

Морфологічне обґрунтування місцевого застосування мезенхімальних стовбурових клітин у лікуванні експериментальних хронічних гнійно-некротичних ран

С. В. Слободяник  *A,B,D, С. Д. Хіміч  C,E, С. В. Вернигородський  E,F,
В. С. Школьніков  E,F

Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Україна

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Ключові слова:

мезенхімальні стовбурові клітини, хронічні гнійно-некротичні рани, лікування, морфологічні зміни, загоєння ран, імуногістохімія.

Патологія. 2022.

Т. 19, № 1(54).
С. 70-78

*E-mail:

s300000003@gmail.com

Мета роботи – вивчення морфологічних параметрів загоєння хронічних гнійно-некротичних ран у білих щурів при місцевому застосуванні 0,025 % розчину декаметоксину та мезенхімальних стовбурових клітин.

Матеріали та методи. Експериментальне дослідження виконали на 120 щурах, яких поділили на групи: I – контроль (без лікування); II – «класичне» лікування ран з використанням антисептика (0,025 % розчин декаметоксину); III – застосування мезенхімальних стовбурових клітин із пупкового канатика; IV – застосування мезенхімальних стовбурових клітин, клонуваних в інертних газах. Для оцінювання морфологічних змін із країв ран вирізали фрагменти розмірами 0,5 см × 1,0 см × 1,0 см, фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну та заливали парафіном. Гістологічні зрізи завтовшки 5–7 мкм забарвлювали гематоксиліном і еозином, основним коричневим, пікрофуксином за ван Гізоном, трихромом за Массоном.

Для імуногістохімічних досліджень використовували моноклональні антитіла компанії DAKO: до проміжних філаментів, мезенхімальних клітин і міофібробластів – Vimentin (Clone V9), гладком'язового актину (αSMA, Clone 1A4), трансмембранного білка ендотеліальних клітин, стовбурових і ембріональних фібробластів – CD34 (Clone QBEnd 10), а також систему візуалізації En VisionTMFLEX.

Результати. Позитивну динаміку загоєння хронічних ран у разі застосування 0,025 % розчину декаметоксину спостерігали тільки на ранніх термінах (3–7 доба), зокрема виявили зменшення запальної клітинної інфільтрації порівняно з МСК і МСК-ІГ. Останні були ефективними на всіх етапах дослідження, що підтверджувалося швидшим очищенням поверхні рани від гнійно-некротичних тканин, зменшенням площі, прискоренням формування грануляційної тканини та епітелізації рани.

Висновки. Використання МСК і МСК-ІГ створюють сприятливі умови для нормального перебігу регенераторних процесів та епітелізації ран з активацією фібробластів, що підвищує ефективність загоєння хронічних ран.

Key words:

mesenchymal stem cells, chronic purulent-necrotic wounds, treatment, morphological changes, wound healing, immunohistochemistry.

Pathologia

2022; 19 (1), 70-78

Morphological rationale of mesenchymal stem cells in the local treatment of experimental chronic purulent-necrotic wounds

S. V. Slobodanyk, S. D. Khimich, S. V. Vernygorodskiy, V. S. Shkolnikov

Aim: to study morphological changes in healing of chronic purulent-necrotic wounds in rats with local use of 0.025 % decamethoxine solution and mesenchymal stem cells.

Materials and methods. The experimental study was performed on 120 rats, which were divided into the following groups: I – control (without treatment); II – the use of classical wound healing (0.025 % decamethoxine); III – the use of clones of mesenchymal stem cells from the umbilical cord; IV – the use of clones of mesenchymal stem cells (cloned in inert gases). To assess morphological changes in chronic wounds, fragments measuring 0.5 cm × 1.0 cm × 1.0 cm were cut from the edges, followed by fixation in 10 % solution of neutral formalin. The microspecimens were prepared according to standard methods, histological sections 5–7 μm thick were stained with hematoxylin and eosin, basic brown, picrofuchsin according to van Gieson, Masson trichrome. The monoclonal antibodies (DAKO) with markers of intermediate filaments, mesenchymal cells and myofibroblasts – Vimentin (Clone V9), smooth muscle actin (αSMA, Clone 1A4), transmembrane protein of endothelial, stem cells and embryonic fibroblasts CD34 (Clone QBEnd 10) were used for immunohistochemistry.

Results. The positive dynamics of chronic wounds healing, with the usage of 0.025 % decamethoxine solution only in the early stages (3–7 days) was determined with a decrease in inflammatory cellular infiltration, while MSC and MSC-IG were effective at all stages of research and confirmed by more intensive purification of the wound's surface from purulent and necrotic tissues, area of the wound reduction, granulation tissue formation and epithelialization acceleration.

Conclusions. The use of MSCs and MSCs-IG creates favorable conditions for the normal course of regenerative processes and epithelialization of wounds with the activation of fibroblasts, which increases the effectiveness of chronic wound healing.

Пацієнти з рановою інфекцією становлять майже 40 % хворих усього хірургічного профілю [1]. Ризик генералізації інфекції є при будь-якому, навіть невеликому за розмірами, осередку. Лікування хірургічних інфекційних захворювань і післяопераційних інфекційних ускладнень потребує істотних трудових і матеріальних витрат, а летальність при інфекційних ускладненнях у післяопераційному періоді сягає 30 % [1].

Незважаючи на появу нових високотехнологічних методів діагностики, високоефективних лікарських препаратів, постійне удосконалення оперативної техніки, з кожним роком спостерігають збільшення кількості хворих саме з хронічною рановою інфекцією [1,2]. Це пов'язано не тільки зі збільшенням кількості хворих із гнійними ранами, але й з відсутністю універсального засобу чи методу лікування ран. Традиційні засоби і методи лікування ускладнених ран часто мало-ефективні та не завжди запобігають розвитку різних ускладнень. Це визначає необхідність продовження пошуку нових і удосконалення відомих засобів, методів лікування, що стимулюють репаративні процеси в ускладнених ранах, а також поглибленого вивчення механізмів їхньої дії, зокрема застосовуючи морфологічні методи дослідження [3]. Перспективні напрями досліджень щодо цієї патології – вивчення доцільності розширення показань до застосування хірургічних методів та удосконалення способів місцевого впливу на рановий процес [4].

Прогресивним методом лікування ранових дефектів є трансплантація алогенних мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) жирових тканин, що одержані *in vitro*. Доведено, що введення МСК у післяопікові рани призводить до прискорення процесів васкуляризації та епітелізації, поліпшуючи процес загоєння ран. Ці ефекти досягаються завдяки секреції МСК низки цитокінів, хемокінів, факторів росту, що мають імуносупресорну, протизапальну та антибактеріальну дію [5]. Незважаючи на різноманіття запропонованих методів, можливості підвищення ефективності лікування ранового процесу до кінця не вичерпано, що визначає доцільність продовження досліджень у цьому напрямі.

Мета роботи

Вивчення морфологічних параметрів загоєння хронічних гнійно-некротичних ран у білих щурів при місцевому застосуванні 0,025 % розчину декаметоксину та мезенхімальних стовбурових клітин.

Матеріали і методи дослідження

Експериментальне дослідження здійснили на 120 щурах на базі ветеринарної клініки (віварію) Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова. Тварин поділили на групи: I – контроль (без лікування); II – «класичне» лікування ран з використанням антисептика (0,025 % розчин декаметоксину); III – застосування мезенхімальних стовбурових клітин із пупкового канатика; IV – застосування мезенхімальних стовбурових клітин, клонуваних в інертних газах. Хронічну рану моделювали за оригінальною методикою автора [6]: під час формування

стандартного дефекту шкіри в міжлопатковій ділянці щура діаметром 1 см на прилеглі тканини накладали ішемізуючу металокопцю для зменшення кровотоку в ділянці рани, що призводило до суттєвого уповільнення термінів загоєння. Лікування починали від 28 доби від нанесення ран, що клінічно та гістологічно відповідало хронізації ранового процесу.

МСК Вартонова студня (МСК-ВС) людини отримали з Інституту молекулярної біології та генетики НАН України згідно з договором. У цьому досліді використали МСК-ВС, культивовані за стандартних умов CO₂-інкубатора, при зниженій концентрації кисню (в герметичній камері, 3 % кисню, 92 % азоту, 5 % вуглекислий газ – в інертних газах). МСК-ВС вводили локально одноразово на 28 добу з часу моделювання хронічної рани методом циркулярного ін'єкційного внутрішньошкірного нагнітання в краї рани 500 тис. клітин у 0,5 мл фізіологічного розчину; 0,025 % розчин декаметоксину застосовували місцево методом накладання просоченої ним стерильної марлевої пов'язки під час щоденних перев'язок.

Дослідження виконали згідно з міжнародними конвенціями щодо захисту тварин, яких застосовують з експериментальними та іншими науковими цілями (Страсбург, 1985), а також відповідно до положень комітету з біоетики Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова МОЗ України.

Для оцінювання морфологічних змін із країв ран вирізали фрагменти розмірами 0,5 см × 1,0 см × 1,0 см, фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну та заливали парафіном. Гістологічні зрізи завтовшки 5–7 мкм забарвлювали гематоксиліном та еозином, основним коричневим, пікрофуксином за ван Гізоном, трихромом за Масоном та комбінацією основного коричневого та міцного зеленого барвника [7]. Мікроскопію та фотографування гістологічних препаратів виконали за допомогою світлового мікроскопа OLIMPUS BX 41 при збільшеннях у 40, 100, 200 і 400 разів. Під час мікроскопії оцінювали стан і клітинний склад хронічних ран, наявність і характер репаративних змін. Морфометрію та статистичне опрацювання даних виконали за допомогою програми Quick PHOTO MICRO 2.3. Вміст клітинних елементів визначали з розрахунку на одиницю умовної площі (0,1 мм²) [8].

Імуногістохімічне дослідження здійснили, використавши моноклональні антитіла компанії DAKO: до проміжних філаментів, мезенхімальних клітин і міофібробластів – Vimentin (Clone V9), гладком'язового актину (αSMA, Clone 1A4), трансмембранного білка ендотеліальних клітин, стовбурових і ембріональних фібробластів – CD34 (Clone QBEnd 10), а також систему візуалізації En VisionTMFLEX.

Результати дослідження оцінювали, враховуючи розподіл експресії віментину, αSMA та CD34 в клітинах, інтенсивність реакції та характер взаємодії з іншими структурними елементами. Імуногістохімічну реакцію оцінювали в 10 полях зору при 200 та 400-разовому збільшенні. Інтенсивність експресії визначали напівкількісним методом на основі виразності та цілісності забарвлення цитоплазми за градацією: низька, помірна та сильна. Як контроль використали шматочки ран, що одержані від експериментальних тварин без коригувальної терапії. Виразність експресії віменти-

Таблиця 1. Щільність розташування клітинних елементів та інтенсивність експресії α SMA, CD34, віментину (з розрахунку на 0,1 мм²) під час лікування хронічних гнійно-некротичних ран на 7 добу експерименту

Клітинний склад	Експериментальні групи			
	Контроль	Декаметоксин	МСК	МСК-ІГ
ПЯЛ	798,00 ± 5,33	689,00 ± 4,06*	675,00 ± 7,78*	349,00 ± 17,47*
Плазмоцити	80,00 ± 3,33	69,00 ± 4,33*	60,00 ± 3,33*	56,00 ± 2,66**
Лімфоцити	154,00 ± 5,61	94,00 ± 4,52*	84,00 ± 2,21*	77,00 ± 2,13**
Макрофаги	132,00 ± 4,42	95,00 ± 3,07*	79,00 ± 3,14*	55,00 ± 4,01*
Мастоцити	9,00 ± 0,44	6,10 ± 0,27 [^]	5,40 ± 0,37 [^]	5,50 ± 0,41 [^]
Фібробласти	110,00 ± 4,22	149,00 ± 5,04*	171,00 ± 5,05*	208,00 ± 3,88*
α SMA	0,75 ± 0,04	0,81 ± 0,05 [^]	0,79 ± 0,02 [^]	1,11 ± 0,12**
CD34	0,22 ± 0,01	0,28 ± 0,03 [^]	0,29 ± 0,04 [^]	0,73 ± 0,07*
Віментин	1,50 ± 0,14	1,61 ± 0,12 [^]	2,04 ± 0,03*	2,34 ± 0,07*

ПЯЛ: поліморфноядерні лейкоцити; **МСК:** мезенхімальні стовбурові клітини; **МСК-ІГ:** мезенхімальні стовбурові клітини, клоновані в інертних газах; *: $p < 0,001$ порівняно з контролем; **: $p < 0,05$ порівняно з декаметоксином; [^]: $p > 0,05$ порівнюючи групи спостереження.

ну, гладком'язового актину та CD34 градуювали на 4 категорії: 0 (-) – негативна реакція (забарвлення <5 % клітин); 1 (+) – слабе забарвлення (позитивно забарвлені 10–30 % клітин); 2 (++) – помірно виражена реакція (більша частина позитивно забарвлених клітин – 31–60 %); 3 (+++) – інтенсивне забарвлення (>60 % клітин або майже всі клітини позитивно забарвлені). Коефіцієнт експресії (КЕ) розраховували для кожного спостереження за формулою: $KE = \sum (i \times v) / 100$, де i – інтенсивність забарвлення в балах (від 0 до 3), v – відсоток забарвлених клітин (від 0 % до 100 % з найбільш вираженою реакцією у 10 полях зору при $\times 400$) для кожного значення [9].

Статистичне опрацювання морфометричних параметрів здійснили за допомогою стандартного програмного пакета Statistica 6.1 фірми StatSoft (НДЦ ВНМУ імені М. І. Пирогова, ліцензійний № ВХХR901E246022FA) та Excel. Відмінності між вибірками визначали за допомогою t -критерію Стьюдента, також обраховували середні значення за кожною ознакою та їхні стандартні відхилення. Рівень $p < 0,05$ визначили як вірогідний у всіх тестах.

Результати

На 28 добу експерименту рани у 97,0 % білих щурів характеризувалися класичними морфологічними ознаками хронічного гнійно-некротичного запалення: наявністю в центрі чималої зони фібриноїдного некрозу з домішками поліморфноядерних лейкоцитів (ПЯЛ), макрофагів, лімфоцитів, плазматичних клітин і мастоцитів. І в центральних відділах (дні), і на краях рани багаточисельний плоский зроговілий епітелій майже не визначили через істотні некротичні зміни епітеліоцитів (рис. 1).

На 3 добу експерименту (31 добу спостереження) вірогідне збільшення кількості ПЯЛ у контрольній групі підтверджено результатами морфометричного дослідження: кількість ПЯЛ становила $967,00 \pm 5,97$ на 0,1 мм² порівняно з групами, де використовували декаметоксин, МСК і МСК, клоновані в інертних газах (МСК-ІГ) – $837,00 \pm 9,78$, $869,00 \pm 12,68$, $845,00 \pm 12,04$ ($p < 0,001$) відповідно.

Морфологічні зміни другої групи (із застосуванням декаметоксину) на третю добу експерименту характеризувалися наявністю всіх фаз запальної відповіді: альтерації, ексудації та проліферації. Порівняно з першою групою ($967,00 \pm 5,97$) інтенсивність лейкоцитарної інфільтрації в цих щурів була меншою ($837,00 \pm 9,78$, $p < 0,001$), але шар фібриноїдного некрозу залишався майже незмінним. У дні рани виявили зменшення некрозу поперечнопозмугованої мускулатури. Поряд зі зменшенням кількісного складу ПЯЛ у групі МСК та, особливо, МСК-ІГ лейкоцитарно-фібринозний шар у кілька разів менший порівняно з контрольною групою та групою декаметоксину. Слід зазначити, що в групах із застосуванням декаметоксину, МСК і МСК-ІГ вже на третю добу лікування в дні та краях ран зафіксували появу вузького пласта з вірогідно збільшеною кількістю віментин-позитивних фібробластів (рис. 2), α SMA-позитивних клітин і CD34-позитивних ендотеліальних клітин. У групі контролю кількість цих клітин становила: α SMA-позитивні клітини – $0,68 \pm 0,02$, CD34-позитивні ендотеліальні клітини – $0,09 \pm 0,01$, віментин-позитивні фібробласти – $1,21 \pm 0,11$. За результатами морфометричних досліджень, у групах із застосуванням декаметоксину, МСК і МСК-ІГ вірогідно збільшувалася кількість α SMA-позитивних міофібробластів (декаметоксин – $0,73 \pm 0,02$; МСК – $0,85 \pm 0,03$; МСК-ІГ – $0,93 \pm 0,03$), CD34-позитивних ендотеліальних клітин (декаметоксин – $0,11 \pm 0,01$; МСК – $0,130 \pm 0,015$; МСК-ІГ – $0,140 \pm 0,007$), мезенхімальних віментин-позитивних клітин (декаметоксин – $1,28 \pm 0,13$; МСК – $1,64 \pm 0,12$; МСК-ІГ – $1,78 \pm 0,11$), особливо в групі з МСК-ІГ ($p < 0,001$).

На 7 добу експерименту морфологічні зміни в хронічних гнійно-некротичних ранах контрольної групи відповідали попередньо встановленим із незначним зменшенням товщини гнійно-некротичного шару та великою кількістю хаотично розташованих фібробластів, мастоцитів, макрофагів, лімфоцитів і плазматичних клітин. Ці спостереження підтверджені результатами морфометричного та імуногістохімічного досліджень (табл. 1).

У групі МСК-ІГ щільність розташування ПЯЛ порівняно з контрольною групою та групою декаметоксину ($p < 0,001$) істотно менша (табл. 1). Крім того, у цій групі (МСК-ІГ) порівняно з групами декаметоксину та МСК кількість лімфоцитів і макрофагів ($77,00 \pm 2,13$ та $55,00 \pm 4,01$ відповідно) вірогідно менша ($p < 0,05$ та $p < 0,001$ відповідно). Зменшення кількості мастоцитів щодо контролю в цей термін дослідження вірогідне ($p < 0,001$) в усіх групах із коригувальною терапією, але недостовірне, якщо порівнювати групи ($p > 0,05$). За даними, що наведені в таблиці 1, кількість фібробластів збільшувалася в усіх експериментальних групах щодо показників контролю ($p < 0,001$), найкращі показники встановили у групі МСК-ІГ ($p < 0,001$) порівняно з групами декаметоксину та МСК.

Особливість цього періоду спостереження в групах з коригувальним лікуванням МСК і МСК-ІГ – вірогідне зменшення клітин мононуклеарного ряду попри збільшення кількості клітин мезенхімального походження з активним васкулогенезом. Це підтверджено результатами імуногістохімічного аналізу (табл. 1), перед-

усім у групі МСК-ІГ, де одержали вірогідні показники ($p < 0,001$) порівняно з контролем та іншими групами. Але експресія α SMA та CD34 у тварин, які отримували для лікування декаметоксин і МСК, не вірогідна ($p > 0,05$) щодо показника групи без лікування.

У контрольній групі в цей термін експерименту в мікропрепаратах визначали виражений набряк, скупчення лімфоцитів, лейкоцитів, макрофагів і в поверхневих відділах, і в незрілій грануляційній тканині. Під час гістологічного дослідження виявили клітинний детрит, оточений добре вираженою піогенною мембраною, що рясно інфільтрована лейкоцитами. Після забарвлення на колагенові волокна спостерігали розпушення волокнистих структур з інфільтрацією нейтрофільними лейкоцитами, великою кількістю лімфоцитів, макрофагів (табл. 1). Зберігалось повнокров'я судин із розширенням, потовщенням їхніх стінок внаслідок набряку.

У групах із застосуванням декаметоксину, МСК і МСК-ІГ на 7 добу експерименту набряк і гіперемія судин порівняно з показниками на 3 добу істотно зменшені. Коагуляційний некроз у центрі рани став однорідним, еозинофільним, гомогенним, у результаті втрати рідини й усихання в ньому з'явилися щілини, подекуди вкриті ендотелієм. У зоні некрозу виявили судини з сегментарно зруйнованими стінками, аглютинованими еритроцитами й тромбами з ознаками початкової організації. По периферії некротизованих ділянок визначили чималу кількість макрофагів, що мають вигляд «зернистих куль», у зоні резорбції вогнищ крововиливів – безліч сидерофагів і новоутворених судин мікроциркуляторного русла.

На 14 добу експерименту під час гістологічного аналізу шкіри в зоні хронічної рани встановили: у першій дослідній групі зберігалися однотипні ознаки загострення хронічного запалення, як-от інфільтрація нейтрофільними гранулоцитами та некроз. Клітинний склад зазнав істотних змін. Так, суттєво зросла кількість фібробластів, що замінили макрофагальні елементи. Щільність розташування клітинних елементів для ПЯЛ становила $518,00 \pm 6,46$, плазмоцитів – $125,00 \pm 3,07$, лімфоцитів – $168,00 \pm 5,12$, макрофагів – $104,00 \pm 4,00$, мастоцитів – $7,10 \pm 0,37$, фібробластів $109,00 \pm 3,48$ у полі зору; це вірогідно менше ($p < 0,001$), ніж у групах із коригувальною терапією (табл. 2). Показники щільності розташування ПЯЛ ($p < 0,001$), плазмоцитів ($p < 0,05$) і макрофагів ($p < 0,05$) кращі у тварин, які отримували МСК і МСК-ІГ порівняно з групою декаметоксину; щодо лімфоцитів, то найбільш вірогідні показники встановлені у групі МСК-ІГ. Експериментальні групи в порядку зростання інтенсивності фібробластичної реакції: МСК-ІГ > МСК > декаметоксин (табл. 2).

У групах МСК-ІГ і МСК на 14 добу у 80 % та 70 % піддослідних тварин спостерігали майже повне очищення ран від гнійно-некротичного детриту та формування сполучнотканинного рубця з епітелізацією (рис. 3). Аналогічні зміни в цей термін виявили у контрольній групі тільки в 10,0 % щурів, у групі декаметоксину – в 60,0 %.

Після лікування із застосуванням декаметоксину та МСК-ІГ спостерігали затихання дистрофічних і де-

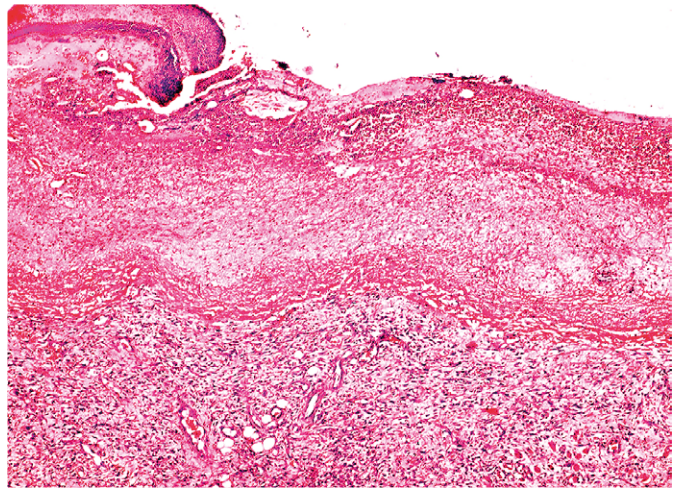


Рис. 1. Край хронічної рани на 28 добу експерименту (без лікування) з некрозом епітеліоцитів, фібриноїдним некрозом і лейкоцитарною інфільтрацією. Забарвлення гематоксилином та еозином. 3б. $\times 100$.

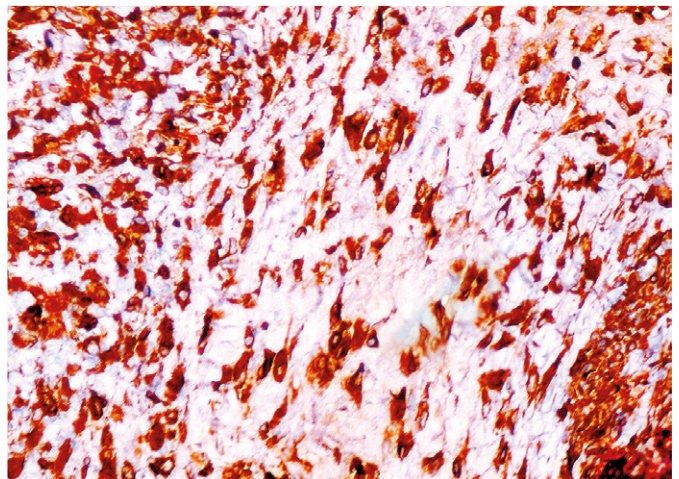


Рис. 2. Пласти віментин-позитивних фібробластів у дні хронічної рани на 3 добу лікування МСК-ІГ (31 доба спостереження). IGH: Vimentin (Clone V9). 3б. $\times 200$.

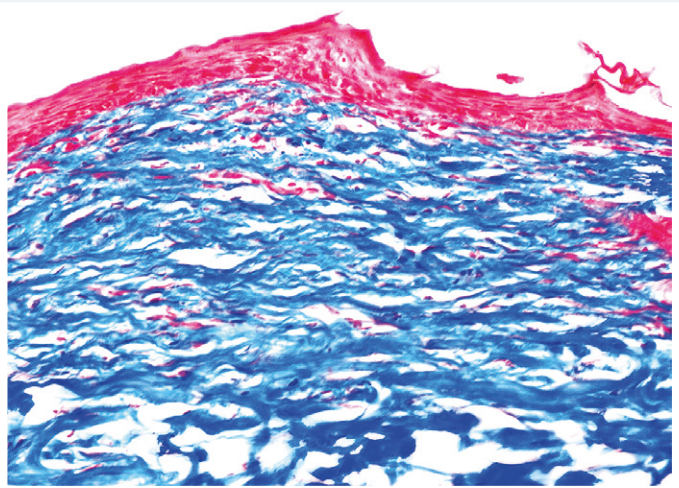


Рис. 3. Сформована сполучна тканина (синього кольору) з епітелізацією на місці хронічної рани на 14 добу лікування МСК-ІГ (42 доба спостереження). Забарвлення – трихром за Массоном. 3б. $\times 200$.

Таблиця 2. Щільність розташування клітинних елементів та інтенсивність експресії α SMA, CD34, віментину (з розрахунку на $0,1 \text{ мм}^2$) під час лікування хронічних гнійно-некротичних ран на 14 добу експерименту

Клітинний склад	Експериментальні групи			
	Контроль	Декаметоксин	МСК	МСК-ІГ
ПЯЛ	518,00 \pm 6,46	368,00 \pm 13,64 [^]	339,00 \pm 9,59*	225,00 \pm 6,54*
Плазмоцити	125,00 \pm 3,07	98,00 \pm 3,59*	89,00 \pm 4,06*	78,00 \pm 2,90*
Лімфоцити	168,00 \pm 5,12	118,00 \pm 4,16*	95,00 \pm 3,72*	88,00 \pm 2,90**
Макрофаги	104,00 \pm 4,00	85,00 \pm 2,68*	80,00 \pm 3,65**	52,00 \pm 2,00**
Мастоцити	7,10 \pm 0,37	4,10 \pm 0,37*	4,00 \pm 0,33*	3,80 \pm 0,48*
Фібробласти	109,00 \pm 3,48	157,00 \pm 4,22*	219,00 \pm 6,40*	346,00 \pm 7,18*
α SMA	0,76 \pm 0,02	0,84 \pm 0,05*	0,86 \pm 0,03*	0,98 \pm 0,09*
CD34	0,27 \pm 0,03	0,33 \pm 0,05 [^]	0,38 \pm 0,05*	0,66 \pm 0,06**
Віментин	1,41 \pm 0,11	1,55 \pm 0,12*	1,87 \pm 0,02*	1,92 \pm 0,05**

ПЯЛ: поліморфноядерні лейкоцити; **МСК:** мезенхімальні стовбурові клітини; **МСК-ІГ:** мезенхімальні стовбурові клітини, клоновані в інертних газах; *: $p < 0,001$ порівняно з контролем; **: $p < 0,05$ порівняно з декаметоксином; [^]: $p > 0,05$ порівнюючі групи спостереження.

Таблиця 3. Щільність розташування клітинних елементів та інтенсивність експресії α SMA, CD34, віментину (з розрахунку на $0,1 \text{ мм}^2$) під час лікування хронічних гнійно-некротичних ран на 30 добу експерименту

Клітинний склад	Експериментальні групи			
	Контроль	Декаметоксин	МСК	МСК-ІГ
ПЯЛ	389,00 \pm 14,56	187,00 \pm 14,53*	136,00 \pm 10,56*	81,00 \pm 4,58*
Плазмоцити	120,00 \pm 3,94	94,00 \pm 2,66*	86,00 \pm 3,05*	63,00 \pm 2,60*
Лімфоцити	152,00 \pm 3,26	108,00 \pm 4,16*	87,00 \pm 2,13*	53,00 \pm 3,00*
Макрофаги	107,00 \pm 3,66	67,00 \pm 2,60*	63,00 \pm 4,22*	34,00 \pm 2,66*
Мастоцити	5,80 \pm 0,33	3,30 \pm 0,49*	3,70 \pm 0,50*	1,90 \pm 0,37**
Фібробласти	140,00 \pm 4,21	182,00 \pm 9,40*	262,00 \pm 6,96*	288,00 \pm 4,89**
α SMA	0,61 \pm 0,05	0,76 \pm 0,02 [#]	0,78 \pm 0,06 [#]	0,91 \pm 0,03*
CD34	0,23 \pm 0,01	0,41 \pm 0,06 [#]	0,37 \pm 0,05 [#]	0,40 \pm 0,05 [#]
Віментин	1,36 \pm 0,10	1,51 \pm 0,11 [^]	1,79 \pm 0,07 [#]	1,85 \pm 0,09**

ПЯЛ: поліморфноядерні лейкоцити; **МСК:** мезенхімальні стовбурові клітини; **МСК-ІГ:** мезенхімальні стовбурові клітини, клоновані в інертних газах; *: $p < 0,001$ порівняно з контролем; **: $p < 0,05$ порівняно з декаметоксином; [^]: $p > 0,05$ порівнюючі групи спостереження.

генеративних змін колагенових волокон. Але в групі МСК-ІГ у цей термін спостереження визначили вірогідне зменшення дистрофічних змін у гладких м'язових елементах і збільшення кількості гладком'язових елементів. Це підтверджено результатами імуногістохімічного дослідження з використанням SMA (табл. 2).

У цей термін спостереження маркери експресії міофібробластів, ендотеліальних і мезенхімальних клітин достовірно вищі в групах МСК і МСК-ІГ порівняно з контролем ($p < 0,001$), крім CD34 у групі декаметоксину, посилення забарвлення якого не було вірогідним. Найвищі імуногістохімічні показники встановили в експериментальних тварин, які отримували лікування МСК-ІГ.

На 30 добу експерименту (58 добу спостереження) в групі контролю у 70 % щурів епітелій, що наростав на краю хронічної рани, нерідко некротизувався та був пронизаний лейкоцитами. Однак епітеліальні вирости в грануляційній тканині, іноді доволі глибокі, зберігалися та могли бути джерелом нового, повторного росту епітелію на поверхні рани. В ранах деяких щурів контрольної групи в ділянках, що ближчі до інтактної тканини навколо судин мікроциркуляторного русла, передусім у дермі навколо судин, виявляли дегрануючі мастоцити, розташовані поодинокі або малими

групами. Це майже не спостерігали або їх виявляли в незначній кількості у групах із коригувальним лікуванням (табл. 3).

Отже, на 30 добу експерименту у 70 % піддослідних тварин у групі контролю не відбувалася епітелізація рани, заміщення грануляційної тканини на фіброзну. Це свідчило про прогресування гнійного запалення та пролонгацію першої фази загоєння ран. У дні та на краях хронічної рани щурів контрольної групи виявили молоді сполучну тканину, що містила численні клітинні елементи: макрофаги, фібробласти, лімфо- та плазмоцити, невелику кількість нейтрофільних гранулоцитів. Деякі з кровоносних судин, що тут виявляли, розширені. У венах нерідко спостерігали явища стазу. У сполучній тканині в цей термін визначили невелику кількість нейтрофільних гранулоцитів. Порівняно з експериментальними групами тварин, що отримували медикаментозну корекцію, тут суттєво збільшена кількість макрофагів, фібробластів, мастоцитів (табл. 3). У складі інфільтрату з розрахунку на $0,1 \text{ мм}^2$ виявляли ПЯЛ – 389,00 \pm 14,56, плазмоцити – 120,00 \pm 3,94, лімфоцити – 152,00 \pm 3,26, макрофаги – 107,00 \pm 3,66, мастоцити – 5,80 \pm 0,33. Кількість фібробластів також вірогідно відрізнялася в усіх групах від контролю, але у щурів, в яких застосували МСК і МСК-ІГ, фібробластична реакція інтенсивніша порівняно з групою декаметоксину ($p < 0,001$).

За даними, що наведені в таблиці 3, в контрольній групі кількість ПЯЛ удвічі більша, ніж у разі застосування декаметоксину та МСК, учетверо більша, ніж у групі з використанням МСК-ІГ. На нашу думку, це може впливати на перебіг і вираженість процесу репаративної регенерації, який кількісно прямо пропорційний інтенсивності запалення. В контрольній групі у дні хронічної рани часто виявляли лімфоцити та плазмоцити. Порівнюючі морфологічні зміни в хронічних ранах першої та третьої груп, зазначимо: у третій групі грануляційна тканина містить нечисленні макрофаги, лімфоцити, плазмоцити, мастоцити, а також новоутворені капіляри. У третій експериментальній групі в краях хронічної рани, як і в першій групі, визначили певну нерівномірність диференціювання сполучнотканинних елементів. Виявили ділянки, що містять доволі велику кількість фібробластів, мастоцитів, макрофагів і лімфоцитів; інші ділянки – в стані фіброзу. У таких зонах наявні товсті колагенові пучки та нечисленні кровоносні судини. Часто серед фіброзної тканини виявляли дрібні осередкові скупчення лімфоцитів. Фібробласти здебільшого характеризувалися підвищеною базофілією цитоплазми, наявністю великих ядер і ядерців.

На відміну від першої групи, у групах тварин із використанням декаметоксину, МСК і МСК-ІГ запальної клітинної реакції майже не було, що підтверджено кількісним аналізом клітинних елементів у зоні хронічної рани (табл. 3). Порівнюючі активність фібринолізу, виявили: у групі з МСК-ІГ фібробластична реакція стабілізувалася на 30 добу (288,00 \pm 4,89, $p < 0,001$) порівняно з попередніми термінами (табл. 3). У контрольній групі спостерігали затримку дозрівання сполучної тканини, про що свідчили залишки грануляційної тканини в ділянці рани. На відміну від контрольної групи, в разі застосування декаметоксину, МСК і МСК-ІГ грануля-

ційну тканину в цей термін спостереження майже не виявляли. Це свідчить про раніші строки відновлення та стабілізацію ранового процесу.

Результати імуногістохімічного аналізу (табл. 3) підтвердили дані морфологічного дослідження, а також виявили вірогідне переважання α SMA- та CD34-позитивних клітин у групах декаметоксину, МСК і МСК-ІГ ($p < 0,05$ і $p < 0,001$ відповідно). Попри недостовірне збільшення віментин-позитивних клітин у групі декаметоксину ($p < 0,05$), визначили: у тварин, яким вводили МСК-ІГ, отримали найкращі результати.

Отже, в пізніші терміни загоєння ран (починаючи з 1 місяця і далі) у грануляційній тканині відбувалися такі зміни: шар вертикальних судин поступово стоншувався, кількість аморфної проміжної речовини в ньому зменшувалася, водночас збільшувалася кількість фібробластів не тільки навколо судин, але й у проміжках між ними.

Обговорення

Результати нашого дослідження зіставні з даними фахової літератури про етапність змін клітин-учасників запального процесу [10,11]. У фазі запалення спочатку переважають судинні реакції, що характеризують механізм запалення, а потім відбувається очищення рани від мертвих тканин. Друга фаза пов'язана з утворенням грануляційної тканини. Реорганізація рубця й епітелізація – основні компоненти фінальної стадії ранового процесу [12].

У результаті нашої експериментальної роботи встановили відмінності динаміки тканинної реакції під час загоєння хронічних гнійно-некротичних ран. Так, у всіх групах дослідження з коригувальною терапією, використовуючи декаметоксин, МСК і МСК-ІГ, на 3 добу експерименту спостереження виявили вірогідне зменшення запальної клітинної інфільтрації. Треба підкреслити, що в групі декаметоксину кількість ПЯЛ найменша ($837,00 \pm 9,78$) порівняно з МСК і МСК-ІГ. У групах із застосуванням декаметоксину, МСК і МСК-ІГ вже на 3 добу лікування навколо країв ран і в її дні реєстрували появу малодиференційованих клітин, кількість яких істотно відрізнялася від групи контролю. Це підтверджено результатами імуногістохімічного дослідження. Так, у групах із застосуванням декаметоксину, МСК і МСК-ІГ достовірно збільшувалася кількість міофібробластів, що позитивно забарвлювалися α SMA, ендотеліальних клітин, які експресували CD34, і мезенхімальних клітин (віментин-позитивних фібробластів), особливо в групі з МСК-ІГ ($p < 0,001$).

Відомо, що основна функція макрофагів пов'язана з резорбцією за допомогою продукованих ними ферментів і поглинанням чужорідних структур [2]. Макрофаги переводять запальну реакцію в фібробластичну стадію, активуючи проліферацію фібробластів, що синтезують позаклітинний матрикс, зокрема колаген. У контрольній групі відбувалося гальмування фібробластичної реакції внаслідок пролонгації та загострення хронічного запалення на відміну від груп декаметоксину, МСК і МСК-ІГ, де розвиток фібробластичної стадії ранового процесу спостерігали в більшості тварин. Зменшення саме гнійного компонента

вже на 3 добу спостереження більш виражене в разі застосування декаметоксину.

Виявлене на 7 добу вірогідне збільшення кількості фібробластів ($208,00 \pm 3,88$) після лікування МСК-ІГ свідчить, що саме його введення забезпечує швидший перехід на фібробластичну стадію ранового запалення. В контрольній групі встановили: на 7 добу експерименту кількість нейтрофілів удвічі ($p < 0,05$) більша, ніж у групах декаметоксину, МСК і МСК-ІГ. Кількість фібробластів помітно більша під час застосування МСК-ІГ ($208,00 \pm 3,80$). На ранніх строках спостереження (3–7 доба) фібробластична реакція вірогідно ($p < 0,05$) активніша в групах МСК і МСК-ІГ.

Одна з важливих ознак відновлення функції органа – формування судинного русла в пошкоджених тканинах, тому швидкість судиноутворення в грануляційній тканині є одним із критеріїв оцінювання позитивних властивостей застосованого препарату [13]. Як відомо [14,15], васкулогенез пов'язаний із прогеніторними ендотеліальними клітинами, що є попередниками ендотеліальних клітин і добре ідентифікуються за допомогою маркера CD34 як поодинокі клітини, невеликі скупчення та ланцюжки. У групах коригувальної терапії з використанням декаметоксину, МСК і МСК-ІГ нам вдалося виявити позитивну динаміку утворення судин із прогеніторних ендотеліоцитів (васкулогенез) від проліферації цих клітин до утворення серед них невеликих просторів, що, подовжуючись, формували мережу майбутніх судин. Ендотеліоцити з мембранно-цитоплазматичним забарвленням CD34 з утворенням судин капілярного типу добре візуалізувалися в стромальному компоненті дна рани, де виявляли хаотично розташовані судини дрібного калібру з істотним превалюванням капілярів. Встановили вірогідні дані щодо переважання CD34-позитивних клітин у групі з МСК-ІГ ($0,73 \pm 0,07$, $p < 0,001$) як порівняти з контрольною групою. Це відповідає результатам інших дослідників [14,15].

За даними наукової літератури [16], формування епітелію на поверхні рани починається ще в першій стадії загоєння. У нашому дослідженні, слід зазначити, воно дуже повільно відбувалося в контрольній групі. Мінливий баланс між синтезом колагену та його руйнуванням лежить в основі механізму загоєння рани [16,17]. У фазі ремоделювання розпад колагену наростає, а синтез знижується, що підтверджено нашими даними в разі застосування МСК-ІГ та результатами інших авторів [18].

Синтезуючи колаген, еластин, глікопротеїни та протеоглікани, фібробласти забезпечують опорно-механічну функцію шкіри, продукуючи сигнальні молекули, що впливають на проникність судинних стінок і метаболізм, здійснюють трофічну функцію [19]. У нашому дослідженні мікроскопічне вивчення ділянок хронічної гнійно-некротичної рани на 14 добу показало швидшу динаміку очищення від гнійного процесу в разі застосування МСК. Фібробластична реакція в разі використання декаметоксину та МСК у процесі загоєння рани доволі виражена, але для декаметоксину виявили тенденцію до формування грубішого сполучнотканинного рубця. Здатність МСК стимулювати проліферацію фібробластів неодноразово підтверджена експериментально [11,15].

Макрофагально-фібробластична взаємодія призводить до міграції та прискореної проліферації фіброblastів, їх диференціювання, синтезу, секреції колагену та інших компонентів матриксу, активного фібринолізу. В нашому дослідженні спостерігали стимуляцію декаметоксином, МСК і МСК-ІГ активності фіброblastів і судиноутворення в молодій сполучній тканині. Це поліпшувало оксигенацію рани, сприяло прискоренню дозрівання сполучної тканини з наступним ремоделюванням та епітелізацією хронічних гнійно-некротичних ран. У контрольній групі спостерігали затримку запальної реакції на моноцитарно-макрофагальній стадії; це не тільки збільшувало небезпеку гнійних ускладнень, але й перешкоджало завершенню фіброзування, а отже відновленню міцності ранового рубця.

Морфометричні дослідження показали: на 30 добу експерименту (58 доба спостереження) кількість нейтрофільних лейкоцитів, плазмоцитів, лімфоцитів і макрофагів у групі контролю перевищувала відповідні показники запальної відповіді в групах декаметоксину, МСК і МСК-ІГ. Аналогічна тканинна реакція характерна й для дегрануючих мастоцитів, що беруть участь у викиді медіаторів запалення. Це свідчило про прогресування хронічного процесу в рані. В пізні стадії загоєння ран у грануляційній тканині формується досить правильне розташування волокнистих структур, вертикальних і горизонтальних, пересічених у взаємно перпендикулярних напрямках.

Особливе значення під час загоєння рани (стягування), безсумнівно, належить краще розвинутим глибоким шарам горизонтальних фіброblastів і фіброзних волокон. Саме ці елементи змінюють грануляційну тканину, що зникає, і в пізні терміни загоєння заповнюють і стягують рановий дефект. Важливе значення горизонтальних структур, їхню роль у загоєнні рани визнають і інші дослідники [2, 13, 20]. У досліджених нами хронічних ранах контрольної групи, незважаючи на тривалі терміни після моделювання хронічної гнійно-некротичної рани (до 2 місяців і більше), не спостерігали повного закриття й епітелізації, незважаючи на проліферацію фіброзних волокон.

Отже, патоморфологічні дослідження свідчать: використання декаметоксину, МСК і МСК-ІГ під час лікування ран призводить до швидкого пригнічення гнійного запалення, прискорює процеси репаративної регенерації. У разі застосування МСК і МСК-ІГ швидше відбувається ремоделювання грануляційної тканини, а міофіброblastи, які в нашому дослідженні позитивно маркувалися α SMA, є ключовою ланкою в стягуванні рани: вони не тільки підтримують гомеостаз міжклітинного матриксу дерми, забезпечуючи його ремоделювання та оновлення, але й відіграють важливу роль у підтримці фізіологічного стану інших шарів шкіри. Прискорення розвитку фіброblastичної стадії при введенні МСК і МСК-ІГ у рану має важливе значення для ранішого відновлення структури та функцій ушкоджених тканин, а також для запобігання пізнім рановим ускладненням, оскільки неспроможність регенерації чи фіброзу пролонгує запалення або зумовлює його хронічний перебіг. Застосування МСК і МСК-ІГ під час лікування хронічних ран сприяє прискореній епітелізації: за нашими даними, вона починалася

вже на 3 добу та була досить інтенсивною на 7 добу. Це зумовлено синтезом МСК різних факторів росту, що стимулюють проліферацію і мезенхімального, й епітеліального диферону шкіри.

Висновки

1. Результати дослідження довели позитивний ефект під час лікування експериментальних ран і високу ефективність МСК і МСК-ІГ, що підтверджено динамікою морфологічних змін у хронічній рані. В разі застосування декаметоксину встановили позитивну динаміку морфологічних показників загоєння ран на 3–7 добу репаративного процесу, а МСК і МСК-ІГ ефективні на всіх етапах дослідження.

2. Мезенхімальні стовбурові клітини та МСК-ІГ прискорювали процеси загоєння експериментальних хронічних гнійно-некротичних ран вже після 3 доби лікування (31 доба спостереження). В цей термін відбувалося швидше очищення поверхні рани від гнійно-некротичних тканин, прискорення формування грануляційної тканини. На 7 добу лікування під впливом МСК і МСК-ІГ спостерігали швидше формування та дозрівання грануляційної тканини, зменшення площі рани, прискорення процесів епітелізації.

3. На 14 та 30 добу лікування повну епітелізацію ран виявили у 60 % і 70 % експериментальних тварин, яким застосовували декаметоксин, 75 % і 80 % – МСК, 90 % й 95 % шурів – МСК-ІГ відповідно за термінами, а в контрольній групі епітелізацію спостерігали тільки в 10 % і 30 % тварин відповідно ($p < 0,001$).

4. Встановили високу ефективність МСК у комбінації з інертними газами під час лікування експериментальних хронічних гнійно-некротичних ран, що підтверджено вірогідним збільшенням і стабілізацією експресії віментину, CD34 та α SMA ($0,91 \pm 0,03$, $0,40 \pm 0,05$, $1,85 \pm 0,09$ відповідно, $p < 0,001$).

Перспективи подальших досліджень. Застосування розробленого методу під час лікування хронічних ран дає змогу вірогідно скоротити терміни очищення поверхні рани від гнійно-некротичних тканин та епітелізації порівняно з контрольною групою, прискорити дозрівання грануляційної тканини та фібринолізу. Застосування та впровадження клітинних технологій у гнійній хірургії – перспективний напрям для удосконалення та оптимізації лікування хворих із хронічними ранами. Наступні дослідження структурної перебудови хронічних ран із застосуванням новітніх молекулярно-біологічних маркерів під час лікування МСК і МСК-ІГ дадуть змогу здійснювати диференційований вибір тактики фармакокорекції та підвищати ефективність загоєння хронічних ран.

Фінансування

Дослідження виконане у рамках НДР Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова «Розробка науково обґрунтованих критеріїв патоморфозу та морфологічної діагностики соціально значущої інфекційної патології, серцево-судинних хвороб, захворювань жіночої репродуктивної системи», № держреєстрації 0119U103946; НДР «Ушкодження: механічні, фізичні, хімічні та біологічні причини. Механізми розвитку, діагностика та лікування», № держреєстрації 0121U110669.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 10.12.2021

Після доопрацювання / Revised: 23.03.2022

Прийнято до друку / Accepted: 04.04.2022

Відомості про авторів:

Слободяник С. В., асистент каф. загальної хірургії, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Україна.

ORCID ID: [0000-0003-0770-6658](https://orcid.org/0000-0003-0770-6658)

Хімич С. Д., д-р мед. наук, професор, зав. каф. загальної хірургії, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-8643-2140](https://orcid.org/0000-0002-8643-2140)

Вернигородський С. В., д-р мед. наук, професор, зав. каф. патологічної анатомії, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-9314-8527](https://orcid.org/0000-0002-9314-8527)

Школьніков В. С., д-р мед. наук, професор каф. анатомії людини, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Україна.

ORCID ID: [0000-0001-8233-1863](https://orcid.org/0000-0001-8233-1863)

Information about authors:

Slobodianyuk S. V., Assistant of the Department of General Surgery, National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Ukraine.

Khimich S. D., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of General Surgery, National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Ukraine.

Vernygorodskiy S. V., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy, National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Ukraine.

Shkolnikov V. S., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Human Anatomy, National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsia, Ukraine.

Список літератури

- [1] Complex treatment of purulent wounds with the use of high-pressure aerodisperse mixture / V. O. Shaprynskiy, S. S. Skalskiy, Y. V. Shaprynskiy et al. *Wiadomosci Lekarskie*. 2020. Vol. 73, Iss. 5. P. 889-894. <https://doi.org/10.36740/wlek202005110>
- [2] Stem cells and chronic wound healing: state of the art / T. Leavitt, M. Hu, C. Marshall et al. *Chronic Wound Care Management and Research*. 2016. Vol. 3. P. 7-27. <https://doi.org/10.2147/CWCMR.S84369>
- [3] Wilkinson H. N., Hardman M. J. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open biology*. 2020. Vol. 10, Iss. 9. 200223. <https://doi.org/10.1098/rsob.200223>
- [4] Ponomarenko E. V. Use of complex patches for the reconstruction of defects of soft tissue of the trunk and limbs caused by traumatic damage. *Shpytalna khirurgiia. Zhurnal imeni L. Ya. Kovalchuka – Hospital Surgery. Journal Named by L. Ya. Kovalchuk*, (4), 90-94. <https://doi.org/10.11603/2414-4533.2018.4.9719>
- [5] Kosaric N., Kiwanuka H., Gurtner G. C. Stem cell therapies for wound healing. *Expert opinion on biological therapy*. 2019. Vol. 19, Iss. 6. P. 575-585. <https://doi.org/10.1080/14712598.2019.1596257>
- [6] Пат. 123694 Україна, МПК G09B23/28. Спосіб створення хронічної рани у експериментальних тварин / С. В. Слободяник, С. Д. Хімич, М. Д. Желіба, В. С. Школьніков ; заявник та власник Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова. № а202000027; заявл. 02.01.20; опубл. 12.05.2021. Бюл. № 19. <https://sis.ukrpatent.org/uk/search/detail/1593228/>
- [7] A novel RGB-trichrome staining method for routine histological analysis of musculoskeletal tissues / F. Gaytan, C. Morales, C. Reymundo, M. Tena-Sempere. *Scientific reports*. 2020. Vol. 10, Iss. 1. P. 16659. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74031-x>
- [8] Suvarna S. K., Layton C., Bancroft J. D. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 8th ed. Elsevier, 2020. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-00143-5>
- [9] Immunocytochemical analysis of estrogen receptors as a predictor of prognosis in breast cancer patients: comparison with quantitative biochemical methods / L. B. Kinsel, E. Szabo, G. L. Greene et al. *Cancer research*. 1989. Vol. 49, Iss. 4. P. 1052-1056.

- [10] Eming S. A., Martin P., Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science translational medicine*. 2014. Vol. 6, Iss. 265. 265sr6. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009337>
- [11] Multipotent stromal cells/mesenchymal stem cells and fibroblasts combine to minimize skin hypertrophic scarring / C. C. Yates, M. Rodrigues, A. Nuschke et al. *Stem cell research & therapy*. 2017. Vol. 8, Iss. 1. P. 193. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0644-9>
- [12] Skin tissue engineering: wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies / A. Nourian Dehkordi, F. Mirahmadi Babaheydari, M. Chehelgerdi, S. Raeisi Dehkordi. *Stem cell research & therapy*. 2019. Vol. 10, Iss. 1. P. 111. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1212-2>
- [13] Physicochemically Tuned Myofibroblasts for Wound Healing Strategy / U. H. Ko, J. Choi, J. Choung et al. *Scientific reports*. 2019. Vol. 9, Iss. 1. P. 16070. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52523-9>
- [14] Zhang Z., Lv L. Effect of local insulin injection on wound vascularization in patients with diabetic foot ulcer. *Experimental and therapeutic medicine*. 2016. Vol. 11, Iss. 2. P. 397-402. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2917>
- [15] Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration / E. M. Tottoli, R. Dorati, I. Genta et al. *Pharmaceutics*. 2020. Vol. 12, Iss. 8. P. 735. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080735>
- [16] Mathew-Steiner S. S., Roy S., Sen C. K. Collagen in Wound Healing. *Bioengineering*. 2021. Vol. 8, Iss. 5. P. 63. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8050063>
- [17] Rosique R. G., Rosique M. J., Farina Junior J. A. Curbing Inflammation in Skin Wound Healing: A Review. *International journal of inflammation*. 2015. P. 316235. <https://doi.org/10.1155/2015/316235>
- [18] Human mesenchymal stem cells-conditioned medium improves diabetic wound healing mainly through modulating fibroblast behaviors / M. Saheli, M. Bayat, R. Ganji et al. *Archives of dermatological research*. 2019. Vol. 312, Iss. 5. P. 325-336. <https://doi.org/10.1007/s00403-019-02016-6>
- [19] Fibroblasts as immune regulators in infection, inflammation and cancer / S. Avidson, M. Coles, T. Thomas et al. *Nature reviews. Immunology*. 2021. Vol. 21, Iss. 11. P. 714-717. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00540-z>
- [20] MSC-released TGF- β regulate α -SMA expression of myofibroblast during wound healing / A. Putra, I. Alif, N. Hamra et al. *Journal of stem cells & regenerative medicine*. 2020. Vol. 16, Iss. 2. P. 73-79. <https://doi.org/10.46582/jsrm.1602011>

References

- [1] Shaprynskiy, V. O., Skalskiy, S. S., Shaprynskiy, Y. V., Verba, A. V., & Makarov, V. M. (2020). Complex treatment of purulent wounds with the use of high-pressure aerodisperse mixture. *Wiadomosci Lekarskie*, 73(5), 889-894. <https://doi.org/10.36740/wlek202005110>
- [2] Leavitt, T., Hu, M., Marshall, C., Barnes, L., Longaker, M., & Lorenz, P. (2016). Stem cells and chronic wound healing: state of the art. *Chronic Wound Care Management and Research*, 3, 7-27. <https://doi.org/10.2147/CWCMR.S84369>
- [3] Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J. (2020). Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open biology*, 10(9), 200223. <https://doi.org/10.1098/rsob.200223>
- [4] Ponomarenko, E. V. (2019). Use of complex patches for the reconstruction of defects of soft tissue of the trunk and limbs caused by traumatic damage. *Shpytalna khirurgiia. Zhurnal imeni L. Ya. Kovalchuka – Hospital Surgery. Journal Named by L. Ya. Kovalchuk*, (4), 90-94. <https://doi.org/10.11603/2414-4533.2018.4.9719>
- [5] Kosaric, N., Kiwanuka, H., & Gurtner, G. C. (2019). Stem cell therapies for wound healing. *Expert opinion on biological therapy*, 19(6), 575-585. <https://doi.org/10.1080/14712598.2019.1596257>
- [6] Slobodianyuk, S. V., Khimich, S. D., Zheliba, M. D., & Shkolnikov, V. S. (2020). *Sposib stvorennia khronichnoi rany u eksperymentalnykh tvaryn* [Method of creating chronic wound in experimental animals]. Ukraine Patent UA 123694. <https://sis.ukrpatent.org/uk/search/detail/1593228/>
- [7] Gaytan, F., Morales, C., Reymundo, C., & Tena-Sempere, M. (2020). A novel RGB-trichrome staining method for routine histological analysis of musculoskeletal tissues. *Scientific reports*, 10(1), 16659. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74031-x>
- [8] Suvarna, S. K., Layton, C., & Bancroft, J. D. (2020). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques* (8th ed.). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-00143-5>
- [9] Kinsel, L. B., Szabo, E., Greene, G. L., Konrath, J., Leight, G. S., & McCarty, K. S., Jr (1989). Immunocytochemical analysis of estrogen receptors as a predictor of prognosis in breast cancer patients: comparison with quantitative biochemical methods. *Cancer research*, 49(4), 1052-1056.
- [10] Eming, S. A., Martin, P., & Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science translational medicine*, 6(265), 265sr6. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009337>

- [11] Yates, C. C., Rodrigues, M., Nuschke, A., Johnson, Z. I., Whaley, D., Stolz, D., Newsome, J., & Wells, A. (2017). Multipotent stromal cells/mesenchymal stem cells and fibroblasts combine to minimize skin hypertrophic scarring. *Stem cell research & therapy*, 8(1), 193. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0644-9>
- [12] Nourian Dehkordi, A., Mirahmadi Babaheydari, F., Chehelgerdi, M., & Raeisi Dehkordi, S. (2019). Skin tissue engineering: wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 111. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1212-2>
- [13] Ko, U. H., Choi, J., Choung, J., Moon, S., & Shin, J. H. (2019). Physico-chemically Tuned Myofibroblasts for Wound Healing Strategy. *Scientific reports*, 9(1), 16070. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52523-9>
- [14] Zhang, Z., & Lv, L. (2016). Effect of local insulin injection on wound vascularization in patients with diabetic foot ulcer. *Experimental and therapeutic medicine*, 11(2), 397-402. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2917>
- [15] Tottoli, E. M., Dorati, R., Genta, I., Chiesa, E., Pisani, S., & Conti, B. (2020). Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. *Pharmaceutics*, 12(8), 735. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080735>
- [16] Mathew-Steiner, S. S., Roy, S., & Sen, C. K. (2021). Collagen in wound healing. *Bioengineering*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8050063>
- [17] Rosique, R. G., Rosique, M. J., & Farina Junior, J. A. (2015). Curbing inflammation in skin wound healing: A review. *International Journal of Inflammation*. Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2015/316235>
- [18] Saheli, M., Bayat, M., Ganji, R., Hendudari, F., Kheirjou, R., Pakzad, M., Najari, B., & Piryaeei, A. (2020). Human mesenchymal stem cells-conditioned medium improves diabetic wound healing mainly through modulating fibroblast behaviors. *Archives of dermatological research*, 312(5), 325-336. <https://doi.org/10.1007/s00403-019-02016-6>
- [19] Davidson, S., Coles, M., Thomas, T., Kollias, G., Ludwig, B., Turley, S., Brenner, M., & Buckley, C. D. (2021). Fibroblasts as immune regulators in infection, inflammation and cancer. *Nature reviews. Immunology*, 21(11), 704-717. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00540-z>
- [20] Putra, A., Alif, I., Hamra, N., Santosa, O., Kustiyah, A. R., Muhar, A. M., & Lukman, K. (2020). MSC-released TGF- β regulate α -SMA expression of myofibroblast during wound healing. *Journal of stem cells & regenerative medicine*, 16(2), 73-79. <https://doi.org/10.46582/jsrm.1602011>