



## МЕСТНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ В СРАВНИТЕЛЬНОЙ ОЦЕНКЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЗАЖИВЛЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕНОЗНОЙ ТРОФИЧЕСКОЙ ЯЗВЫ

Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков,  
Украина

**Цель.** Изучить эффективность стромальных клеток жировой ткани в восстановлении эпидермального слоя экспериментальной венозной трофической язвы.

**Материал и методы.** Формирование экспериментальной трофической язвы осуществлено у 14 кроликов-самцов линии Шиншилла. 7 кроликам (основная группа) в комплексном лечении осуществлялась ауто-трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), выделенных из жировой ткани по методике Р.А. Zuk et al. У 7 кроликов (контрольная группа) в местном лечении применялись ежедневные перевязки с обработкой язвы раствором диоксида и последующим накладыванием мази на гидрофильной основе («Левомеколь»). В обеих группах на 1, 7, 14, 21-е сутки исследовались морфологические (демаркационный вал, относительный объем лейкоцитарно-некротической зоны и грануляционной ткани) и иммуногистохимические (определение оптической плотности иммунофлуоресценции коллагенов I и II типов, количественный подсчет иммунных клеток, продуцирующих ИЛ-6 и ФНО $\alpha$ ) показатели.

**Результаты.** На 7-е сутки в основной группе показатели лейкоцитарно-некротического и лейкоцитарно-демаркационного валов составили  $49,21 \pm 2,0\%$  и  $18,03 \pm 1,6\%$  соответственно, в группе сравнения –  $51,09 \pm 5,8\%$ . Грануляционная ткань составляла в основной группе  $32,55 \pm 2,4\%$ , в группе сравнения –  $29,73 \pm 2,9\%$ . Оптическая плотность свечение коллагена III типа превышала показатель для коллагена I типа и составляла  $0,069 \pm 0,001$  ус. ед. св. в основной группе и  $0,036 \pm 0,001$  ус. ед. св. – в контрольной. На 21-е сутки в основной группе отмечалось уменьшение некротического очага, грануляционная ткань содержала большое количество микрососудов, клетки фибропластического ряда, макрофаги, лимфоциты, большое количество гигантских многоядерных клеток. Число клеток, экспрессирующих интерлейкин-6 и фактор некроза опухолей- $\alpha$ , значительно снизилось, отмечалось превалирование молодого интерстициального коллагена III типа.

**Заключение.** Применение клеточной терапии путем ауто-трансплантации ММСК, выделенных из жировой ткани, в местном лечении экспериментальной «венозной» трофической язвы, приводит к ускорению репаративных процессов и позволяет достичь ее заживления.

*Ключевые слова:* хроническая венозная недостаточность, трофическая язва, клеточная терапия, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, эксперимент, морфологическое исследование, иммуногистохимические исследования

**Objective.** To study the effectiveness of adipose tissue stromal cells in the restoration of the epidermal layer of an experimental venous trophic ulcer.

**Methods.** The formation of an experimental trophic ulcer was performed in 14 rabbits of the Chinchilla line. 7 rabbits (main group) in complex treatment underwent autotransplantation of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) isolated from adipose tissue according to the method of Zuk et al.; 7 rabbits (control group) in local treatment used daily dressings with treatment of ulcers with dioxidine solution and subsequent application of hydrophilic ointment ("Levomecol"). In both groups on the 1<sup>st</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, and 21<sup>st</sup> days, morphological (demarcation shaft, relative volume of leukocyte-necrotic zone and granulation tissue) and immunohistochemical (determination of the optical density of immunofluorescence of collagen types I and II, quantitative counting of immune cells producing IL-6 and TNF $\alpha$ ) parameters.

**Results.** On the 7<sup>th</sup> day in the main group, the indicators of leukocyte-necrotic and leukocyte-demarcation shafts were  $49.21 \pm 2.0\%$  and  $18.03 \pm 1.6\%$ , respectively, in the comparison group –  $51.09 \pm 5.8\%$ . Granulation tissue was  $32.55 \pm 2.4\%$  in the main group,  $29.73 \pm 2.9\%$  in the comparison group. The optical luminescence density of type III collagen exceeded that of type I collagen and was  $0.069 \pm 0.001$  conventional units of collagen luminescence in the main group and  $0.036 \pm 0.001$  conventional units of collagen luminescence - in the control group. On the 21<sup>st</sup> day in the main group there was a decrease in necrotic lesions, granulation tissue contained a large number of microvessels, fibroplastic cells, macrophages, lymphocytes, a large number of giant multinucleated cells. The number of cells expressing interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  decreased significantly, there was a predominance of young interstitial collagen type III.

**Conclusion.** The use of cellular therapy by autotransplantation of MMSCs isolated from adipose tissue in the local treatment of experimental "venous" trophic ulcer, accelerates reparative processes and allows to achieve its healing.

*Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells, "venous" trophic ulcer, cell therapy, chronic venous insufficiency, experiment, morphological study, immunohistochemical studies*

**Novosti Khirurgii. 2022 Mar-Apr; Vol 30 (2): 135-143**

The articles published under CC BY NC-ND license

**Local Transplantation of Stromal Cells of Adipose Tissue in the Comparative Assessment of the Healing Parameters of an Experimental Venous Trophic Ulcer**

**V.I. Lupaltsov, S.S. Kitchenko, I.V. Sorokina, O.V. Kaluzhyna**



**Научная новизна статьи**

Изучены результаты эффективности местной аутотрансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из жировой ткани, в лечении экспериментальной трофической язвы венозной этиологии. Местное применение клеточной терапии позволяет гарантированно получить положительный результат и сократить сроки заживления язвенного дефекта у экспериментальных животных.

**What this paper adds**

The results of the effectiveness of local autotransplantation of multipotent mesenchymal stromal cells isolated from adipose tissue in the treatment of experimental trophic ulcer of venous etiology were studied. Local application of cell therapy allows a guaranteed positive result and shortens the healing time of the ulcer in experimental animals.

**Введение**

Современное общество существует в условиях урбанизации, преобладания малоподвижного образа жизни, что привело к массовому распространению у трудоспособного населения экономически развитых стран хронической венозной недостаточности (ХВН). ХВН диагностируется у 25-50% населения Европы с большой вероятностью возникновения наиболее тяжелого и наиболее распространенного осложнения – трофических язв нижних конечностей (ТЯНК), которые осложняют течение ХВН у 5-15% больных [1, 2, 3]. Распространенность трофических венозных язв в Украине в 5-6 раз выше, нежели аналогичные показатели в мире, что объясняется как низким социальным уровнем населения, так и низкой медицинской культурой пациентов, которые поздно обращаются за медицинской помощью [4].

Проведенные в Украине эпидемиологические исследования свидетельствуют о том, что при традиционной консервативной терапии длительностью до 4 месяцев заживление венозных трофических язв наступает у 50% пациентов, у 20% язвы заживают в интервале до 2 лет, что влечет за собой значительные финансовые затраты [1, 5].

В странах Европы при лечении в профильных стационарах больных с трофическими язвами венозной этиологии язвенные дефекты излечивают в течение 6 месяцев у 70% пациентов, в стационарах общего профиля – у 45-60% [6].

Необходимо принять во внимание не только распространенность, но и трудность лечения больных с ТЯНК, а также снижение качества жизни и стойкую потерю трудоспособности у 1-3% больных с учетом временной потери трудоспособности у 10-12% [7]. Несмотря на достижения современной медицины в комплексном лечении как хронической венозной недостаточности, так и трофических язв, про-

блема ее разрешения продолжает оставаться актуальной.

В последние годы внимание ученых все больше привлекают клеточные технологии, которые из приоритетных становятся распространенными. Среди них большее предпочтение отдается аутотрансплантации стромальных клеток из жировой ткани (стромально-васкулярная фракция жировой ткани – СВФЖТ), так как она обладает регенеративными, ангиогенными, противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами. Широко описываются результаты лечения трофических язв у пациентов с сахарным диабетом [8, 9]. Отдельные исследователи высказывают предположение о предпочтительном использовании мезенхимальных стромальных клеток для местного лечения трофических язв [10].

Все вышеуказанное, а также неуклонный рост больных с данной патологией побудили нас к изучению использования мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани для местного лечения трофических язв венозной этиологии.

**Цель.** Изучить эффективность применения стромальных клеток жировой ткани при восстановлении эпидермального слоя экспериментальной венозной трофической язвы.

**Материал и методы**

Экспериментальное исследование проводилось на 14 кроликах-самцах линии Шиншилла старше четырех месяцев и с массой тела более 3,0 кг, с неукоснительным следованием рекомендациями «Европейской конвенции о защите позвоночных, которых использовали для экспериментальных и других целей» (1986). Всем кроликам моделировалась трофическая язва (ТЯ) в соответствии с разработанной нами моделью формирования трофической язвы венозной этиологии у экспериментальных жи-

вотных [Лупальцов ВИ, Китченко СС, Ягнюк АИ, Дехтярук ИА, Скалий ММ, Котовщиков МС. Способ моделирования трофической язвы венозной этиологии в эксперименте. Патент UA 141285. 2020 Март 25]. Полученная ТЯ имела все характерные морфологические признаки хронического раневого процесса.

Было сформировано две группы — контрольная (КГ) и основная (ОГ) — по 7 животных в каждой. Животным КГ производили ежедневные перевязки с мазью на гидрофильной основе после обработки поверхности язвы раствором антисептика — диоксицином. У животных ОГ перевязки дополнялись введением перифокально и в дно язвы стромальных клеток из жировой ткани подвздошной области (по методике Р.А. Zuk et al.) [11], которую фрагментировали на мелкие составляющие, полученный материал трехкратно (по 5 минут) подавался воздействию фосфатного буфера, последний удалялся, а жировая ткань помещалась в 0,1% раствор коллагеназы, разогретой до 37,0°C, на 40 минут при постоянном взбалтывании.

Стромально-васкулярная фракция (СВФ) выделялась путем центрифугирования в течение 10 минут со скоростью 800 оборотов в минуту. Зрелые адипоциты и соединительная ткань отделялись от стромально-васкулярной фракции. Из полученной смеси эритроциты удалялись лизирующим буфером (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM EDTA). Оставшиеся стромальные клетки промывались в фосфатном буфере с последующим центрифугированием (800 об. / мин. в течение 10 минут). Забор клеточного материала осуществляли шприцем с толстой иглой. Препарат клеток разводился в 20–30 мл физиологического раствора (в зависимости от площади язвы) и вводился интрадермально перифокально и в дно язвы.

Аутоотрансплантация осуществлялась с соблюдением правил асептики после туалета язвы с последующим наложением асептической повязки.

Морфологический материал в обеих группах забирался для исследования единым блоком из края язвы, ее дна и с фрагментом неизмененных близлежащих тканей на этапе образования «чистой» язвы, а также с момента проведения клеточной терапии на 7, 14 и 21 сутки. После макроскопического описания кусочка ткани фиксировались в 10% растворе формалина, проводились через спирты растущей концентрации, жидкость Никифорова (96% спирт и диэтиловый эфир в соотношении 1:1), хлороформ и заливались в парафин. Для последующей окраски готовили серийные срезы толщиной 4–5×10<sup>-6</sup> м

из приготовленных таким образом блоков. Микропрепараты окрашивались гематоксилином и эозином (для оценки воспалительно-патологических изменений), пикрофуксином по ван Гизону (для выявления и дифференцировки соединительнотканых структур), методом Маллори (для характеристики особенностей коллагеновых и эластичных волокон). Препараты изучали на микроскопе Olympus BX-41 с использованием программы Olympus DP-soft version 3.1. Гистологические и гистохимические методики выполнялись по схемам, изложенным в инструкциях по гистологической и гистохимической технике [12].

С помощью компьютерной программы Olympus DP-soft version 3.1 на поверхность изображения накладывали сетку с решеткой, имеющую равноудаленные точки (в нашем исследовании использовалась сетка Г.Г. Автандилова из 100 точек), и производили дифференциальный подсчет точек, приходящихся отдельно на каждую структурную составляющую раневой ткани. Требуемого числа подсчетов точек для получения достоверных данных в 95% доверительном интервале достигали повторными наложениями решетки на разные поля зрения. В данной работе было сделано по три наложения в каждом изучаемом препарате. Нами определялись такие морфометрические показатели раневой ткани: относительный объем лейкоцитарно-некротической зоны, демаркационного вала, грануляционной ткани.

На парафиновых срезах толщиной 5–6×10<sup>-6</sup> м проводили иммуногистохимическое (ИГХ) исследование косвенным методом Кунса по методике М. Brozman [13] с использованием моноклональных антител (МКА) к клеткам, продуцирующим ИЛ-6 и ФНО $\alpha$ , коллагену I, III типов (Novocastra Laboratories Ltd.), с использованием люминисцентного микроскопа Axioskor 40 (Carl Zeiss, ФРГ) и программного обеспечения Biostat.exe. Оптическую плотность иммунофлюоресценции коллагенов определяли методом Г.И. Губиной-Вакулик с соавт. и выражали в условных единицах свечения (усл. ед. св.) [Патент на полезную модель № 46489 G01N33/00. Способ количественного определения содержания антигена в биологических тканях / Г.И. Губина-Вакулик с соавт., заявитель и патентообладатель «ХНМУ». — №и 200906730; заявл. 26.06.2009; опубл. 25.12.2009. Бюллетень №4.]. Количество иммунных клеток исследовали в поле зрения 400 и выражали в абсолютном количестве единиц.

### Статистика

Полученные в ходе исследований данные

анализировались на персональном компьютере с использованием табличного процессора Microsoft Excel офисного пакета приложения Microsoft Office 2016 (Microsoft, США) для Windows 10, для статистической обработки использовали пакет программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc, США). Анализ соответствия вида распределения количественных показателей закону нормального распределения проводили с применением критерия Шапиро-Уилка. Данные представляли в виде среднего выборочного ( $M$ ) и стандартного отклонения среднего ( $\sigma$ ), достоверность различий определяли с помощью  $t$ -критерия Стьюдента. Значимость различий между средними значениями показателей принималась при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### Результаты

Проведенные в эксперименте исследования показали, что у животных контрольной группы на 7-е сутки традиционного лечения с применением мази «Левомеколь» язвенный дефект поражал все слои эпидермиса и дермы, подкожно-жировую клетчатку и близлежащую мышечную ткань. Микроскопически в указанных тканях определялись некротические изменения и лейкоциты. В данной группе лейкоцитарно-некротический вал в среднем составлял  $51,09 \pm 5,8\%$ , а лейкоцитарно-демаркационный –  $19,18 \pm 1,4\%$ , тогда как в группе с применением клеточной терапии –  $49,21 \pm 2,0\%$  и  $18,03 \pm 1,6\%$  соответствен-

но. Грануляционная ткань была представлена большим количеством тонкостенных сосудов и клетками фибропластического ряда с примесью гранулоцитарных нейтрофилов, лимфоцитов и макрофагов, ее относительный объем составлял в основной группе  $32,55 \pm 2,4\%$ , а в группе сравнения –  $29,73 \pm 2,9\%$ .

При ИГХ-исследовании среди вышеуказанных клеток определялись клетки, которые экспрессировали IL-6 ( $39,03 \pm 1,1$  клеток в поле зрения,  $\times 400$ ) и ФНП $\alpha$  ( $36,11 \pm 0,74$  клеток в поле зрения,  $\times 400$ ) (таблица 1).

Коллагены I и III типа при ИГХ-исследовании имели неравномерную интенсивность слабого свечения. Оптическая плотность свечения коллагена III типа достоверно превышала оптическую плотность свечения коллагена I типа. Оптическая плотность иммунофлюоресценции коллагена III типа в основной группе была более интенсивной, тогда как тот же показатель коллагена I типа имел незначительную тенденцию к росту (таблица 2).

Особенно наглядно эти изменения отмечались на 14-е сутки, когда при микроскопическом исследовании структуры ТЯ выявлялось уменьшение зоны некроза к относительному объему, составлявшее в среднем  $40,47 \pm 3,1\%$ , демаркационная линия становилась значительно тоньше, составляя  $14,39 \pm 4,0\%$ , а грануляционная ткань была с относительным объемом  $45,14 \pm 3,6\%$ , имела большое количество вертикально направленных тонкостенных молодых кровеносных

Таблица 1  
Количество отдельных клонов иммунных клеток в составе воспалительного инфильтрата в зоне венозной трофической язвы у кроликов в поле зрения ( $M \pm \sigma$ )

	Сроки исследования							
	1-е сутки «чистой» язвы	7-е сутки		14-е сутки		21-е сутки		
		КГ	ОГ	КГ	ОГ	КГ	ОГ	
IL-6	$28,29 \pm 0,96$	$32,24 \pm 0,97$	$39,03 \pm 1,10^{\#}$	$40,61 \pm 0,92^*$	$46,68 \pm 0,96^{\#}$	$24,13 \pm 0,88^{**}$	$29,05 \pm 0,77^{\#}$	
ФНП	$23,41 \pm 0,79$	$30,14 \pm 0,86$	$36,11 \pm 0,74^{\#}$	$38,27 \pm 0,99^*$	$42,05 \pm 0,85^{\#}$	$20,24 \pm 0,93^{**}$	$26,38 \pm 0,92^{\#}$	

Примечания: \* –  $p_1 \leq 0,05$  – разница между показателями КГ (7-14-е сутки) статистически значимая; \*\* –  $p_2 \leq 0,05$  – разница между показателями КГ (14-21-е сутки) статистически значимая;  $\#$  –  $p_3 \leq 0,05$  – отличие между показателями КГ и ОГ соответствующих сроков статистически значимое.

Таблица 2  
Оптическая плотность иммунофлюоресценции интерстициальных коллагенов в зоне венозной трофической язвы у кроликов (ус.ед.св.) ( $M \pm \sigma$ )

	Сроки исследования							
	1-е сутки «чистой» язвы	7-е сутки		14-е сутки		21-е сутки		
		КГ	ОГ	КГ	ОГ	КГ	ОГ	
Коллаген I типа	$0,029 \pm 0,001$	$0,030 \pm 0,001$	$0,036 \pm 0,001$	$0,057 \pm 0,001$	$0,116 \pm 0,001^{\#}$	$0,089 \pm 0,001$	$0,218 \pm 0,001^{\#}$	
Коллаген III типа	$0,026 \pm 0,001$	$0,048 \pm 0,001$	$0,069 \pm 0,001^{\#}$	$0,112 \pm 0,001^*$	$0,144 \pm 0,001^{\#}$	$0,176 \pm 0,001^{**}$	$0,299 \pm 0,003^{\#}$	

Примечания: \* –  $p_1 \leq 0,05$  – разница между показателями КГ (7-14-е сутки) статистически значимая; \*\* –  $p_2 \leq 0,05$  – разница между показателями КГ (14-21-е сутки) статистически значимая;  $\#$  –  $p_3 \leq 0,05$  – отличие между показателями КГ и ОГ соответствующих сроков статистически значимое.

сосудов. В ней определялось большое количество клеток фибропластического ряда, макрофаги и лимфоциты с незначительным количеством нейтрофильных гранулоцитов.

По сравнению с 7-ми сутками эксперимента количество как IL-6-продуцентов, так и ФНПа достоверно возросло, составляя соответственно IL-6 –  $40,61 \pm 0,92$  клеток в поле зрения,  $\times 400$ , и ФНПа –  $38,27 \pm 0,99$  клеток в поле зрения,  $\times 400$ . Визуально отмечались признаки уменьшения отека, что свидетельствовало о начале перехода острого воспаления в хроническое.

При ИГХ-исследовании найдены оба типа интерстициальных коллагенов, преобладал коллаген III типа, с оптической плотностью, достоверно превышая таковую на 7-е сутки (таблица 2).

В прилежащем к язвенному дефекту эпидермальном покрове отмечалось его утолщение. В дерме с подлежащей гиподермой выявлялась слабая полиморфноклеточная инфильтрация, которая состояла из лимфоцитов, макрофагов, небольшого количества гранулоцитов. В сосудах сосочкового слоя дермы определялись признаки нарушения кровообращения в виде полнокровья. В глубже расположенных тканях дермы и гиподермы местами сохранялись признаки периваскулярной инфильтрации, представленной лимфоцитами, макрофагами и нейтрофильными гранулоцитами (рис. 1).

В ОГ при микроскопическом исследовании выявлено уменьшение площади некроза до относительного объема  $32,08 \pm 2,4\%$ , демаркационная линия стала тоньше (относительный объем –  $10,42 \pm 1,1\%$ ), также увеличился относительный объем грануляционной ткани (до  $57,70 \pm 5,5\%$ ) с большим количеством клеток фибропластического ряда и тонкостенных кровеносных сосудов с вертикальной направленностью. Клеточный компонент представлен, кроме фибробластов и фиброцитов, значительным количеством лимфоцитов, единичными гигантскими многоядерными клетками инородных тел без образования гранул и малым количеством нейтрофилов, преимущественно расположенных поверхностно (рис. 2).

При ИГХ-исследовании клетки, экспрессирующие IL-6, составляли  $46,68 \pm 0,96$  клеток в поле зрения,  $\times 400$ , и экспрессирующие ФНПа –  $42,05 \pm 0,85$  клеток в поле зрения,  $\times 400$  (таблица 1).

При определении оптической плотности коллагена III типа установлено его яркое свечение, оптическая плотность достоверно превышала соответствующий показатель КГ, тогда как свечение коллагена I типа было умеренным, хотя оптическая плотность иммунофлюоресценции достоверно повышена (рис. 3).

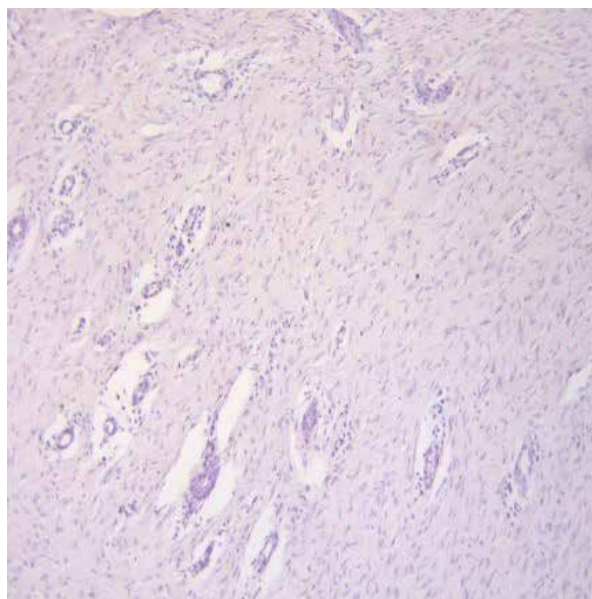


Рис. 1. Явления васкулита в дерме. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 100$ .

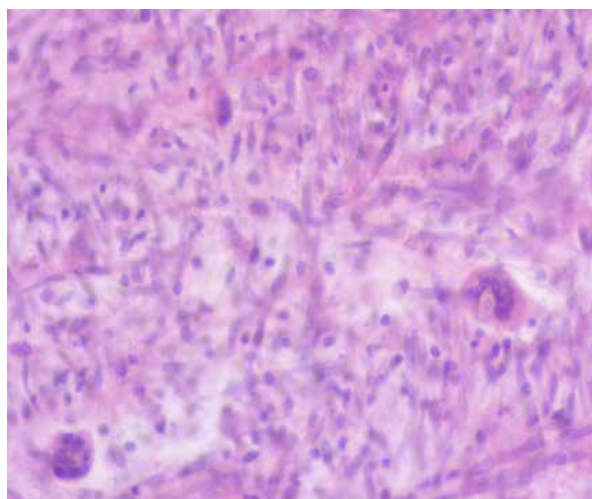


Рис. 2. Микроскопические изменения в дне язвы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 400$ .

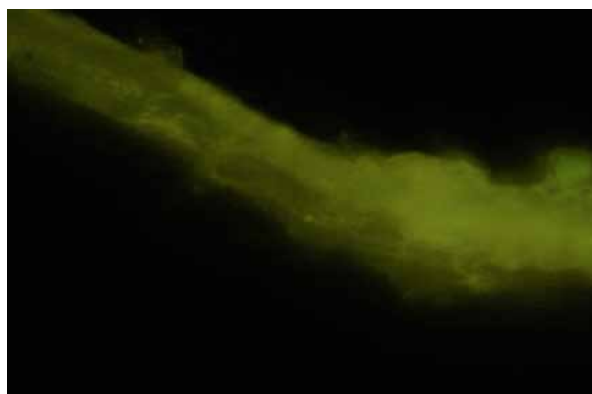


Рис. 3. Неравномерная иммунофлюоресценция коллагена I типа в соединительнотканном компоненте на 14-е сутки эксперимента. Наблюдение основной группы (по Кунсу с МКА к коллагену I типа. Ув.  $\times 600$ ).

По периферии язвенного дефекта эпидермис был несколько утолщен, имел нечеткую слоевую структуру, наблюдались одиночные роговые клетки в поверхностных участках с явлениями эпителизации по краям ТЯ.

На 21-е сутки в КГ выявлены минимальные остатки некроза и едва заметная демаркация. В поверхностных участках язвенного дефекта отмечалось наличие грануляционной ткани с умеренным количеством сосудов с тонкими стенками, многочисленными клетками фибробластического ряда, с небольшой примесью лимфоцитов, макрофагов, с минимальными явлениями отека в грануляционной ткани.

Отмечалось уменьшение клеток, которые экспрессируют рецепторы к IL-6 и ФНПа (таблица 1), в сравнении с 14-ми сутками. ИГХ-исследование выявило умеренное и яркое свечение всех интерстициальных коллагенов с количественным преобладанием коллагена III типа над зрелым коллагеном I типа (таблица 2). Эпидермис частично напознал на грануляционную ткань, преимущественно неплотно срастаясь с ней.

При микроскопическом исследовании тканей язвы ОГ определялась резорбция некротического центра, присутствие грануляционной ткани в поверхностных участках, в которых определялись многочисленные микрососуды и клетки фибробластического ряда, макрофаги, лимфоциты и, в сравнении с предыдущими сроками, большее количество гигантских многоядерных клеток. Признаков отека в грануляционной ткани не определялось.

Количество клеток, экспрессирующих IL-6 и ФНПа, значительно снизилось в сравнении с 14-ми сутками эксперимента (таблица 1).

При ИГХ-исследовании наблюдается яркое свечение коллагенов обоих типов с большим количеством молодого интерстициального коллагена III типа. По сравнению с соответствующими сроками КГ оптическая плотность обоих коллагенов достоверно превышала ее показатели, что являлось свидетельством активного созревания соединительной ткани и склерозирования дна язвы. Эпидермис язвы частично покрывал грануляционную ткань, местами плотно срастаясь с ней, визуально отмечалась полная эпителизация сформированной в эксперименте ТЯ (рис. 4).

### Обсуждение

Анализ доступных в современной научной литературе источников по применению клеточной терапии в виде аутотрансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных

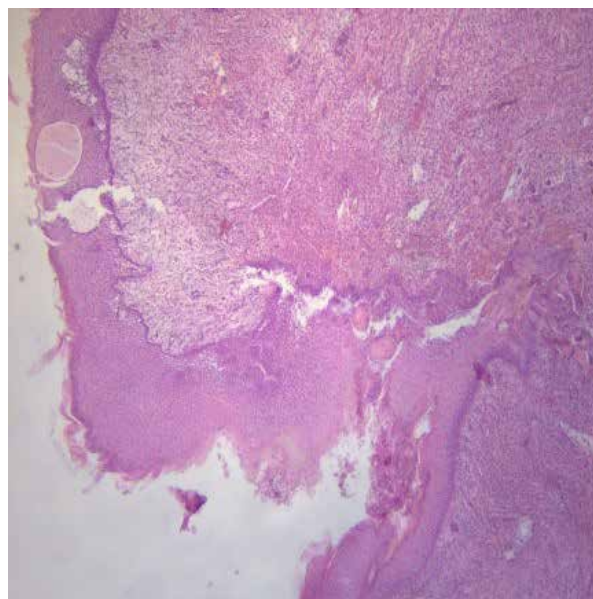


Рис. 4. Кожа периульцерозного участка. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 400$ .

клеток из жировой ткани в лечении венозных трофических язв нижних конечностей показал, что данное направление является перспективным, в том числе и у пациентов с сахарным диабетом [9; 14], однако представлено скудное количество клинических исследований в этой области [15]. Результаты проведенной нами работы показывают, что описываемое лечение приводит к ускорению репаративных процессов в ране по сравнению с группой, где оно не применялось. Так, быстрее происходит резорбция некротических масс, формирование и созревание грануляционной ткани, появление краевой эпителизации. Присутствие макрофагов и других иммунных клеток среди воспалительного инфильтрата является благоприятным признаком, поскольку они важны в процессе заживления соединительной ткани, как было показано ранее другими исследователями [16]. Положительным моментом также является высокий уровень цитокинпродуцирующих клеток в ОГ, в частности IL-6 и ФНО $\alpha$ , которые, как известно, принимают участие в процессах фиброобразования, стимулируют процессы коллагенообразования [17, 18]. Это суждение подтверждается достоверным повышением коллагена I типа в соединительнотканном компоненте при ИГХ-исследовании, что может быть связано с созреванием коллагена III типа в I [19], которые являются основными составляющими интерстициального матрикса [20]. Описанные явления свидетельствуют о более быстром созревании грануляционной ткани в зрелую соединительную. Обращает на себя внимание наличие многоядерных гигантских клеток инородных тел, что может быть расцене-

но как иммунная реакция организма на ММСК и является характерным для воспалительного процесса с применением биоимплантов [21]. Таким образом, при сравнении морфологических изменений в тканях трофической венозной язвы в группах с применением СВФЖТ и без таковой в первой уверенно отмечается наличие более активных регенераторных процессов.

### Выводы

1. Результаты проведенных экспериментальных исследований изучения влияния аутотрансплантации стромально-васкулярной фракции жировой ткани на течение раневого процесса экспериментальной трофической язвы венозного генеза свидетельствуют об активации репаративных процессов, ускоряющих сроки созревания грануляционной ткани и скорость эпителизации и сокращающих сроки заживления раневого дефекта.

2. Морфологическая оценка сроков заживления трофической язвы венозного генеза свидетельствует об ускорении эпителизации раневого дефекта при локальной трансплантации стромально-васкулярной фракции жировой ткани по сравнению со сроками эпителизации раневого дефекта традиционными методами.

3. Полученные результаты проведенных экспериментальных исследований использования стволовых клеток из жировой ткани для восстановления целостности кожных покровов при хронических язвах венозной этиологии позволяют рекомендовать их использование в клинических условиях.

### Финансирование

Работа выполнялась в соответствии с планом научных исследований Харьковского национального медицинского университета.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

### Этические аспекты.

#### Одобрение комитета по этике

Исследование одобрено этическим комитетом Харьковского национального медицинского университета.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Бабинкіна ІБ, Новікова ГА, Бабинкіна ГП. Хірургічне лікування хронічної венозної недостатності нижніх кінцівок. *Харківська Хірургічна Школа*. 2020;(3):68-73. <https://doi.org/10.37699/2308-7005.3.2020.14>

2. Селиверстов ЕИ, Авакьянц ИП, Никишков АС, Золотухин ИА. Эпидемиология хронических заболеваний вен. *Флебология*. 2016;10(1):35-43. <https://doi.org/10.17116/flebo201610135-42>

3. Santler B, Goerge T. Chronic venous insufficiency - a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2017 May;15(5):538-56. doi: 10.1111/ddg.13242

4. Нікульніков ПІ, Ліксунов ОВ, Ратушнюк АВ, Бічер АГ. Можливості лікування трофічних виразок у хворих із декомпенсованими формами хронічної венозної недостатності нижніх кінцівок із використанням спрею КадефортТМ. *Здоров'я України. Хірургія. Ортопедія. Травматологія. Інтенсивна Терapia*. 2019;(1):19. <https://health-ua.com/article/42852-mozhliivost-lkuvannya-trofichnih-virazok--uhvorih-zdekompensovanimi-formami-->

5. Черняк ВА, Корниенко КК. Характеристика механизма действия и место вазоактивных препаратов в лечении хронических заболеваний вен нижних конечностей по данным рекомендаций 2018 года. *Хірургія України*. 2019;(1):7-22. <http://surgukraine.com.ua/article/view/SU2019-1-7>

6. Gottrup F, Apelqvist J, Bjarnsholt T, Cooper R, Moore Z, Peters EJ, Probst S. Antimicrobials and Non-Healing Wounds. Evidence, controversies and suggestions-key messages. *J Wound Care*. 2014 Oct;23(10):477-8, 480, 482. doi: 10.12968/jowc.2014.23.10.477

7. Дубровщик ОИ, Довнар ИС, Колешко СВ, Ясюк ЛС, Ясюк АА. Трофические язвы венозного генеза: современные возможности лечения. *Журн Гродн Гос Мед Ун-та*. 2016;(2):107-111. <http://journalgrsmu.by/index.php/ojs/article/view/1947>

8. Duzhiy ID, Nikolaienko AS, Popadynets VM, Kravets OV, Hresko IY, Holubnichyi SO, Sikora VV, Lyndin MS, Romaniuk AM. Reparative processes features in trophic ulcers caused by diabetes mellitus with the use of platelet-rich plasma. *Wiad Lek*. 2020;73(10):2150-55. doi: 10.36740/WLek202010108

9. Lonardi R, Leone N, Gennai S, Trevisi Borsari G, Covic T, Silingardi R. Autologous micro-fragmented adipose tissue for the treatment of diabetic foot minor amputations: a randomized controlled single-center clinical trial (MiFrAADiF). *Stem Cell Res Ther*. 2019 Jul 29;10(1):223. doi: 10.1186/s13287-019-1328-4

10. Burgos-Alonso N, Lobato I, Hernández I, Sebastian KS, Rodríguez B, Grandes G, Andia I. Adjuvant Biological Therapies in Chronic Leg Ulcers. *Int J Mol Sci*. 2017 Nov 28;18(12):2561. doi: 10.3390/ijms18122561

11. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001 Apr;7(2):211-28. doi: 10.1089/107632701300062859

12. Пирс Э. Гистохимия (теоретическая и прикладная). Москва: Иностранная литература; 1962. 962 с.

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

14. Magenta A, Florio MC, Ruggeri M, Furgiuele S. Autologous cell therapy in diabetes associated critical limb ischemia: From basic studies to clinical outcomes

- (Review). *Int J Mol Med.* 2021 Sep;48(3):173. doi: 10.3892/ijmm.2021.5006
15. Lopes L, Setia O, Aurshina A, Liu S, Hu H, Isaji T, Liu H, Wang T, Ono S, Guo X, Yatsula B, Guo J, Gu Y, Navarro T, Dardik A. Stem cell therapy for diabetic foot ulcers: a review of preclinical and clinical research. *Stem Cell Res Ther.* 2018 Jul 11;9(1):188. doi: 10.1186/s13287-018-0938-6
  16. Chisari E, Rehak L, Khan WS, Maffulli N. The role of the immune system in tendon healing: a systematic review. *Br Med Bull.* 2020 May 15;133(1):49-64. doi: 10.1093/bmb/ldz040
  17. Zhang Y, Wang JH, Zhang YY, Wang YZ, Wang J, Zhao Y, Jin XX, Xue GL, Li PH, Sun YL, Huang QH, Song XT, Zhang ZR, Gao X, Yang BF, Du ZM, Pan ZW. Deletion of interleukin-6 alleviated interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy of mice through affecting TGF1 and miR-29 pathways. *Sci Rep.* 2016 Mar 14;6:23010. doi: 10.1038/srep23010
  18. Theiss AL, Simmons JG, Jobin C, Lund PK. Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *J Biol Chem.* 2005 Oct 28;280(43):36099-109. doi: 10.1074/jbc.M505291200
  19. Kirsner R.S. Wound healing. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, eds. *Dermatology.* 2nd ed. St Louis (MO): Elsevier Health Sciences; 2008;2. p. 2147-58.
  20. Nielsen MJ, Karsdal MA. Chapter 3 - Type III Collagen. In: Karsdal MA, ed. *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin.* Academic Press; 2016. p. 21-30. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809847-9.00003-9>
  21. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008 Apr;20(2):86-100. doi: 10.1016/j.smim.2007.11.004
  2. Gottrup F, Apelqvist J, Bjarnsholt T, Cooper R, Moore Z, Peters EJ, Probst S. Antimicrobials and Non-Healing Wounds. Evidence, controversies and suggestions-key messages. *J Wound Care.* 2014 Oct;23(10):477-8, 480, 482. doi: 10.12968/jowc.2014.23.10.477
  7. Dubrovshchik OI, Dovnar IS, Koleshko SV, Yasiuk LS, Yasiuk A A. Trophic ulcers of venous genesis: modern treatment possibilities. *Zhurn Grodn Gos Med Un-ta.* 2016;(2):107-111. <http://journalgrsmu.by/index.php/ojs/article/view/1947> (In Russ.)
  8. Duzhiy ID, Nikolaienko AS, Popadynets VM, Kravets OV, Hresko IY, Holubnichyi SO, Sikora VV, Lyndin MS, Romaniuk AM. Reparative processes features in trophic ulcers caused by diabetes mellitus with the use of platelet-rich plasma. *Wiad Lek.* 2020;73(10):2150-55. doi: 10.36740/WLek202010108
  9. Lonardi R, Leone N, Gennai S, Trevisi Borsari G, Covic T, Silingardi R. Autologous micro-fragmented adipose tissue for the treatment of diabetic foot minor amputations: a randomized controlled single-center clinical trial (MiFrAADiF). *Stem Cell Res Ther.* 2019 Jul 29;10(1):223. doi: 10.1186/s13287-019-1328-4
  10. Burgos-Alonso N, Lobato I, Hernández I, Sebastian KS, Rodríguez B, Grandes G, Andia I. Adjuvant Biological Therapies in Chronic Leg Ulcers. *Int J Mol Sci.* 2017 Nov 28;18(12):2561. doi: 10.3390/ijms18122561
  11. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001 Apr;7(2):211-28. doi: 10.1089/107632701300062859
  12. Pirs Je. Gistohimija (teoreticheskaja i prikladnaja). Moscow: Inostrannaja literatura; 1962. 962 p. (In Russ.)
  13. Brozman M. Immunofluorescence investigation of formol-paraffin material. *Cesk Patol.* 1979 Nov;15(4):215-20. [Article in Slovak]
  14. Magenta A, Florio MC, Ruggeri M, Furgiuele S. Autologous cell therapy in diabetes associated critical limb ischemia: From basic studies to clinical outcomes (Review). *Int J Mol Med.* 2021 Sep;48(3):173. doi: 10.3892/ijmm.2021.5006
  15. Lopes L, Setia O, Aurshina A, Liu S, Hu H, Isaji T, Liu H, Wang T, Ono S, Guo X, Yatsula B, Guo J, Gu Y, Navarro T, Dardik A. Stem cell therapy for diabetic foot ulcers: a review of preclinical and clinical research. *Stem Cell Res Ther.* 2018 Jul 11;9(1):188. doi: 10.1186/s13287-018-0938-6
  16. Chisari E, Rehak L, Khan WS, Maffulli N. The role of the immune system in tendon healing: a systematic review. *Br Med Bull.* 2020 May 15;133(1):49-64. doi: 10.1093/bmb/ldz040
  17. Zhang Y, Wang JH, Zhang YY, Wang YZ, Wang J, Zhao Y, Jin XX, Xue GL, Li PH, Sun YL, Huang QH, Song XT, Zhang ZR, Gao X, Yang BF, Du ZM, Pan ZW. Deletion of interleukin-6 alleviated interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy of mice through affecting TGF1 and miR-29 pathways. *Sci Rep.* 2016 Mar 14;6:23010. doi: 10.1038/srep23010
  18. Theiss AL, Simmons JG, Jobin C, Lund PK. Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *J Biol Chem.* 2005 Oct 28;280(43):36099-109. doi: 10.1074/jbc.M505291200

## REFERENCES

1. Babinkina IB, Novikova GA, Babinkina GP. Khirurgichne likuvannia khronichnoi venoznoi nedostatnosti nizhnikh kintsivok. *Kharkivs'ka Khirurgichna Shkola.* 2020;(3):68-73. <https://doi.org/10.37699/2308-7005.3.2020.14> (In Ukr.)
2. Seliverstov EI, Avak'yants IP, Nikishkov AS, Zolotukhin IA. Epidemiology of chronic venous disease *Flebologija.* 2016;10(1):35-43 <https://doi.org/10.17116/flebo201610135-42> (In Russ.)
3. Santler B, Goerge T. Chronic venous insufficiency - a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2017 May;15(5):538-56. doi: 10.1111/ddg.13242
4. Nikul'nikov PI, Likunov OV, Ratushniuk AV, Bicher AG. Mozhlivosti likuvannia trofichnikh virazok u khvorikh iz dekompensovanimi formami khronichnoi venoznoi nedostatnosti nizhnikh kintsivok iz vikoristanniam spreiu KadefortTM. *Zdorov'ia Ukraini. Khirurgiia. Ortopediia. Travmatologija. Intensivna Terapiia.* 2019;(1):19. <https://health-ua.com/article/42852-mozhlivost-likuvannya-trofichnih-virazok-uhvorih-zdekompensovanimi-formami--> (In Ukr.)
5. Cherniak VA, Kornienko KK. Kharakteristika mekhanizma deistviia i mesto vazoaktivnykh preparatov v lechenii khronicheskikh zabozevanii ven nizhnikh konechnosti po dannykh rekomendatsii 2018 goda. *Khirurgiia Ukraini.* 2019;(1):7-22. <http://surgukraine.com.ua/ar-ticle/view/SU2019-1-7> (In Ukr.)



19. Kirsner R.S. Wound healing. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, eds. *Dermatology*. 2nd ed. St Louis (MO): Elsevier Health Sciences; 2008;2. p. 2147-58.

20. Nielsen MJ, Karsdal MA. Chapter 3 - Type III Collagen. In: Karsdal MA, ed. *Biochemistry of*

*Collagens, Laminins and Elastin*. Academic Press: 2016. p. 21-30. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809847-9.00003-9>

21. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol*. 2008 Apr;20(2):86-100. doi: 10.1016/j.smim.2007.11.004

#### Адрес для корреспонденции

61022, Украина, г. Харьков,  
Харьковский национальный медицинский  
университет, проспект Науки, 4,  
тел.: +38 057 725-57-74,  
e-mail: [surgdis@ukr.net](mailto:surgdis@ukr.net),  
Лупальцов Владимир Иванович

#### Сведения об авторах

Лупальцов Владимир Иванович, д.м.н., профессор, член-корреспондент НАМН Украины, заведующий кафедрой хирургии № 3, Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков, Украина.

<http://orcid.org/0000-0003-2121-529X>

Китченко Сергей Сергеевич, ассистент кафедры хирургии № 3, Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков, Украина.

<http://orcid.org/0000-0001-6330-6187>

Сорокина Ирина Викторовна, д.м.н., профессор, и.о. заведующего кафедрой патологической анатомии, Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков, Украина.

<http://orcid.org/0000-0002-5945-2605>

Калужина Оксана Владимировна, к.мед.н., доцент кафедры патологической анатомии, Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков, Украина.

<https://orcid.org/0000-0002-4181-9704>

#### Информация о статье

Поступила 17 декабря 2020 г.

Принята в печать 31 января 2022 г.

Доступна на сайте 28 апреля 2022 г.

#### Address for correspondence

61022, Ukraine,  
Kharkiv, Nauka Avenue, 4,  
Kharkiv National Medical University  
tel.: +38 057 725-57-74,  
e-mail: [surgdis@ukr.net](mailto:surgdis@ukr.net)  
Lupaltsov Vladimir I.

#### Information about the authors

Lupaltsov Vladimir I., MD, Professor, Corresponding Member of NAMS of Ukraine, Head of the Surgery Department No3, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine.

<http://orcid.org/0000-0003-2121-529X>

Kitchenko Sergey S., Assistant of the Surgery Department No3, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine.

<http://orcid.org/0000-0001-6330-6187>

Sorokina Irina V., MD, Professor, Acting Head of the Pathologic Anatomy Department, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine.

<http://orcid.org/0000-0002-5945-2605>

Kaluzhyna Oksana V., PhD, Associate Professor of the Pathologic Anatomy Department, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine.

<https://orcid.org/0000-0002-4181-9704>

#### Article history

Arrived: 17 December 2020

Accepted for publication: 31 January 2022

Available online: 28 April 2022