

УДК 618.3:616-092.9

<https://doi.org/10.52420/2071-5943-2024-23-1-24-36>

<https://elibrary.ru/HTTLIN>



Сравнение эффективности способов получения и введения стромально-васкулярной фракции жировой ткани на экспериментальной модели донорской раны у обожженных

Никита Анатольевич Колошеин ✉, Максим Георгиевич Рябков,
Марфа Николаевна Егорихина, Лидия Борисовна Тимофеева,
Пётр Владимирович Перетягин, Игорь Юрьевич Арефьев

Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

✉ n.koloshein@mail.ru

Аннотация

Введение. Оптимальный способ получения и введения стромально-васкулярной фракции (СВФ) жировой ткани для лечения донорских ран у обожженных не определен.

Цель работы — сравнить эффективность стромально-васкулярной фракции жировой ткани в лечении донорских ран в зависимости от способа обработки (механического и ферментативного) и пути введения (подкожного, внутрикожного) в ткани.

Материал и методы. Крысы «Вистар» ($n = 30$) разделены на 2 исследуемые группы: в первой (ФСВФ) применена ферментная обработка жировой ткани ($n = 10$), во второй (МСВФ) — механическая ($n = 10$). Еще 10 крыс использовались как группа доноров жировой ткани. Всем животным моделировали глубокий ожог, а через 4 дня формировали еще 2 донорские раны, забирая расщепленный дермотрансплантат: в одну из ран препарат вводили внутрикожно, в другую — подкожно. Через 14 суток оценивали площадь эпителизации, показатель микроциркуляции и микроструктуру кожи.

Результаты. Доля полностью эпителизированных донорских ран в группе ФСВФ составила 85 %, в группе МСВФ — 55 % ($p < 0,05$). Показатель микроциркуляции достоверно сокращался при внутрикожном введении в группе ФСВФ ($p < 0,01$), а при подкожном — в группе МСВФ ($p < 0,05$). По данным гистоморфометрии при внутрикожном введении ФСВФ толщина эпидермиса и слоя грануляционной ткани меньше, чем в группе МСВФ ($p < 0,01$). При этом относительная плотность коллагеновых волокон в грануляционной ткани была значимо выше после введения ФСВФ, чем после МСВФ ($p < 0,01$). Сравнение путей введения препарата показало: существенных различий при использовании ФСВФ не выявлено; при использовании МСВФ предпочтителен подкожный путь введения, т.к. он сопровождался значимо меньшей толщиной грануляционной ткани ($p < 0,01$).

Заключение. Ферментативно обработанная стромально-васкулярная фракция жировой ткани имеет преимущества перед механически обработанной: эффективность ФСВФ одинаково высока при внутрикожном и подкожном введении, что подтверждается структурой и кровообращением в новообразованной коже. При использовании МСВФ внутрикожное введение наименее эффективно, а подкожное сопровождается умеренно выраженной положительной динамикой в микроструктуре кожи донорских ран.

Ключевые слова: мало манипуляционные технологии, стромально-васкулярная фракция, донорские раны, ожоги

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения РФ «Разработка технологий восстановления раневых дефектов кожного покрова с применением оригинального биомедицинского клеточного продукта и мало манипуляционных клеточных технологий» № 62.7–2021 (государственная регистрация РК 208.090.01; ЕГИСУ № 121022500010-6; дата регистрации 26.02.2021).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов.

Соответствие принципам этики. Экспериментальное исследование одобрено локальным этическим комитетом Приволжского исследовательского медицинского университета (протокол № 47 от 6 августа 2022 г.).

Для цитирования: Сравнение эффективности способов получения и введения стромально-васкулярной фракции жировой ткани на экспериментальной модели донорской раны у обожженных / Н. А. Колошеин, М. Г. Рябков, М. Н. Егорихина [и др.] // Уральский медицинский журнал. 2024. Т. 23, № 1. С. 24–36. DOI: <https://doi.org/10.52420/2071-5943-2024-23-1-24-36>. EDN: <https://elibrary.ru/HTTLIN>.

Comparison of the Effectiveness of Methods for Obtaining and Application the Stromal-Vascular Fraction of Adipose Tissue in an Experimental Model of a Donor Wound in Burns

Nikita A. Koloshein ✉, Maksim G. Ryabkov, Marfa N. Egorikhina, Lidiya B. Timofeeva, Petr V. Peretyagin, Igor Yu. Arefev

Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

✉ n.koloshein@mail.ru

Abstract

Introduction. The optimal method of obtaining and application a stromal-vascular fraction (SVF) of adipose tissue in the treatment of donor wounds in burned patients has not been determined.

Objective — to compare the effectiveness of the stromal-vascular fraction of adipose tissue in the treatment of donor wounds, depending on the method of obtaining (mechanical and enzymatic) and the injection (subdermal, intradermal) into the tissue.

Material and methods. Wistar rats ($n = 30$) were divided into 2 investigated groups: in the first group (eSVF) enzymatic processing of adipose tissue ($n = 10$) was used, in the second group (mSVF) mechanical processing was used ($n = 10$). Another 10 rats were used as adipose tissue donors' group. A deep burn was created in all animals, and after 4 days two more donor wounds were created by taking a split thickness skin autograft: the stromal-vascular fraction was injected intradermally into one of the wounds, subdermally into the other. After 14 days, the area of epithelialization, the microcirculation index and the histological microstructure of the skin were evaluated.

Results. The proportion of completely epithelized donor wounds in the eSVF-group was 85 %, in the mSVF-group — 55 % ($p < 0.05$). The index of microcirculation significantly decreased after intradermal injections in the eSVF-group ($p < 0.01$), and after subdermal injections — in the mSVF-group ($p < 0.05$). According to histomorphometry, with intradermal injections of eSVF, the thickness of the epidermis and the layer of granulation tissue is less than in the mSVF group ($p < 0.01$). At the same time, the relative density of collagen fibers in the granulation tissue was significantly higher after the injections of eSVF than after mSVF ($p < 0.01$). Comparison of injections of the stromal-vascular fraction showed: no significant differences were found when using eSVF; when using mSVF, the subdermal injections are preferable, since it was accompanied by a significantly lower thickness of granulation tissue ($p < 0.01$).

Conclusions. The enzymatically obtained stromal-vascular fraction of adipose tissue has advantages over the mechanically obtained one: the efficiency of eSVF is equally high when used with intradermally and subdermally injections, which are confirmed by the structure and blood circulation in the newly formed skin. When using mSVF, intradermal injections are the least effective, and subdermal injections are accompanied by a moderately pronounced positive dynamic in the microstructure of the skin of donor wounds.

Keywords: stromal-vascular fraction, donor sites wound, burns

Funding. The study was funded by the Ministry of Health of the Russian Federation “Development of Technologies for the Healing of Skin Wounds with Using an Original Biomedical Cell Product and Minimal Manipulative Cell Technologies” No. 62.7–2021 (state registration number RK 208.090.01; EGISU registration number: 121022500010–6; date of registration February 26, 2021).

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflict of interest.

Conformity with the principles of ethics. The experimental study was approved by the local ethics committee of Privolzhsky Research Medical University (protocol No. 47 of August 6, 2023).

For citation: Koloshein NA, Ryabkov MG, Egorikhina MN, Timofeeva LB, Peretyagin PV, Arefev IYu. Comparison of the effectiveness of methods for obtaining and application the stromal-vascular fraction of adipose tissue in an experimental model of a donor wound in burns. *Ural Medical Journal*. 2024;23(1):24–36. DOI: <https://doi.org/10.52420/2071-5943-2024-23-1-24-36>. EDN: <https://elibrary.ru/HTTLIN>.

© Колошеин Н. А., Рябков М. Г., Егорихина М. Н., Тимофеева Л. Б., Перетягин П. В., Арефьев И. Ю., 2024

© Koloshein N. A., Ryabkov M. G., Egorikhina M. N., Timofeeva L. B., Peretyagin P. V., Arefev I. Yu., 2024

Введение

Особое значение в комбустиологии имеет лечение пострадавших с обширными ожогами, которые в 30–65 % случаев приводят к летальному исходу [1]. Наиболее серьезная нерешенная про-

блема, актуальность которой возрастает при общей площади поражения свыше 60 % поверхности тела, — дефицит пластических ресурсов аутологичной кожи [1, 2]. Решением может стать качественное ускорение заживления донорских ран — источников пластического материала. Перспективным способом стимуляции процесса регенерации ран может стать трансплантация минимально манипулированных клеточных продуктов аутологичной жировой ткани, содержащих мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК) [3–5]. Один из таких продуктов — стромально-васкулярная фракция (СВФ). Доклинические и немногочисленные клинические исследования ее эффективности в лечении ран различного генеза обнадеживают.

В настоящее время известно два способа обработки жировой ткани для получения СВФ: ферментативный (фСВФ) и механический (мСВФ). Ферментативное расщепление при помощи коллагеназы остается «золотым стандартом», поскольку обеспечивает получение большего количества ММСК из единицы объема жировой ткани [6–8]. Механическая обработка требует существенно меньших материальных и временных затрат, однако технологии получения СВФ таким способом трудно стандартизировать [9–11].

Наиболее распространенные способы доставки СВФ при лечении ран — внутрикожные (подкожные) инъекции, реже — нанесение на поверхность раны [12–15]. Однако увеличение площади раны требует пропорционального увеличения количества и объема инъекций. При подкожном введении растет риск местных осложнений (инфильтрат, абсцесс); при внутрикожном — трудоемкость процедуры. Оптимальный путь введения остается предметом дискуссий.

Таким образом, несмотря на перспективы применения СВФ в практике лечения ран у ожоговых больных, остаются нерешенными существенные прикладные вопросы об оптимальном способе обработки жировой ткани и наиболее эффективном пути введения СВФ в ткани.

Цель работы — сравнить эффективность стромально-васкулярной фракции жировой ткани в лечении донорских ран в зависимости от способа обработки (механического и ферментативного) и пути введения (подкожного, внутрикожного) в ткани.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование выполнено согласно принципам, закрепленным Директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей, а также Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Содержание животных происходило в виварии центральной научно-исследовательской лаборатории Приволжского исследовательского медицинского университета (ЦНИЛ ПИМУ) в соответствии с ГОСТ 33216–2014 от 1 июля 2016 г. «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» и ГОСТ 33215–2014 от 1 июля 2016 г. «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур».

Дизайн исследования

В эксперимент введены 30 взрослых белых крыс-самцов Wistar массой от 220 до 315 г. На 2 исследуемые группы были разделены 20 из них: первая — группа ферментативной стромально-васкулярной фракции фСВФ ($n = 10$), вторая — группа механической стромально-васкулярной фракции мСВФ ($n = 10$). Оставшиеся 10 крыс были использованы в качестве группы доноров жировой ткани для приготовления СВФ (рис. 1). Животные до начала исследования находились на карантине в течение 30 суток.

Анестезия

При выполнении этапов эксперимента крыс вводили в наркоз с использованием внутримышечного введения смеси из 3,5 %-го тилетамина гидрохлорида, 2 %-го ксилазина гидрохлорида (в объеме, пропорциональном массе тела). Глубину наркоза верифицировали по исчезновению реакции на болевые раздражители (укол лапы).

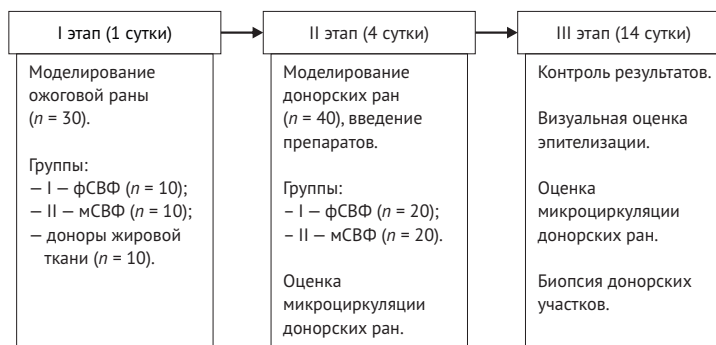


Рис. 1. Дизайн исследования

Моделирование ожога

В первый день эксперимента всем животным ($n = 30$) после бритья шерсти на правом боку под общей анестезией был нанесен глубокий контактный ожог III степени на площади 20 % поверхности тела. Специальный утюжок размерами 7×4×1 см, разогретый до температуры в 150 °С прислоняли к боку животного в течение 10 с. Дальнейшее лечение ожогов осуществлялась открытым способом без местной и системной терапии.

Приготовление фСВФ

Процесс приготовления фСВФ происходил в два этапа. На первом этапе на 4 сутки обе паховые области животных из группы доноров ($n = 5$) были подстрижены и обработаны спиртосодержащим антисептиком «Чистей плюс» (ООО «ВИТА-ПУЛ», Россия). Получено 10 образцов жировой ткани паховой области (по 2 у каждой крысы, всего 10) объемом 3 см³. Полученная ткань в суммарном объеме 30 см³ была измельчена и направлена в лабораторию биотехнологий Университетской клиники ПИМУ. В условиях ламинарного бокса гомогенат жировой ткани промывали стерильным 0,9%-м раствором натрия хлорида (ООО «Гематек», Россия) или раствором Хэнкса (ООО «ПанЭко», Россия) с помощью центрифугирования в течение 10 мин. при 503 g. После чего в пробирку с отмытым липоаспирамом добавляли равный объем 0,2 % коллагеназы I типа, растворенной в фосфатном буфере (ООО «ПанЭко», Россия) и инкубировали в течение часа в орбитальном шейкере при температуре +37 °С. По окончании процесса ферментации липоаспирата к полученной суспензии добавляли стерильный 0,9%-й раствор натрия хлорида и ресуспендировали. Затем центрифугировали 10 мин. при 503 g. Жировое кольцо с адипоцитами и неперевавшими остатками жировой ткани и супернатант удаляли, а осадок с клетками СВФ и остатками эритроцитов еще раз центрифугировали в стерильном 0,9%-м растворе натрия хлорида для удаления остатков фермента. После центрифугирования осадок тщательно ресуспендировали в стерильном 0,9%-м растворе натрия хлорида, пропускали через клеточный фильтр с диаметром пор 100 мкм. Для определения жизнеспособности использовали прижизненный краситель трипановый синий.

Приготовление мСВФ

Процедура получения жировой ткани из паховых областей для приготовления мСВФ производилась аналогичным образом. Полученная у животных группы доноров ($n = 5$) жировая ткань измельчалась с помощью ножниц и скальпеля в гомогенную смесь. Далее полученный гомогенат в равных соотношениях разбавляли стерильным 0,9%-м раствором натрия хлорида (ООО «Гематек», Россия) и производили механическую эмульсификацию между двумя шприцами, соединенными коннектором «Луэр лок» (англ. Luer lock) Nano Transfer PB-600.75 (ООО «ПАКТ-МедСервис», Россия) минимум 30 пассажами. Эмульсифицированный жир центрифугировали при 1 200 g в течение 5 мин., в результате чего образовавшийся верхний слой убирали, нижний слой использовали в качестве мСВФ [16].

Моделирование донорской раны, применение СВФ

На 4 сутки эксперимента всем животным из групп фСВФ и мСВФ ($n = 20$) после бритья левого бока под общей анестезией осуществляли взятие расщепленного аутодермотрансплантата толщиной 0,5 мм

с помощью дерматом ДЭ-25 (ОАО «Ассоциация аэрокосмических инженеров», Россия) (рис. 2, а) и формировали округлые донорские раны диаметром 2 см (по 2 у каждой крысы, всего 40) (рис. 2, б). Расщепленные аутодермотрансплантаты утилизировали. В группе фСВФ в одну из ран (№ 1) внутрикожно вводили 1,0 мл фСВФ. В другую рану (№ 2) осуществляли инъекции 1,0 мл фСВФ подкожно под раневое ложе (рис. 2, в, г). Аналогичным образом осуществляли введение мСВФ в донорские раны группы мСВФ. Ведение ран осуществляли закрытым способом под стерильными повязками Cosmopor E (Hartmann, Германия) и самофиксирующимися бинтами Pega-haft (Hartmann, Германия).

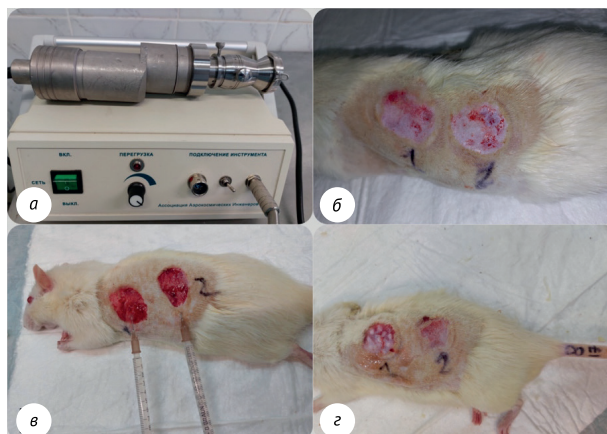


Рис. 2. Применение фСВФ:

а — дерматом электрический; б — вид донорских ран;
в — введение фСВФ (В); г — вид ран после инъекций фСВФ

Оценка полученных результатов

В качестве контрольной точки были выбраны 14 сутки, поскольку срок эпителизации ран после взятия расщепленного аутодермотрансплантата (донорские раны) у крыс составляет в среднем 10–14 суток [17].

Визуальная оценка процессов эпителизации

На 14 сутки эксперимента во время контрольной перевязки под общей анестезией результат заживления ран был зафиксирован при помощи фотокамеры. Фокусная дистанция — 15 см. Критерий оценки заживления — качественный признак: наличие или отсутствие полной эпителизации раны.

Оценка параметров микроциркуляции

На 4 (до введения препаратов) и 14 сутки эксперимента производили оценку параметров микроциркуляции при помощи многофункционального лазерного диагностического комплекса «ЛАКК-М» (исполнение 2) (ООО НПП «ЛАЗМА», Россия). Исследования проводили при температуре 20–25 °С. Зонд анализатора устанавливали перпендикулярно донорской ране исследуемой области. Запись продолжали в течение 3 мин. Оценка параметров микроциркуляции донорской раны проводили по одному из основных показателей микроциркуляции — М (среднее арифметическое значение показателя микроциркуляции, измеряемое в перфузионных единицах (ПЕ)) [18].

Гистологическое исследование

На 14 сутки эксперимента выполняли биопсию в пределах эпителизированных донорских участков на всю глубину до фасции и мышц с помощью DERMO-PUNCH DMP-35 (STERYLAB, Италия). Биоптаты регенерирующих тканей подвергали стандартной гистологической обработке с последующей окраской гематоксилин-эозином и анилиновым синим по Массону. Препараты изучали при помощи микроскопа Nikon Eclipse 80i. Фоторегистрацию осуществляли камерой Nikon Ds-Fi1, морфометрию проводили с использованием программного обеспечения NIS-Elements BR 3.2.

Определение толщины грануляционной ткани проводили путем усреднения значений толщи-

ны новообразованной соединительной ткани, измеренных в 3 равноудаленных точках при увеличении объектива $\times 10$. Для характеристики регенерирующего эпидермиса проводили оценку средней толщины клеточного слоя (без рогового слоя) в 3 равноудаленных точках при увеличении объектива $\times 20$. Относительная площадь коллагеновых волокон в ткани регенерата определялась в 3 полях зрения при увеличении объектива $\times 40$.

Статистический анализ

Статистический анализ исследования выполнен с помощью пакетной программы Statistical Package for the Social Sciences for Windows (2000) (SPSS) 15.0 с доверительным интервалом 95 %. Тест Шапиро — Уилка использовали для проверки нормальности распределения переменных. Ввиду ненормальности распределения основными параметрами были медиана (Me) и квартили [Q1; Q3]. Поскольку представленные выборки были малых размеров, то для анализа взаимосвязи исхода 2 номинальных значений применяли точный критерий Фишера, для анализа 2 независимых выборок — U -критерий Манна — Уитни, а для анализа 2 зависимых выборок — W -критерий Уилкоксона. Значение $p < 0,05$ было признано статистически значимым для принятия альтернативной гипотезы.

Результаты

Визуальная оценка процессов эпителизации ран

При контрольной перевязке на 14 сутки в ходе визуальной оценки в обеих группах животных выявлены донорские участки, которые были эпителизированы частично (рис. 3, а, б). Доля полностью эпителизированных донорских участков в группе фСВФ составила 85 % (17 из 20), а в мСВФ — 55 % (11 из 20) (односторонний точный критерий Фишера, $p = 0,0412$). Визуальной разницы между ними в обеих группах животных при различных способах введения (внутрикожно и подкожно) не отмечалось (рис. 3, в, г).

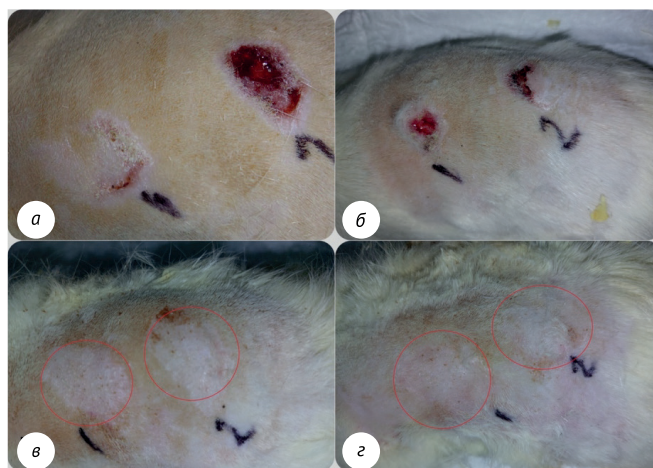


Рис. 3. Визуальная оценка процессов эпителизации ран:

а — частичная эпителизация ран в группе фСВФ; б — частичная эпителизация ран в группе мСВФ);
в — вид эпителизированных ран в группе фСВФ; г — вид эпителизированных ран в группе мСВФ

Параметры микроциркуляции

При статистическом анализе данных показателя микроциркуляции разницы между его исходными (4 сутки) и конечными (14 сутки) значениями в обеих группах при различных способах введения не получено. Однако при оценке степени снижения этого показателя выявлена статистически значимая разница при внутрикожном введении фСВФ ($p = 0,0076$) и подкожном введении мСВФ ($p = 0,0125$) Сводные данные представлены в табл. 1.

Таблица 1

Показатели капиллярного кровотока в области ран

Исследуемый параметр	Me [Q ₁ ; Q ₃]					
	Внутрикожное введение, n = 20			Подкожное введение, n = 20		
	фСВФ	мСВФ	U-критерий	фСВФ	мСВФ	U-критерий
М исходное на 4 сутки, ПЕ	9,92 [9,18; 10,57]	9,88 [6,06; 14,79]	0,9674	10,02 [9,3; 10,18]	10,85 [8,85; 13,01]	0,2364
М конечное на 14 сутки, ПЕ	5,92 [4,99; 6,64]	7,01 [5,16; 8,86]	0,3477	7,03 [6,09; 7,65]	6,29 [5,21; 8,39]	0,6533
Критерий Уилкоксона	0,0076	0,1851	—	0,0858	0,0125	—

Гистологическое исследование

При гистоморфометрии регенератов установлено, что восстановление поврежденной кожи в группе мСВФ протекало неравномерно в сравнении с фСВФ. При внутригрупповом сравнении установлено, что толщина эпидермиса в области донорских ран группы мСВФ при внутрикожном и подкожном способах введения существенно не различается ($p = 0,868$), но превышает толщину эпидермиса крысы в норме [19]. Под эпидермисом расположен слой созревающей соединительной ткани (грануляционной), толщина которого при подкожном способе введения статистически значимо меньше ($Me = 197,13 \text{ мкм}$ [109,84; 307,93] и $408,2 \text{ мкм}$ [269,85; 540,33], $p = 0,006$) (рис. 4).

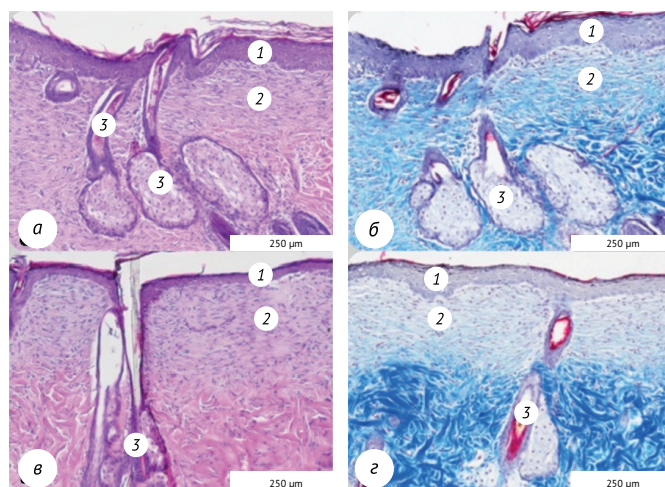


Рис. 4. Область раны при внутрикожном (а, б) и подкожном (в, г) способах введения мСВФ. Окраска гематоксилин-эозином (а, в) и по Массону (б, г):

1 — эпителий; 2 — созревающая соединительная ткань; 3 — дериваты кожи

Значение относительной плотности коллагеновых волокон значимо выше при внутрикожном введении ($Me = 49,5\%$ [38,4; 60,6] и $37,5\%$ [21,4; 40,6], $p = 0,002$). Сводные данные показателей морфометрии и внутригруппового сравнения представлены в табл. 2.

В группе фСВФ процесс восстановления поврежденной кожи протекал более равномерно, чем в мСВФ. Достоверных различий между способами введения при внутригрупповом сравнении не выявлено (табл. 2). Однако при межгрупповом сравнении установлены следующие статистически значимые различия. При внутрикожном введении фСВФ толщина эпидермиса в области регенерата ($Me = 51,04$ [38,35; 67,75]) мкм меньше (рис. 5), чем в группе мСВФ ($Me = 78,39$ [62,1; 105,07] мкм, $p = 0,00315$) (рис. 4). Толщина слоя грануляционной ткани под эпидермисом в группе фСВФ значительно меньше ($Me = 130,91 \text{ мкм}$ [103,42; 200,77] и $408,2 \text{ мкм}$ [269,85; 540,33], $p = 0,000020$).

Относительная плотность коллагеновых волокон в грануляционной ткани в группе фСВФ существенно выше ($Me = 60,8\%$ [56,5; 67,9]), чем в мСВФ ($Me = 49,50\%$ [38,4; 60,6], $p = 0,007739$). Сводные данные показателей морфометрии и межгруппового сравнения представлены в табл. 3.

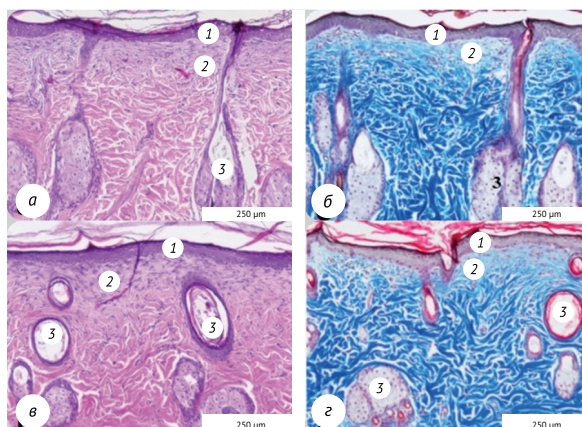


Рис. 5. Область раны группы животных при внутрикожном (а, б) и подкожном (в, г) способах введения фСВФ. Окраска гематоксилин-эозином (а, в) и по Массону (б, г):

1 — эпителий; 2 — созревающая соединительная ткань; 3 — дериваты кожи

Таблица 2

Морфометрические показатели репаративных процессов в области ран при внутригрупповом сравнении

Исследуемый параметр	Me [Q ₁ ; Q ₃]					
	фСВФ			мСВФ		
	Внутрикожное введение	Подкожное введение	U-критерий	Внутрикожное введение	Подкожное введение	U-критерий
Толщина эпидермиса, мкм	51,04 [38,35; 67,75]	49,16 [38,01; 58,37]	0,801383	78,39 [62,1; 105,07]	88,77 [33,12; 105,7]	0,868168
Толщина слоя грануляционной ткани, мкм	130,91 [103,42; 200,77]	168,22 [115,93; 240,9]	0,435493	408,2 [269,85; 540,33]	197,13 [109,84; 307,93]	0,006190
Относительная площадь коллагеновых волокон, %	60,8 [56,5; 67,9]	60,4 [52,3; 67,5]	0,743649	49,50 [38,4; 60,6]	37,5 [21,4; 40,6]	0,002145

Таблица 3

Морфометрические показатели репаративных процессов в области ран при межгрупповом сравнении

Исследуемый параметр	Me [Q ₁ ; Q ₃]					
	Внутрикожное введение, n = 20			Подкожное введение, n = 20		
	фСВФ	мСВФ	U-критерий	фСВФ	мСВФ	U-критерий
Толщина эпидермиса, мкм	51,04 [38,35; 67,75]	78,39 [62,1; 105,07]	0,00315	49,16 [38,01; 58,37]	88,77 [33,12; 105,7]	0,058273
Толщина слоя грануляционной ткани, мкм	130,91 [103,42; 00,77]	408,2 [269,85; 540,33]	0,000020	168,22 [115,93; 240,9]	197,13 [109,84; 307,93]	0,700202
Относительная площадь коллагеновых волокон, %	60,8 [56,5; 67,9]	49,50 [38,4; 60,6]	0,007739	60,4 [52,3; 67,5]	37,5 [21,4; 40,6]	0,000000

Осложнения

При проведении эксперимента возникло одно местное осложнение в виде абсцесса мягких тканей в зоне внутрикожного введения мСВФ. При этом рана была эпителизирована.

Обсуждение

В современной практике используются различные способы влияния на процессы репаративной регенерации в донорских ранах [20–22]. Однако исследований эффективности применения

СВФ в лечении донорских ран до сих пор нет. Результаты введения СВФ очевидно зависят от состава препарата и способа его введения в ткани. Известно, что чаще всего используются 2 способа доставки продуктов жировой ткани содержащих ММСК в область раны: локальные инъекции или нанесение на поверхность (аппликации) (табл. 4).

Таблица 4

Способы доставки СВФ в экспериментальных моделях

Авторы	Лабораторное животное	Способы введения
Ж. М. Блайли и др. (англ. J. M. Bliley et al.) [23]	Мыши	Внутрикожное введение аллогенных стволовых клеток из жировой ткани (СКЖТ) в область ожогов
Я. Кайта и др. (англ. Y. Kaita et al.) [24]	Крысы	Аппликации СКЖТ в составе искусственной дермы на глубокие ожоги
И. Ким и др. (англ. I. Kim et al.) [25]	Мыши	Внутрикожное введение аутологичных и аллогенных СКЖТ
Д. Чичарро и др. (англ. D. Chicharro et al.) [26]	Кролики	Внутрикожные инъекции СКЖТ в полнослойные раны
Н. Энцисо и др. (англ. N. Enciso et al.) [27]	Собака	Внутрикожное введение аутологичных СКЖТ вокруг раны
Х.-К. Као и др. (англ. H.-K. Kao et al.) [28]	Крысы	Аппликация аутологичной жировой ткани на полнослойную рану
М. Х. Махарлуи и др. (англ. M. K. Maharlooee et al.) [29]	Крысы	Внутрикожное введение СКЖТ в полнослойную рану
Я. Жу и др. (англ. Y. Zhou et al.) [30]	Мыши	Внутрикожное введение аллогенных СКЖТ вокруг раны
Ш.-П. Хуан и др. (англ. S.-P. Huang et al.) [31]	Мыши	Аппликация СКЖТ в составе ацеллюлярного дермального матрикса на полнослойную рану
М. Джаханян и др. (англ. M. Jahanian et al.) [32]	Крысы	Аппликация СКЖТ в составе ацеллюлярного дермального матрикса на полнослойную рану

В нашем исследовании использовались внутрикожные инъекции в раневое ложе на глубину до 2 мм (мезотерапия) и подкожные инъекции вокруг и под дно раны. Глубина внутрикожных инъекций выбрана минимальная, чтобы приблизить ММСК к зоне регенеративных процессов. Кроме того, по данным М. Маммучари и др. (англ. M. Mammucari et al.), в этом случае происходит формирование микродепозитов в дерме, что замедляет абсорбцию и пролонгирует воздействие на зону клинического интереса [33]. От аппликаций СВФ на этой модели было решено отказаться. Опыт нанесения механически обработанной СВФ на раневую поверхность ран в целях стимуляции процесса регенерации ран свидетельствует о целесообразности этого метода только в отношении ограниченных по площади ран с неоднородным рельефом дна [34]. Ферментативно обработанная СВФ оптимальна для лечения обширных ран, однако для фиксации стволовых клеток на поверхности донорской раны необходимо применение дополнительных агентов, таких как фибриновый клей или матрицы-носители, которые сами могут оказывать непосредственное влияние на процесс регенерации [24, 28, 31, 32].

Сроки заживления донорских ран (место забора расщепленного аутодермотрансплантата) могут составлять от 7 до 21 дня, в большинстве неосложненных случаев эпителизация наступает на 12–14 сутки [35]. В нашем исследовании на 14 сутки эпителизация всей поверхности донорских ран была достигнута не у всех животных. В то же время после введения ферментативно обработанной фракции полная эпителизация ран наблюдалась чаще по сравнению с введением механически обработанной фракции. Так, в группе с использованием фСВФ доля ран с эпителизацией всей поверхности составила 85 %, а в группе мСВФ — 55 %. Вероятно, эффект обусловлен возможностью прецизионного введения клеточного препарата в зону дермо-эпидермального перехода.

Состояние микроциркуляции в ране является одним из важных показателей для оценки течения раневого процесса. Ранее Ю. В. Юрова и др. отметили, что показатель микроциркуляции в гранулирующей ране больше, чем в здоровой коже [18, 36]. Это, вероятно, обусловлено барьерной функцией эпидермиса и отсутствием в нем капилляров. Кроме того, репаративная регенерация любой раны про-

исходит путем формирования грануляционной ткани с развитой капиллярной сетью. Таким образом, в процессе регенерации ран показатель микроциркуляции стремится к значениям здоровой кожи. Это соотносится с данными нашего исследования, где показатель М эпителизированных донорских ран обеих групп животных на 14 сутки был ниже, чем исходный на 4 сутки (табл. 1).

Гистологические данные нашего исследования свидетельствуют о том, что в группе фСВФ процесс восстановления поврежденной кожи протекал более равномерно. Поверхность ран была полностью покрыта полнослойным эпидермисом, при этом его толщина в области регенерата уменьшалась, по сравнению с соответствующими ранами группы мСВФ, приближаясь к показателям нормы, производные эпидермиса были восстановлены. Пучки коллагеновых волокон разнонаправлены, что свидетельствовало о процессах ремоделирования волокнистой соединительной ткани. В то же время в группе мСВФ пучки коллагеновых волокон при внутрикожном введении были ориентированы вдоль поверхности кожи, что соответствовало фазе пролиферации, а при подкожном введении были расположены хаотично, что являлось проявлением начала фазы ремоделирования соединительной ткани. Толщина слоя созревающей соединительной ткани, расположенной под эпидермисом при использовании фСВФ меньше, чем в группе мСВФ. Все это свидетельствовало об ускорении течения процессов репаративной регенерации в ранах. Х. Би и др. (англ. H. Bi et al.) в своем экспериментальном исследовании изучали влияние СВФ на процессы репаративной регенерации полнослойных ран у мышей с моделью сахарного диабета. Они отметили значительное уменьшение площади ран на 6, 7 и 9 сутки в группе животных с СВФ. При гистологическом исследовании околораневых тканей на 9 сутки было отмечено увеличение толщины эпидермиса, содержания коллагеновых волокон в коже и их упорядоченность в группе, где применялась СВФ. В целом эти данные также согласуются с результатами нашего исследования, за исключением изменения толщины эпидермиса [37]. Возможно, это обусловлено тем, что в нашем исследовании для проведения гистоморфометрии образцы были взяты непосредственно из области заживших ран на 14 сутки, а не из околораневых тканей на 9 сутки.

Заключение

Применение СВФ при лечении донорских ран в 90 % случаев не сопровождается местными осложнениями. Ферментативно обработанная стромально-васкулярная фракция жировой ткани имеет преимущества перед механически обработанной: эффективность фСВФ одинаково высока при внутрикожном и подкожном введении, что подтверждается структурой и кровообращением в новообразованной коже. При использовании мСВФ внутрикожное введение наименее эффективно, а подкожное сопровождается умеренно выраженной положительной динамикой в микроструктуре кожи донорских ран. Таким образом, применение СВФ может быть многообещающим, дополнительным методом лечения донорских ран у пострадавших с обширными ожогами

Список источников | References

1. Gao X, Zhang M, Lin Y, Li D, Zhang L. Combined Complex skin repair in patient with extensive burns: A case report. *Journal of Burn Care & Research*. 2021;42(5):1053–1056. DOI: <https://doi.org/10.1093/jbcr/irab037>.
2. Alekseev AA, Bobrovnikov AE, Bogdanov V.V. Meaning of innovative technologies for improvement of results in treating burned patients. *Medical Alphabet*. 2020;(13):44–47. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-13-44-47>.
3. Luck J, Smith OJ, Malik D, Mosahebi A. Protocol for a systematic review of autologous fat grafting for wound healing. *Systematic Reviews*. 2018;7(1):99. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13643-018-0769-7>.
4. Malik D, Luck J, Smith OJ, Mosahebi A. A systematic review of autologous fat grafting in the treatment of acute and chronic cutaneous wounds. *Plastic and Reconstructive Surgery — Global Open*. 2020;8(5):e2835. DOI: <https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000002835>.
5. Vasil'ev VS, Vasil'ev SA, Karpov IA, Dimov GP, Teryushkova ZhI, Gromov IA, et al. The possibilities for the application of the stromal-vascular fraction of the adipose tissue in plastic surgery. *Annaly plasticheskoy, rekonstruktivnoy i esteticheskoy hirurgii*. 2017;(2):82–92. (In Russ.). EDN: <https://elibrary.ru/xmfkzn>.
6. De Francesco F, Mannucci S, Conti G, Dai Prè E, Sbarbati A, Riccio M. A Non-enzymatic method to obtain a fat tissue derivative highly enriched in Adipose Stem Cells (ASCs) from human lipoaspi-

- rates: Preliminary results. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(7):2061. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19072061>.
7. Andia I, Maffulli N, Burgos-Alonso N. Stromal vascular fraction technologies and clinical applications. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2019;19(12):1289–1305. DOI: <https://doi.org/10.1080/14712598.2019.1671970>.
 8. SundarRaj S, Deshmukh A, Priya N. Development of a system and method for automated isolation of stromal vascular fraction from adipose tissue lipoaspirate. *Stem Cells International*. 2015;2015:109353. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/109353>.
 9. Copcu HE, Oztan S. New mechanical fat separation technique: Adjustable Regenerative Adipose-tissue Transfer (ARAT) and Mechanical Stromal Cell Transfer (MEST). *Aesthetic Surgery Journal Open Forum*. 2020;2(4):ojaa035. DOI: <https://doi.org/10.1093/asjof/ojaa035>.
 10. Copcu HE. Indication-based protocols with different solutions for mechanical stromal-cell transfer. *Scars, Burns & Healing*. 2022;8:20595131211047830. DOI: <https://doi.org/10.1177/20595131211047830>.
 11. Jeyaraman M, Muthu S, Sharma S, Ganta C, Ranjan R, Jha SK. Nanofat: A therapeutic paradigm in regenerative medicine. *World Journal of Stem Cells*. 2021;13(11):1733–1746. DOI: <https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i11.1733>.
 12. Gatiatulina ER, Manturova NE, Dimov GP, Vasiliyev VS, Teryushkova ZhI. Adipose-derived stromal vascular fraction: mechanism of action, prospects and risks of local application. *Plastic Surgery and Aesthetic Medicine*. 2019;(2):43–48. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17116/plast.hirurgia201902143>.
 13. Nilforoushzadeh MA, Sisakht MM, Amirkhani MA, Seifalian AM, Banafshe HR, Verdi J, et al. Engineered skin graft with stromal vascular fraction cells encapsulated in fibrin-collagen hydrogel: A clinical study for diabetic wound healing. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2020;14(3):424–440. DOI: <https://doi.org/10.1002/term.3003>.
 14. Samoilov AS, Astrelina TA, Aksenenko AV. Application of cell technologies in thermal burn damage to skin (Practical experience in State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency of Russia). *Saratov Journal of Medical Scientific Research*. 2019;15(4):999–1004. (In Russ.). EDN: <https://elibrary.ru/uairnp>.
 15. Koloshein NA. Application of autological adipose tissue and its products in the treatment of infected wounds of different genesis. *Journal of Experimental and Clinical Surgery*. 2022;15(3):268–277. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.18499/2070-478X-2022-15-3-268-277>.
 16. Kim BS, Chen SH, Vasella M, Guidi M, Gousopoulos E, Lindenblatt N, et al. In vivo evaluation of mechanically processed stromal vascular fraction in a chamber vascularized by an arteriovenous Shunt. *Pharmaceutics*. 2022;14(2):417. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020417>.
 17. Uraloğlu M, Livaoglu M, Agdoğan Ö, Mungan S, Alhan E, Karaçal N. An evaluation of five different dressing materials on split-thickness skin graft donor site and full-thickness cutaneous wounds: An experimental study. *International Wound Journal*. 2014;11(1):85–92. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2012.01071.x>.
 18. Yurova YuV, Zinoviev EV, Krylov KM, Soloshenko VV. Perspectives of use laser doppler flowmetry for accurate determination of degree of a burn at prehospital stage. *Emergency Medical Care*. 2019;20(4):33–36. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.24884/2072-6716-2019-20-4-33-36>.
 19. Gushchin YaA, Kovaleva MA. Comparative morphology of human and laboratory animals (short paper). *Laboratory Animals for Science*. 2019;(2). DOI: <https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-02-06>.
 20. Burusapat C, Supawan M, Pruksapong C, Pitiseree A, Suwantemee C. Topical aloe vera gel for accelerated wound healing of split-thickness skin graft donor sites: A double-blind, randomized, controlled trial and systematic review. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2018;142(1):217–226. DOI: <https://doi.org/10.1097/PRS.00000000000004515>.
 21. Vaheb M, Kohestani BM, Karrabi M, Khosrojerdi M, Khajeh M, Shahrestanaki E, et al. Evaluation of dried amniotic membrane on wound healing at split-thickness skin graft donor sites: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Advances in Skin & Wound Care*. 2020;33(12):636–641. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000695752.52235.e3>.
 22. Momeni M, Fallah N, Bajouri A, Bagheri T, Orouji Z, Pahlevanpour P, et al. A randomized, double-blind, phase I clinical trial of fetal cell-based skin substitutes on healing of donor sites in burn patients. *Burns*. 2019;45(4):914–922. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2018.10.016>.
 23. Bliley JM, Argenta A, Satish L, McLaughlin MM, Dees A, Tompkins-Rhoades C, et al. Administration of adipose-derived stem cells enhances vascularity, induces collagen deposition, and dermal adipogenesis in burn wounds. *Burns*. 2016;42(6):1212–1222. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2015.12.007>.
 24. Kaita Y, Tarui T, Yoshino H, Matsuda T, Yamaguchi Y, Nakagawa T, et al. Sufficient therapeutic effect of cryopreserved frozen adipose-derived regenerative cells on burn wounds. *Regenerative Therapy*. 2019;10:92–103. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.01.001>.
 25. Kim I, Bang SI, Lee SK, Park SY, Kim M, Ha H. Clinical implication of allogenic implantation of adipogenic differentiated adipose-derived stem cells. *Stem Cells Translational Medicine*. 2014;3(11):1312–1321. DOI: <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0109>.

26. Chicharro D, Carrillo JM, Rubio M, Cugat R, Cuervo B, Guil S, et al. Combined plasma rich in growth factors and adipose-derived mesenchymal stem cells promotes the cutaneous wound healing in rabbits. *BMC Veterinary Research*. 2018;14(1):288. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1577-y>.
27. Enciso N, Avedillo L, Fermin ML, Fragió C, Tejero C. Regenerative potential of allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal cells in canine cutaneous wounds. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2020;62(1):13. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13028-020-0511-z>.
28. Kao HK, Hsu HH, Chuang WY, Chang KP, Chen B, Guo L. Experimental study of fat grafting under negative pressure for wounds with exposed bone. *British Journal of Surgery*. 2015;102(8):998–1005. DOI: <https://doi.org/10.1002/bjs.9826>.
29. Maharlooei MK, Bagheri M, Solhjoui Z, Jahromi BM, Akrami M, Rohani L, et al. Adipose tissue derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) promotes skin wound healing in diabetic rats. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2011;93(2):228–234. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2011.04.018>.
30. Zhou Y, Zhao B, Zhang XL, Lu YJ, Lu ST, Cheng J, et al. Combined topical and systemic administration with human adipose-derived mesenchymal stem cells (hADSC) and hADSC-derived exosomes markedly promoted cutaneous wound healing and regeneration. *Stem Cell Research & Therapy*. 2021;12(1):257. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02287-9>.
31. Huang SP, Hsu CC, Chang SC, Wang CH, Deng SC, Dai NT, et al. Adipose-derived stem cells seeded on acellular dermal matrix grafts enhance wound healing in a murine model of a full-thickness defect. *Annals of Plastic Surgery*. 2012;69(6):656–662. DOI: <https://doi.org/10.1097/SAP.0b013e318273f909>.
32. Jahanian M, Hoseini S, Atashi A, Saberi M, Hoseini SA, Mozaffari K, et al. Evaluation of Acellular Dermal Matrix (ADM) as a scaffold for adipose-derived stem cell transfer in the rat model. *World Journal of Plastic Surgery*. 2021;10(2):67–75. DOI: <https://doi.org/10.52547/wjps.10.2.67>.
33. Mammucari M, Paolucci T, Russo D. A call to action by the Italian mesotherapy society on scientific research. *Drug Design, Development and Therapy*. 2021;15:3041–3047. DOI: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S321215>.
34. Ryabkov MG, Spiridonov AA, Beschastnov VV, Tixonova OA, Leontev AE. Treatment of chronic wounds by combination of autodermatoplasty and lipotransfer. *Clinical and Experimental Surgery*. 2018;4(22):17–23. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.24411/2308-1198-2018-14002>.
35. Mordiyakov AE, Charyshkin AL. Evaluation of local treatment of donor sites wounds in patients with deep burns. *Pirogov Russian Journal of Surgery = Khirurgiya. Zhurnal im. N. I. Pirogova*. 2018;(11):49–52. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17116/hirurgia201811149>.
36. Yurova YuV, Shlyk IV. Influence of microbial wound dissemination and microcirculation on the results of skin engraftment. *Grekov's Bulletin of Surgery*. 2013;172(1):060–064. (In Russ.). EDN: <https://elibrary.ru/prycvf>.
37. Bi H, Li H, Zhang C, Mao Y, Nie F, Xing Y, et al. Stromal vascular fraction promotes migration of fibroblasts and angiogenesis through regulation of extracellular matrix in the skin wound healing process. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019;10(1):302. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1415-6>.

Информация об авторах

Никита Анатольевич Колошеин ✉ — младший научный сотрудник Университетской клиники, Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия.

E-mail: n.koloshein@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4563-5478>

Максим Георгиевич Рябков — доктор медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник группы термической травмы (взрослых) Университетской клиники, Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия.

E-mail: maxim-ryabkov@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9555-190X>

Марфа Николаевна Егорихина — кандидат биологических наук, заведующий научной лабораторией клеточных технологий, Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия.

E-mail: egorihina.marfa@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8815-9651>

Лидия Борисовна Тимофеева — кандидат биологических наук, доцент кафедры гистологии с цитологией и эмбриологией, Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия.

E-mail: bioli@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8191-7739>

Пётр Владимирович Перетягин — младший научный сотрудник экспериментально-биологической клиники центральной научно-исследовательской лаборатории, Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия.

E-mail: peretyaginpv@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0707-892X>

Игорь Юрьевич Арефьев — кандидат медицинских наук; директор Университетской клиники, Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия.

E-mail: arefev_i@pimunn.net

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1959-2766>

Information about the authors

Nikita A. Koloshein ✉ — Junior Researcher of the University Clinic of Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia.

E-mail: n.koloshein@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4563-5478>

Maksim G. Ryabkov — Doctor of Sciences (Medicine), Associate Professor, Leading Researcher of the Group of Burn Trauma (Adult), University Clinic of Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia.

E-mail: maxim-ryabkov@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9555-190X>

Marfa N. Egorikhina — Candidate of Sciences (Biology), Head of the Laboratory of Cell Technologies. Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia.

E-mail: egorikhina.marfa@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8815-9651>

Lidiya B. Timofeeva — Candidate of Sciences (Biology), Associate Professor of the Department of Histology with Cytology and Embryology, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia.

E-mail: bioli@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8191-7739>

Petr V. Peretyagin — Junior Researcher of the Experimental Biological Clinic of the Central Research Laboratory, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia.

E-mail: peretyaginpv@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0707-892X>

Igor Yu. Arefev — Candidate of Sciences (Medicine); Director of the University Clinic, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia.

E-mail: arefev_i@pimunn.net

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1959-2766>

Рукопись получена: 25.09.2023. Одобрена после рецензирования: 23.10.2023. Принята к публикации: 22.12.2023.

Received: 25.09.2023. Revised: 23.10.2023. Accepted: 22.12.2023.