosan hydrogel to prevent hypertrophic scar formation during wound healing / N. Zhang, T. Gao, Y. Wang [et. al.]. – Text: direct // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – № 154. – P. 835–843.
315. Zhang, P. Global epidmiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis / P. Zhang, J. Lu, Y. Jing [et. al.]. – Text: direct // Annals of Internal Medicine. – 2017. – Vol. 49. – № 2. – P. 106–116.
316. Zhao, R. Inflammation in chronic wounds / R. Zhao, H. Liang, E. Clarke [et. al.]. – Text: direct // International Journal of Molecular Sciences. – 2016. – № 17 (12). – P. 20–85.
317. Zielins, E. R. Emerging drugs for the treatment of wound healing / E. R. Zielins, E. A. Brett, A. Luan. – Text: direct // Expert Opinion on Emerging Drugs. – 2015. – № 20 (2). – P. 235–246.
318. Zimmermann, A. The diabetic foot / A. Zimmermann, C. Reeps, F. Hartl [et. al.]. – Text: direct // Der Chirurg. – 2009. – № 80. – P. 430–436.