

зультате снижения пролиферативной активности мезенхимных клеток, уменьшения интенсивности хондро- и остеогенеза. Гипоплазия тела нижней челюсти часто сочетается с недоразвитием ее ветвей и деформацией отростков.

Наиболее активно на тератогенное воздействие в популяции клеток хряща мышечного отростка реагируют клетки полиморфного и уплощенного слоев. Анализ информационных характеристик позволил установить сходство в реакции клеток на экспериментальное воздействие, проявляющееся в возрастании информационной и относительной энтропий и снижении избыточности, а значит, и стабильности системы. Репаративная регенерация, проявляющаяся в усилении процессов хондро- и остеогенеза, не обеспечивает полного восстановления структуры кости как органа. Отростки нижней челюсти остаются недоразвитыми, что впоследствии приводит к задержке формирования височно-нижнечелюстного сустава и нарушению сбалансированного развития всей зубочелюстной системы, одним из следствий такого нарушения является формирование расщелины твердого неба.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Машковский, Д. М.* Лекарственные средства / М. Д. Машковский. — 15 изд. — М.: Новая волна, 2005. — С. 969.
2. *Куценко, С. А.* Основы токсикологии: науч.-метод. издание / С. А. Куценко. — СПб.: Фолиант, 2004. — 720 с.
3. *Кабак, С. Л.* Врожденные аномалии скелета и суставов конечностей белой крысы, индуцированные циклофосфаном / С. Л. Кабак, Л. Н. Бойцов, Е. П. Аниськова // Докл. АН БССР. — 1985. — Т. 29, № 6. — С. 565–567.
4. *Окушко, В. Р.* Особенности развития нижней челюсти крысы при спонтанном и экспериментальном пародонтозе // В кн.: Морфология органов и тканей лица, полости рта в норме и патологии. — Труды Смоленского медицинского института. — 1975. — Т. 46. — С. 18–21.
5. *Алексеев, В. П.* Краниометрия. Методика антропологических исследований / В. П. Алексеев, Г. Ф. Дебец. — М.: Наука, 1964. — 128 с.
6. *Сперанский, В. С.* Основы медицинской краниологии / В. С. Сперанский. — М.: Медицина, 1988. — С. 268.
7. *Леонтьев, А. С.* Структурное разнообразие как критерий системной характеристики процессов морфогенеза / А. С. Леонтьев // Морфология. — 1996. — Т. 109, № 2. — С. 67.
8. *Белюсов, Л. В.* Биологический морфогенез / Л. В. Белюсов. — М.: МГУ, 1987. — 238 с.
9. *Ташке, К.* Введение в количественную цитогистологическую морфологию / К. Ташке. — Бухарест: СФФ, 1980. — 176 с.
10. *Леонтьев, А. С.* Информационный анализ в морфологических исследованиях / А. С. Леонтьев, Л. А. Леонтьев, А. И. Сыкало. — Минск: Наука и техника, 1981. — 160 с.
11. *Methods in prenatal toxicology: evaluation of embryotoxic effects in experimental animals / P. Peters [et al.]. — Berlin, 1977. — P. 153.*

Поступила 18.05.2012

УДК.616.5-003.93-018.46-089.843-092.4

ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖНОГО ПОКРОВА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ С ДЕФЕКТОМ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

А. Сахаб Хайдар¹, С. И. Третьяк¹, М. К. Недзведь¹, Е. В. Баранов²,
Э. А. Надыров³, Е. С. Лобанок², И. Б. Василевич²

¹Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

²Институт биофизики и клеточной инженерии НАН РБ, г. Минск

³Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, г. Гомель

В статье представлены результаты экспериментальных исследований у лабораторных животных с моделированной инфицированной раной, в лечении которых использовались мезенхимальные стволовые клетки (МСК), полученные из жировой ткани. Установлено, что при применении МСК имеются особенности в регенерации кожных дефектов: быстрее купируются признаки воспаления, ускоряются процессы заживления ран, а также наблюдается стимуляция роста придатков кожи. Полученные результаты могут быть основанием к проведению дальнейших исследований и разработок с целью внедрения в клиническую практику клеточных технологий для лечения пациентов с раневыми дефектами различной этиологии.

Ключевые слова: инфицированные раны, мезенхимальные стволовые клетки, жировая ткань.

THE SKIN REGENERATION FEATURES IN APPLICATION OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL STEM CELLS FROM ADIPOSE TISSUE OF LABORATORY ANIMALS WITH SOFT TISSUE DEFECTS

A. Sahab Haidar¹, S. I. Tretiak¹, M. K. Nedzved¹, E. V. Baranov²,
E. A. Nadyrov³, E. S. Lobanok², I. B. Vasilevich²

¹Belarusian State Medical University, Minsk

²Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences, the Republic of Belarus, Minsk

³Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel

The paper presents the results of experimental studies in laboratory animals with a simulated infected wound. Their treatment included the application of mesenchymal stem cells (MSCs) derived from adipose tissue. It was established that the application of MSCs was accompanied by the regeneration features of skin defects, i.e. the inflammation

was cut short faster, the wound healing processes accelerated, as well as the stimulation of growth of skin appendages was observed. The received results may be used as a basis for further research and development aimed at the introduction of cellular technologies for the treatment of wound defects of various etiology into clinical practice.

Key words: infected wounds, mesenchymal stem cells, adipose tissue.

Введение

Среди важнейших проблем хирургии лечение гнойных ран и трофических язв занимает особое место. В течение последних десятилетий в решении этой проблемы достигнут ряд определенных успехов как в теоретическом, так и в практическом направлении. На сегодняшний день предложено достаточно много методов и лекарственных композиций, направленных на ускорение репаративно-регенераторных процессов в ранах и язвах, а также предотвращающих их вторичное инфицирование. Однако при широкой апробации большинство из применяемых методов лечения оказались не достаточно эффективными. Поэтому проблема лечения этой категории пациентов в целом остается еще далекой от своего разрешения. В последнее время значительный интерес и перспективы в лечении длительно незаживающих, а также инфицированных ран представляет использование клеточных технологий, в том числе и с применением МСК. Стволовая клетка (СК) — это незрелая клетка, способная к самообновлению и развитию в специализированные клетки организма. Способность давать большое разнообразие клеточных типов делает их важнейшим восстановительным резервом в организме, который используется для замещения дефектов [1, 2].

Плюри- и мультипотентность стволовых клеток делает их идеальным материалом для использования в трансплантационных методах клеточной и генной терапии [4]. При этом следует учитывать то, что наряду со стволовыми клетками, которые при повреждении тканей соответствующего органа мигрируют к зоне повреждения, делятся и дифференцируются, образуя в этом месте новую ткань (локальные СК, фибробласты и др.), существуют как бы и «центральные склады запчастей» — стромальные клетки различных органов: жировая ткань (ЖТ), красный костный мозг (ККМ) и др.

МСК являются универсальными клетками. Они, по-видимому, способны поступать с кровотоком в поврежденный орган или ткань и локально, под влиянием ряда факторов давать начало специализированным клеткам, в том числе и нервным, которые замещают погибшие клетки. В настоящее время источниками МСК взрослого организма являются: красный костный мозг, жировая ткань, кровь, кожа, и др.

МСК из жировой ткани были описаны не так давно, в 2002 г. американские ученые впервые предложили использовать жировую ткань человека в качестве источника мультипотентных стволовых клеток [4, 5]. Несколько позже, в 2003 г.,

появились сообщения из Японии о перспективах клинического применения МСК из жировой ткани [6]. Учитывая, что у человека жировая ткань имеется в большом количестве, пациент может являться собственным донором, в результате чего реакция иммунологической несовместимости не будет происходить [3]. Костномозговая ткань человека и млекопитающих рассматривается как один из предпочтительных источников МСК. Однако клиническое использование костного мозга в качестве источника МСК проблематично, так как процедура его получения затруднительна, и в результате удается выделить малое количество клеток [7, 8]. Данные ряда авторов показывают, что из жировой ткани могут быть получены клетки, которые подобно костномозговым мезенхимальным стволовым клеткам имеют морфологию фибробластов, поддерживаются и размножаются *in vitro* в стандартной среде, способны к мультилинейной дифференцировке [9, 10]. Учитывая то, что способ получения МСК из жировой ткани по сравнению с МСК из костного мозга проще и количество полученных клеток больше, можно надеяться на хорошие перспективы использования их в медицине при восстановлении поврежденных тканей.

Цель работы

Изучить особенности регенерации кожи лабораторных животных при применении мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани для улучшения результатов лечения экспериментальных ран.

Материалы и методы

Для проведения экспериментальных исследований были использованы взрослые белые крысы линии Vistar весом 160–200 г. Все животные находились на стандартном рационе питания в виварии со свободным доступом к пище и воде. У экспериментальных животных выполняли моделирование округлой раны на спине по отработанной методике. С этой целью предварительно сбривали шерсть на спине, а затем иссекали кожно-фасциальный лоскут в виде круга диаметром 1,5 см (площадь раны около 1,77 см²). Для получения одинаковых по размеру дефектов использовали эталон такого же диаметра, изготовленный из металла. После обработки антисептиками эталон прикладывали к операционному полю и маркером по краям круга наносили ориентиры, по которым в дальнейшем делали насечки кожи скальпелем. Выкраивали лоскуты указанного размера и формы, состоящие из кожи, подкожной клетчатки и фасции до мышц, с использованием глазных ножниц и пинцета (рисунок 1).

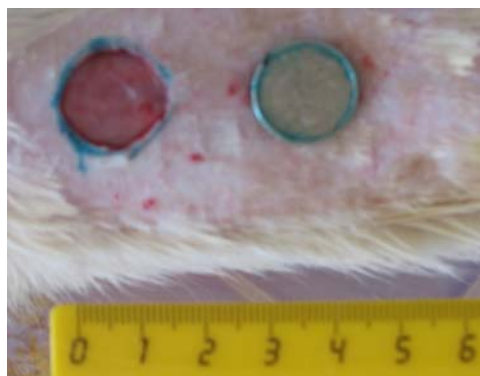


Рисунок 1 — Моделирование хирургической раны

Затем дно и края раны инфицировали путем инъекций 24-часовой монокультуры эталонных штаммов бактерий (*Staphylococcus aureus*), суспендированной в 0,9 % растворе натрия хлорида до 1×10^9 КОЕ/мл (концентрация определялась по стандарту мутности). Объем вводимой взвеси микробов составлял не более 2,0 мл. Гнойную рану получали спустя 2 суток от начала моделирования.

Все животные были разделены на 2 группы: контрольную ($n = 10$) и основную ($n = 10$). В контрольной группе, начиная со 2 суток от начала эксперимента, ежедневно для локальной санации раны применялись стандартные антисептики (перекись водорода 3 %, хлоргексидин 0,05 %). В основной группе экспериментальных животных лечение включало клеточную терапию с использованием аутологических МСК из ЖТ крыс на 2 сутки с начала эксперимента. В этой группе после санации инфицированной раны в асептических условиях выполняли трансплантацию МСК ЖТ методом локальной трансплантации в околораневую область. Клеточный биоматериал доставляли

путем инъекции в количестве 1×10^6 клеток/мл. Ежедневно проводили наблюдение за состоянием животных, а также объективный осмотр ран с динамической фотосъемкой и последующей компьютерной планиметрией. Животных в основной и контрольной группе выводили из эксперимента на 3, 5, 10, 14 и 30 сутки. В эти же сроки вырезались кусочки тканей по большему диаметру раны с краями и подлежащими тканями для гистологического исследования. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм окрашивались гематоксилином и эозином. В дальнейшем выполняли световую микроскопию срезов тканей экспериментальной раны в разных полях зрения.

Результаты и обсуждение

На 2 сутки после инфицирования раны в сравнимых группах были однотипны и характеризовались наличием геморрагического струпа с умеренным количеством серозно-геморрагического экссудата, а иногда имеющего и гнойный характер. Вокруг ран отмечался воспалительный инфильтрат, покраснение и отек окружающих тканей (рисунок 2).



Рисунок 2 — Макроскопическая характеристика кожной раны животных на 2 сутки после инфицирования

Морфологически на поверхности ран определялись гнойно-некротические массы, достигающие до жировой клетчатки. Вся поверхность ран покрывал тонкий струп, состоящий из белковой массы и нейтрофилов.

При изучении морфологической картины было выявлено, что в контрольной группе животных на 3 сутки поверхность раны на всем протяжении была покрыта тонким струпом, который покрывал жировую клетчатку. Мес-

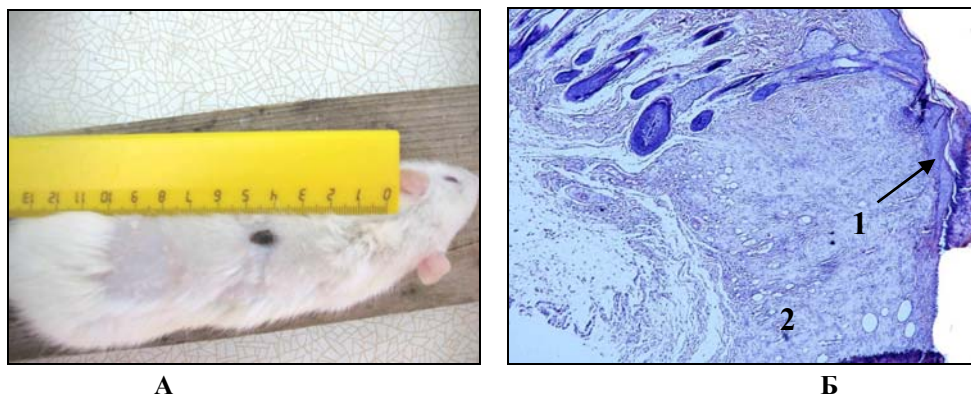
тами под струпом располагались небольшие участки некротизированной ткани, которая была пропитана белками. Жировая клетчатка была инфильтрирована лимфоцитами, плазматическими клетками и нейтрофильными лейкоцитами. В области краев раны определялась очаговая пролиферация фибробластов с образованием коллагеновых волокон.

В динамике на 5-е сутки наблюдения рану по-прежнему покрывал струп, отделенный от подлежащей жировой клетчатки слоем некротизированной ткани, которая была пропитана белками и эритроцитами. Все подлежащие ткани были инфильтрированы нейтрофилами и лимфоцитами. Местами вокруг некротических фокусов формировалась грануляционная ткань.

На 10 сутки исследования поверхность раны была покрыта тонким слоем струпа, под которым располагалась созревающая грануляционная ткань с большим количеством фиб-

робластов и лимфоцитов с умеренным количеством коллагеновых волокон.

При визуальном наблюдении на 14 сутки эксперимента в основной группе определялся небольшой раневой дефект, покрытый тонким слоем струпа, шерсть по периферии раны отсутствовала (рисунок 3а). При исследовании срезов рана была представлена созревающей грануляционной тканью с остатками мелких кровеносных сосудов, ориентированных вдоль раны, и фибробластами. В более глубоких слоях раны наблюдалась зрелая соединительная ткань, скопление гемосидерофагов, лимфоцитов и плазматических клеток. Формирование саленных желез и волосяных фолликул в области раны не определялось. По периферии раневого дефекта наблюдалось прорастание многослойного эпителия, сохранялся дефект эпителизации. Под многослойным эпителием располагалась созревающая грануляционная ткань (рисунок 3б).

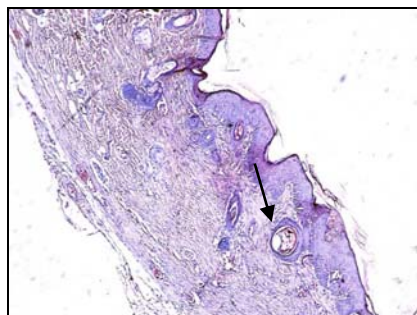


а) визуальное наблюдение кожной раны; б) по периферии раневого дефекта многослойный эпителий прорастает под струп (1), сохраняется дефект эпителизации. Под многослойным эпителием — грануляционная ткань (2). Окраска: гематоксилином и эозином. Увеличение: $\times 40$.

Рисунок 3 — Макро- и микроскопическая характеристика кожной раны животных контрольной группы на 14 сутки эксперимента

На 30 сутки дефекта эпителизации не было выявлено. Кожа в месте раны была неподвижна и спаяна с окружающими тканями. Отмечалось формирование роговых кист на отдельных уча-

стках многослойного эпителия. Под многослойным эпителием определялась формирующаяся рубцовая ткань. Придатки кожи в фиброзной ткани также отсутствовали (рисунок 4).



Дефект эпителизация отсутствует. Под многослойным эпителием — формирующаяся рубцовая ткань, стрелкой указана роговая киста. Придатки кожи в фиброзной ткани отсутствуют. Окраска: гематоксилином и эозином. Увеличение: $\times 60$.

Рисунок 4 — Микроскопическая характеристика кожной раны животных контрольной группы на 30 сутки эксперимента

В основной группе на 3 сутки после трансплантации МСК из ЖТ поверхность раны была представлена гнойно-фибринозными наложениями, под которыми определялось образование грануляционной ткани с единичными кровеносными сосудами. Воспалительный инфильтрат в препарате распространялся на жировую клетчатку и мышцы. Очаги некроза у животных этой группы в отличие от контрольной отсутствовали.

В динамике на 5 сутки наблюдения у животных экспериментальной группы в отличие от контрольной поверхность раны была покрыта плотным струпом, под которым диффузно располагалась молодая грануляционная ткань, инфильтрированная лимфоцитами и небольшим количеством нейтрофилов. Местами лейкоцитарная инфильтрация распространялась на жировую клетчатку, однако она была значительно менее выражена в отличие от кон-

трольной группы. В поверхностных отделах грануляционной ткани выявлялись единичные тонкостенные сосуды.

При наблюдении на 10 сутки у всех животных определялась чистая поверхность раны, которая была представлена созревающей грануляционной тканью с наличием коллагеновых волокон. Площадь, занимаемая грануляциями, была значительно больше, чем в контрольной группе.

При исследовании срезов на 14 сутки наблюдения дефект эпителизации отсутствовал, визуально поверхность раны была покрыта многослойным плоским эпителием, волосяной покров в области раневой поверхности был практически восстановлен (рисунок 5а). Под многослойным эпителием имелась молодая соединительная ткань, среди зрелых коллагеновых волокон располагались единичные жировые клетки (рисунок 5б).



А



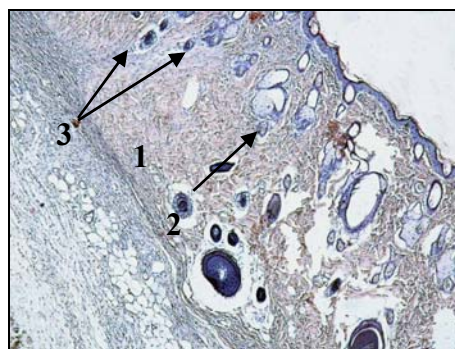
Б

а) визуальное наблюдение кожной раны; б) дефект эпителизации отсутствует. Под многослойным эпителием (стрелка) — созревающая грануляционная ткань (1).
Окраска: гематоксилином и эозином. Увеличение: $\times 40$.

Рисунок 5 — Макро- и микроскопическая характеристика кожной раны животных основной группы на 14 сутки эксперимента

При динамическом наблюдении на 30 сутки дефекта эпителизации у всех лабораторных животных не отмечалось. Волосяной покров был полностью восстановлен. Кожа в месте

раны подвижна и не спаяна с окружающими тканями. В фиброзной ткани под многослойным эпителием формировались сальные железы и волосяные фолликулы (рисунок 6).



Дефект эпителизации отсутствует. В фиброзной ткани (1) под многослойным эпителием формируются сальные железы (2) и волосяные луковицы (3) (указано стрелками).

Окраска: гематоксилином и эозином. Увеличение: $\times 40$.

Рисунок 6 — Микроскопическая характеристика кожной раны животных основной группы на 30 сутки эксперимента

Заключение

Использование стволовых клеток в комплексном лечении инфицированных ран позволяет быстрее по сравнению с традиционными методами лечения восстанавливать целостность кожи. Благодаря способности стволовых клеток усиливать противовоспалительные и регенераторные процессы, регенерация в области раны значительно ускоряется. МСК стимулируют развитие полноценного эпидермиса, ускоряют заживление раневой поверхности, улучшают косметические результаты лечения. По-видимому, это обусловлено тем, что клетки мононуклеарной фракции из жировой ткани продуцируют ряд цитокинов и факторов роста, стимулирующих образование грануляционной ткани и регенерацию придатков кожи [4]. Кроме того, использование МСК позволяет ускорить процессы регенерации за счет присутствия им способности дифференцироваться в различные элементы кожной ткани. Обращает на себя внимание и тот, факт, что было достигнуто полное заживление раневых поверхностей.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Викторов, И. В. Стволовые клетки мозга млекопитающих: биология стволовых клеток *in vitro* и *in vivo* / И. В. Викторов // Изв. АН. Сер. биол. — 2001. — № 6. — С. 645–655.
2. Сухих, Г. Т. Нейральная стволовая клетка: биология и перспективы нейротрансплантации / Г. Т. Сухих, В. В. Малайцев // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 2001. — Т. 131, № 2. — С. 244–255.
3. Эффект чужеродного гена GDNF на развитие гомо- и ксенотрансплантатов в мозгу крысы / М. А. Александрова [и др.] // Генетика. — 2000. — Т. 36, № 11. — С. 1553–1560.
4. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / P. A. Zuk [et al.] // Mol Biol Cell. — 2002. — № 13(12). — P. 4279–4295.
5. Comparison of multi-Lineage cells from human adipose tissue and bone marrows / D. A. De Ugarte [et al.] // Cell Tissue Organs. — 2003. — № 174(3). — P. 101–109.
6. Mizuno, H. Mesengenic potential and future clinical perspectives of human processed lipoaspirate cells / H. Mizuno, H. Hyakusoku // J Nippon Med Sch. — 2003. — № 70(4). — P. 300–306.
7. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells / D. T. Covas [et al.] // Braz. J. Med. Biol. Res. — 2003. — Vol. 36(9). — P. 1179–1183.
8. Fickert, S. Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting / J. Fiedler, R. E. Brenner // Osteoarthritis Cartilage. — 2003. — Vol. 11(11). — P. 790–800.
9. Mizuno, H. Versatility of adipose tissue as a source of stem cells / H. Mizuno // J. Nippon. Med. Sch. — 2003. — Vol. 70(5). — P. 428–431.
10. Bone marrow accessory cells regulate human bone precursor development / P. G. Eipers [et al.] // Exp. Hematol. — 2000. — Vol. 28. — P. 815–825.

Поступила 23.03.2012

ОБЩЕСТВЕННОЕ ЗДОРОВЬЕ И ЗДРАВООХРАНЕНИЕ, ГИГИЕНА

УДК 613.81/.84:613.955

ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ СРЕДИ ШКОЛЬНИКОВ

Л. Г. Соболева, Т. М. Шаршакова

Гомельский государственный медицинский университет

Цель: изучение распространенности психоактивных веществ среди учащихся г. Гомеля.

Материалы и метод. В исследовании приняли участие 1278 детей в возрасте от 6 до 18 лет. Методом анкетирования были изучены факторы риска образа жизни школьников, их распространенность. Статистическая обработка материала проводилась с помощью пакета прикладных программ SPSS-13, SPSS-16 с использованием сравнительной оценки распределений по ряду учетных признаков.

Результаты. Установлено, что курят 1,3 % детей 3–4 классов. Удельный вес детей, пробовавших курить, с возрастом увеличился в 14 раз (с 2,4 до 33,3 %; $\chi^2 = 55,075$, $p < 0,001$). В старших классах курят 37,6 % учащихся. Основные мотивы курения: «сильный стресс», «интерес, любопытство» и «пример и влияние друзей». 24,5 % детей начальных классов пробовали спиртные напитки. В среднем школьном возрасте в 2 раза увеличился удельный вес детей, пробовавших спиртные напитки (с 36,9 до 68,1 %; $\chi^2 = 54,455$, $p < 0,001$). Причем девочки достоверно чаще пробуют спиртные напитки, чем мальчики (55,1 и 45,7 % соответственно, $\chi^2 = 3,746$; $p < 0,05$). По данным опроса, первый опыт употребления алкоголя у детей младшего и среднего школьного возраста произошел в пять лет, старшего школьного возрасте — в 7. Ежедневно употребляют энергетические напитки и пиво 1,6 % старшеклассников, вино — 0,2 %, крепкие алкогольные напитки — 0,5 %. Несколько раз в неделю употребляют пиво и энергетические напитки 8 % опрошенных, вино — 1,2 %, крепкие алкогольные напитки — 2,1 % школьников. Пробовали наркотические, токсические вещества 17,6 % детей среднего и старшего школьного возраста.

Заключение. Результаты исследования свидетельствуют о необходимости активизации работы школьных психологов и социальных педагогов по раннему выявлению детей с проблемным поведением и неблагополучных семей для своевременного вмешательства на уровне школы и семьи. Одновременно полученные данные указывают на необходимость систематического проведения воспитательной и образовательной работы среди детей и подростков и с их семьями по формированию здорового образа жизни и навыков противостояния употреблению психоактивных веществ, начиная с младшего школьного возраста, с оценкой эффективности проводимых мероприятий.

Ключевые слова: курение, употребление спиртных напитков, школьник, употребление наркотиков, поведенческие факторы.