

Шапвалова Е.Ю., Барановский Ю.Г., Харченко С.В.,

Лугин И.А., Демьяненко И.А., Барановский А.Г.

**ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ДЕРМАЛЬНОГО ЭКВИВАЛЕНТА
С ГЕТЕРОФИБРОБЛАСТАМИ МЕНЯЕТ СПЕКТР КОЛЛАГЕНОВЫХ
ВОЛОКОН В ЗАЖИВШЕМ ИШЕМИЗИРОВАННОМ ДЕФЕКТЕ КОЖИ У
МЫШЕЙ**

ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»

Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского»,

Симферополь, Российская Федерация

Рассмотрена возможность эффективного лечения больных с трофическими язвами методом тканевой терапии: трансплантацией дермального эквивалента с гетерофибробластами. Целью работы была оценка морфологического строения и волокнистого каркаса новообразованных рубцов после трансплантации в экспериментальную рану дермального эквивалента с гетерофибробластами. Исследование выполнено на 18 белых половозрелых мышах линии C57/B1 в возрасте до 6-7 месяцев, которые содержались в виварии Медицинской академии имени С.И. Георгиевского. Животные были разделены поровну на контрольную и экспериментальную группу. Выявлено, что на 23-и сутки после моделирования раны в обеих группах присутствует рубец, в котором количественный и качественный состав коллагеновых волокон отличается. В экспериментальной группе в составе рубца преобладают коллагеновые волокна, из коллагена I типа, проявляются морфологические признаки формирования сосочкового и сетчатого слоев, что делает его похожим на неповрежденную кожу. Базальная мембрана эпидермиса более зрелая за счет присутствия нефибриллярного коллагена IV типа.

Ключевые слова: дефект кожи, дермальный эквивалент, фибробласты, коллагеновые волокна.

Shapovalova E. Yu., Baranovskiy Yu. G., Harchenko S. V.,

Lugin I. A., Demyanenko I. A., Baranovskiy A. G.

**DERMAL EQUIVALENT TRANSPLANTATION
WITH HETEROFIBROBLASTS ALTERS THE SPECTRUM OF COLLAGEN
FIBERS IN A HEALED ISCHEMIC SKIN DEFECT IN MICE**

*V.I. Vernadsky Crimean Federal University The Institute “Medical Academy named
after S.I. Georgievsky”, Simferopol, Russian Federation.*

The possibility of effective treatment of patients with trophic ulcers by tissue therapy was considered: transplantation of a dermal equivalent with heterofibroblasts. The aim of the work was to evaluate the morphological structure and fibrous framework of newly formed scars after transplantation into an experimental wound of a dermal equivalent with heterofibroblasts. The study was performed on 18 adult white C57/B1 mice under the age of 6-7 months, which were kept in the vivarium of the Medical Academy named after S.I. Georgievsky. Animals were divided equally into control and experimental groups. It was revealed that on the 23rd day after the modeling of the wound in both groups there is a scar, in which the quantitative and qualitative composition of collagen fibers is different. In the experimental group, the composition of the scar is dominated by collagen fibers, from type I collagen, morphological signs of the formation of the papillary and reticular layers appear, which makes it look

like intact skin. The basement membrane of the epidermis is more mature due to the presence of non-fibrillar type IV collagen.

Key words: skin defect, dermal equivalent, fibroblasts, collagen fibers.

Эффективное лечение больных с трофическими язвamina нижних конечностей, по-прежнему, остается актуальной проблемой ангиологии и хирургии, прежде всего в связи с большой распространенностью данного заболевания, трудностями и длительностью лечения, высокой степенью инвалидизации этой категории пациентов, а, следовательно, в связи с важной медицинской, социальной и экономической значимостью [1]. Согласно статистике, в мире от этой патологии страдает до 2 миллионов человек. Около 70% случаев возникновения язв связано с теми или иными нарушениями в функционировании венозно-сосудистого русла, чаще всего с хронической венозной недостаточностью [2]. Заживление раны представляет собой единый активный динамический процесс, который начинается с момента повреждения и заканчивается восстановлением целостности ткани [3]. При этом восстановительные процессы, хотя и имеют строгую последовательность, могут протекать одновременно и обычно накладываются по времени один на другой [4]. Особенно это выражено при хронических ранах.

Новым этапом биоинженерных технологий в лечении длительно незаживающих кожных дефектов явилось создание и использование «живого эквивалента кожи», который представляет собой коллагеновый гель, содержащий алло- или аутофибробласты [5]. Кожные эквиваленты подразделяются на дермальные, эпидермальные и двойные и в настоящее время используются для лечения глубоких ожогов и хронических язв [6]. Влияние таких биоинженерных конструкций на формирование волокнистого компонента регенерата ишемизированных дефектов кожи остается мало изученным.

Цель работы. Оценить строение, качественный и количественный состав волокнистого каркаса новообразованных рубцов после трансплантации в

экспериментальную первичную ишемизированную хирургическую рану дермального эквивалента с дермальными гетерофибробластами.

Материал и методы. Исследование выполнено на 18 белых половозрелых мышцах линии C57/B1 в возрасте до 6-7 месяцев, которые содержались в виварии Медицинской академии имени С.И. Георгиевского. Животные были разделены поровну на контрольную группу и экспериментальную. Эксперименты проводили со следованием всем принципам гуманности, содержащихся в директиве Европейского Сообщества (86/609/ЕС), и в соответствии с «Правилами выполнения работ с привлечением экспериментальных животных».

Во всех группах операцию по моделированию кожной раны в лопаточной области производили после внутрибрюшинного введения 2,5% раствора авертина в дозе 0,3-0,4 мл. Кожу иссекали в виде круга диаметром 12 мм, к краям раны кожно-фасциальными узловыми швами фиксировалось силиконовое кольцо с наружным диаметром 12 мм атравматичным шовным материалом «Полипропилен» 5-0 для исключения возможности эпителизации раны и закрытия её мобильной кожей области спины.

Из иссеченной кожи мышей контрольной группы выделяли фибробласты в условиях стерильного бокса с ламинарным потоком воздуха. Кусочки кожи после ферментативного удаления эпидермиса помещали в среду DMEM F12 (ПанЭко) и измельчали сосудистыми ножницами до размера 1-2 мм. Затем к кусочкам ткани добавляли равные объемы растворов коллагеназы I типа (200 ед/мл, Sigma) и диспазы (30 ед/мл) (Gibco).

Полученную смесь инкубировали в течение 1 часа при 37⁰ С и постоянном перемешивании. После фильтрации суспензии через фильтр диаметром 0,40мкм и центрифугирования в течение 7 мин. при 1000 об/мин. фибробласты ресуспендировали и культивировали в среде DMEM F12 (Lonsa) с добавлением 10% телячьей сыворотки и 50ед/мл пенициллина - стрептомицина (ПанЭко) в чашках

Петри в инкубаторе при 37⁰С и концентрации CO₂ 5% до достижения 100% конфлюента (рисунок 1).

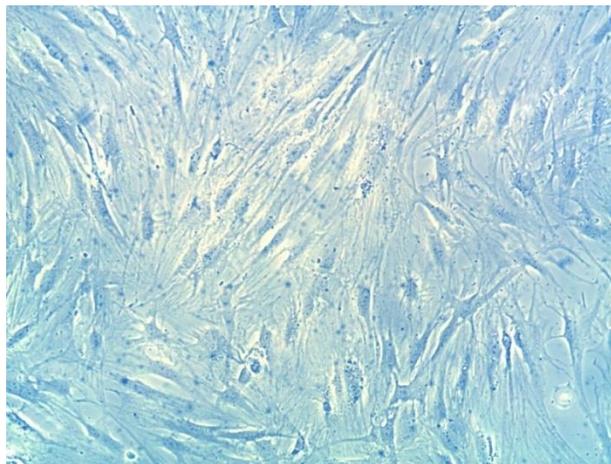


Рис. 1 Дермальные фибробласты на стадии конфлюента. Третий пассаж. Увеличение: ок.10х, об. 20х.

Для пересева клеток использовали 0,25% трипсин-0,02% ЭДТА. Клетки третьего пассажа с фенотипом CD44+CD90+CD105+CD73+CD45+CD31-CD34-CD45- использовали для формирования дермального эквивалента. Дермальный эквивалент готовили на основе коллагена первого типа из крысиных хвостов. Стерильный 0,34М раствор NaOH объединяли с концентрированной (x10) питательной средой 199 в соотношении 1:1. Полученную смесь соединяли с охлажденным раствором коллагена I типа, после чего добавляли суспензию фибробластов в количестве 1,33 млн клеток в питательной среде DMEMF₁₂, содержащей 10% эмбриональной сыворотки (HyClone). Полученную смесь инкубировали при 37⁰С в инкубаторе до полной полимеризации геля [7].

На 23-й день после операции у мышей всех групп образовавшийся рубец иссекали интраоперационно и его фрагмент фиксировали в 10% забуференном формалине для морфологического исследования. Материал заливали в парафин и окрашивали гематоксилином и эозином. Присутствие коллагеновых волокон, состоящих из коллагена I, II и III типов определяли иммуногистохимическим методом. Первичными антителами были поликлональные антитела к коллагену I

(ab 34710), II (ab 34712), III (ab 7778) и IV типов (ab135802) фирмы Abcam (США) в разведении 1:100. Вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, наносили на срезы и инкубировали во влажной камере на протяжении 30 минут. Для визуализации клеток, в которых произошло связывание антител с антигенами, на каждый срез наносили 1-3 капли 3,3-диаминобензидина (DAB Substrate Chromogen) GeneTex Inc (США). Для адекватного представления структуры ткани и ядер клеток срезы докрашивались гематоксилином Майера в течение 3 минут. Было проведено контрольное исследование с целью исключения псевдопозитивных и псевдонегативных результатов.

Морфологическое исследование гистологических препаратов проводились помощью светооптического микроскопа OLIMPUS CX-31 с цифровой камерой OLIMPUS 35050Z. Толщину эпидермиса, количество микрососудов в срезах, площадь коллагеновых волокон и микрососудов в дерме рубцов измеряли спомощью программы "ImageJ". Статистическую обработку цифровых данных проводили с использованием лицензионного программного обеспечения Microsoft Office Excel и Statistica10.0.

Результаты исследования и их обсуждение. У мышей контрольной группы на 23 сутки после операции по созданию модельной раны образовался нежный белый рубец с четкими границами. Силиконовое кольцо отпало на 12-й день послеоперации одновременно с полной эпителизацией раны. На срезах рубца эпидермис представлен неполностью сформированным многослойным плоским частично ороговевающим эпителием, состоящим из 4-х слабо развитых слоев, характерных для тонкой кожи. Зернистый слой имеется только на некоторых участках, роговой слой очень тонкий. Базальная мембрана эпидермиса нечетко визуализируется и не содержит коллагеновые волокна IV типа. Дерма рубца является грануляционной тканью, не образует сосочков вдающихся в эпидермис и граница между эпидермисом и дермой ровная. Грануляционная ткань в этом

возрасте начинает процесс фиброзирования, свойственный третьей стадии раневого процесса, не разделяется на сосочковый и сетчатый слои и состоит в основном из толстых пучков коллагеновых волокон без четкой ориентации по отношению к базальной мембране. Грануляционная ткань образована в основном коллагеновыми волокнами, белок коллаген которых относится к I-му типу. Такие волокна собраны в объемные спиралевидные пучки. В составе этих пучков присутствуют и волокна из коллагена II типа. Малочисленные волокна из коллагена III типа образуют тонкий ретикулум. Соотношение коллагеновых волокон из коллагена I, II и III типов составляет 15 : 8 : 3. Закладки дериватов кожи (желез и волос) отсутствуют.

У мышей экспериментальной группы после трансплантацию в рану дермального эквивалента с гетерофибробластами клетки эпидермиса также образуют четыре слоя, характерные для тонкой кожи: базальный, шиповатый, зернистый и роговой. Все слои полноценно развиты, за исключением очень тонкого рогового слоя, состоящего из 1-2-х рядов уплощенных кератиноцитов. В базальной мембране эпидермиса присутствуют коллагеновые волокна из коллагена IV типа. По периферии раны имеются закладки дериватов кожи –волос. Под эпидермисом в биоптатах залегает зрелая фиброзированная грануляционная ткань третьей стадии раневого процесса. Самые объемные объединения коллагеновых волокон лежат в подэпидермальной области. В глубоких слоях биоптата дермы рубца расположение коллагеновых волокон менее плотное. При иммуногистохимическом окрашивании обнаружено, что соотношение коллагеновых волокон из коллагена I, II и III типов на единице площади среза статистически достоверно больше и составляет 25 : 2 : 1. При этом количество грубых коллагеновых волокон из коллагена IV типа достоверно снижено.

Выводы

1. Трансплантация в модельную экспериментальную ишемизированную рану у мышей дермального эквивалента с дермальными гетерофибробластами

существенно ускоряет заживление раны, изменяет количественный и качественный состав коллагеновых волокон волокнистого компонента сформированного рубца по сравнению с контрольной группой.

2. Рубец богат коллагеновыми волокнами из коллагена I типа, демонстрирует признаки формирования сосочкового и сетчатого слоя, что делает его похожим на неповрежденную кожу.

3. Базальная мембрана эпидермиса после трансплантации дермального эквивалента с дермальными гетерофибробластами функционально более зрелая за счет присутствия нефибриллярного коллагена IV типа.

Литература

1. Гавриленко А.В., Воронов Д. А., Бочков Н. П. Комплексное хирургическое лечение пациентов с хронической ишемией нижних конечностей с использованием генных индукторов ангиогенеза// Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2013. –№2. – С. 25-29.
2. Волков А. М., Чуприна С. В., Петрушина М.Б., Волкова Т.Э. Комплексное лечение трофических язв нижних конечностей у пациентов с сахарным диабетом и вторичной лимфедемой // Альманах Института хирургии им. А.В. Вишневского. – 2018. – №1. – С. 188.
3. Оболенский В.Н. Хроническая рана: обзор современных методов лечения // РМЖ. – 2013 - № 5. – С. 282-289.
4. Оболенский В.Н., Родоман Г. В., Никитин В. Г., Карев М. А. Трофические язвы нижних конечностей – обзор проблемы // РМЖ. – 2009. – Т. 17, № 25. – С. 1647–1662.
5. Vig K., Chaudhari A., Tripathi S., Dixit S., Sahu R., Pillai S., Dennis V.A., Singh S.R. Advances in skin regeneration using tissue engineering. – 2017. - Int. J. Mol. Sci.–V. 18. – P. 789. doi: 10.3390/ijms18040789.
6. Винник Ю.С., Салмина А.Б., Дробушевская А.И., Теплякова О.В., Пожиленкова Е.А., Зыкова Л.Д. Клеточные технологии и тканевая инженерия в лечении длительно не заживающих ран // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2011. – Т. IV, №2. – С. 392 – 397.
7. Юдинцева Н.М., Самусенко И.А., Блинова М.И., Пинаев Г.П. Дермальный эквивалент на основе коллагена и восстановление соединительной ткани в результате его трансплантации на раны экспериментальных животных // Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные исследования и перспективы клинического применения / Под редакцией В.А. Ткачука. – М.: Литтерра, 2019. С. 209-221.