

Г.С. СТАБАЕВА, А.Т. КОСМАГАНБЕТОВА, К.С. БИМЕНОВ, М.З. КАУЛАНБАЕВА
С. ЖАНАХМЕТОВА, С. УСЕНБАЕВА

Казахский Национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова,
кафедра хирургической стоматологии, г. Алматы

**ПРИМЕНЕНИЕ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНОВОЙ
МАТРИЦЫ И КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
РАН В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

УДК 616-001.17-08:615.46:574.6

Целью исследования явилось определение эффективности применения раневых покрытий. Материалы и методы: дизайн исследования: рандомизированные контролируемые клинические исследования на животной модели асептической полнослойной раны. В эксперименте использовали кроликов массой 2,5-3 кг, самцы, в количестве 24 голов. Животные в зависимости от метода были разделены на 4 группы. Результаты исследования показали, что разработанные раневые биопокрытия с культивируемыми фибробластами и мезенхимальными стромальными клетками жировой ткани обладают наиболее выраженным ранозаживляющим и противовоспалительным действием. Таким образом, наиболее перспективным являются раневые покрытия с культивируемыми фибробластами и мезенхимальными стромальными клетками жировой ткани.

Ключевые слова: раны, раневые покрытия, фибробласты, кератиноциты, мезенхимальные стромальные клетки.

Введение.

Проблема лечения ожоговых и хирургических ран остается весьма актуальной для современной комбустиологии и хирургии [1, 2].

Разработка технологии тканевого эквивалента кожи на основе культуры клеток аллогенных или аутологичных фибробластов, кератиноцитов или мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани, иммобилизованных на биополимерном матриксе, является наиболее перспективным направлением при лечении ран различного генеза [3,4]. Биоинженерные заменители кожи не только должны обеспечить быстрое и надежное покрытие кожного дефекта, но и должны быть легко применимы в обычных условиях использования, не вызывая воспаления или отторжения, быть нетоксичными и не иммуногенными [5-8].

Целью данной работы является определение эффективности применения раневых покрытий на основе аллогенных культивируемых фибробластов, кератиноцитов и мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани, иммобилизованных на коллагеновом матриксе для лечения ран.

Материалы и методы.

Для приготовления раневых покрытий использовали следующие материалы: культура клеток фибробластов кролика; культура мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани (ММСК ЖТ) кролика; культура клеток кожи кролика; коллагеновый матрикс (коллаген 1 типа), высушенный в чашках для культивирования клеток; питательная среда Игла MEM (альфа) (Hyclone); Fetal Bovine Serum (Biowest); питательная среда Mesencult (StemCell Technologies Inc); сбалансированный солевой раствор Хенкса.

Дизайн исследования: рандомизированные контролируемые клинические исследования на животной модели асептической полнослойной раны. В эксперименте использовали кроликов массой 2,5-3

кг, самцы, в количестве 24 голов. Животные в зависимости от метода были разделены на 4 группы: группа 1 - лечение с применением коллагеновых покрытий с культивируемыми фибробластами кролика (n=6); группа 2 - лечение с применением коллагеновых покрытий с культивируемыми клетками кожи кролика (n=6); группа 3 - лечение с применением коллагеновых покрытий с культивируемыми клетками жировой ткани (ММСК ЖТ) кролика (n=6); группа 4 - лечение с применением мази левомиколь (контроль, n=6).

Кроликам под обезболиванием на пояснично-крестцовом отделе спины выбривали шерсть диаметром 3 см. После антисептической обработки вырезали кожу диаметром 2см и однократно накладывали раневые покрытия с клетками (испытуемые группы). В контрольной группе применяли мазь Левомиколь 3 раза в день (1г мази содержит активные вещества хлорамфениколь-7,5мг и метилурацил-40мг). На 4, 8 и 12 сутки опыта производили замеры диаметра раны в нескольких точках. На 12 сутки эксперимента животным под местным наркозом удаляли участки с эпителизированной раны в виде треугольника от периферии до центра.

Кусочки ткани фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Далее образцы обезвоживали по стандартной методике в автоматическом тканевом процессоре фирмы Leica TP 1020 и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм нарезали на санном микротоме Leica SM 2000R, окрашивали гематоксилином и эозином. Просматривали полученные препараты на световом микроскопе Leica DM 4000B с цифровой камерой Leica DFC 320.

Результаты исследований.

Площадь раны рассчитывали по формуле: $S = 2\pi r^2$, где S - площадь раневой поверхности; π - 3,14; r- радиус круглой раны (таблица 1).

Таблица 1 - Определение площади раневой поверхности в динамике заживления

Группы животных	Продолжительность наблюдения (сутки)			
	0	4	8	12
1	2	3	4	5
1. РП* с фибробластами	6,28 см ²	3,23±0,26см ²	2,12 ±0,33 см ²	0.60±0,12 см ²
2. РП с кератиноцитами	6,28 см ²	5,30±0,25см ²	4,15±0,22см ²	3,20±0,55см ²
3. РП с ММСК ЖТ	6,28 см ²	3,45±0,20см ²	2,04 ±0,43 см ²	0,65±0,22 см ²
4. Мазь левомиколь (контроль)	6,28 см ²	5,20±0,20см ²	4,10±0,25см ²	2,05±0,23см ²

РП* – раневые покрытия

Как видно из таблицы 1 наилучшие результаты лечения были получены в группах с применением раневых покрытий с культивируемыми фибробластами и ММСК ЖТ. Это видимо, связано с тем, что фибробласты и ММСК синтезируют ростовые факторы, которые способствуют ускоренной регенерации кожи. Худший результат лечения был с применением раневых покрытий с культивируемыми кератиноцитами, что видимо, объясняется отсутствием в покрытии фибробластов, в связи с этим снижением регенеративного потенциала.

Морфологический анализ.

В первой группе животных, где лечение ран проводили с применением коллагеновых покрытий с культивируемыми фибробластами, на гистологических препаратах отмечается покрытие эпидермиса и частичное сращивание поверхностного рогового слоя. Пролиферация клеток базального эпителия идет с формированием акантотических зон, отмечается сохранение придатков кожи, в толще дермы наблюдается пролиферация миофибробластов (рисунок 1).

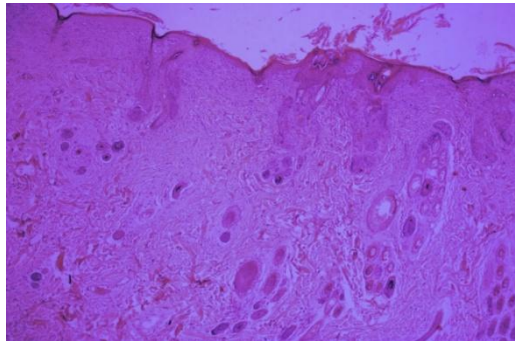


Рисунок 1 - Группа 1. Окраска гематоксилин и эозином, x50

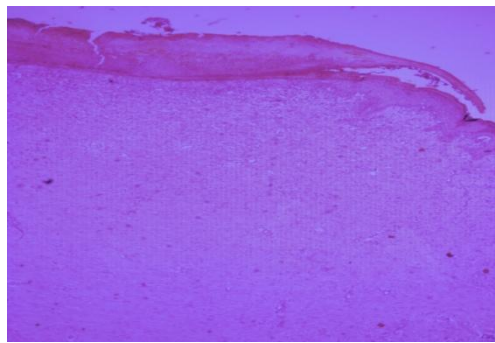


Рисунок 2 - Группа 1. Окраска гематоксилин и эозином, x50

На протяжении $\frac{3}{4}$ части поверхности раны определяется коллагеновое покрытие с фибробластами человека. Покрытие представлено пленкой розового цвета, микроскопический состав определить не представляется возможным. Под пленкой определяется нижняя часть эпидермиса, в виде шиповатого и базального слоев эпидермиса. Под базальным слоем на всем протяжении определяется дерма в виде сосочковой и сетчатой зоны с мелкой капиллярной сетью, особенно выраженной в сосочковой зоне, и умеренной воспалительной инфильтрацией. На протяжении $\frac{1}{4}$ поверхности обнаруживается эпидермис с сохранными слоями: базальным, зернистым и шиповатым. Под эпидермисом в дерме выявляется множество новообразованных сосудов (рисунок 2).

Во второй группе экспериментальных животных лечение ран проводили с применением коллагеновых покрытий с культивируемыми клетками кожи человека. На гистологических препаратах в одних участках обнаруживаются атрофированные зоны эпидермиса, чередующиеся с участками пролиферации базального слоя и формированием акантотических выростов вглубь дермы (рисунок 3). У других животных с поверхности кожи на протяжении $\frac{1}{4}$ обнаруживается покрытие в виде плотной розовой пленки, под которой определяется собственно кожа в виде дермы. Она представлена мышечными элементами, соединительно-тканными волокнами и небольшим количеством мелких сосудов. На протяжении $\frac{3}{4}$ коллагеновое покрытие с культивируемыми клетками кожи человека оторвано от ткани кожи и между кожным покровом и пленкой

обнаруживаются поврежденный эпидермис, клетки воспалительного инфильтрата и нити фибрина розового цвета. На поверхности кожи также обнаруживаются поврежденные слои нижней части

эпидермиса и «как бы» обнаженная собственно кожа. Кожа представлена собственно кожей (дермой), соединительно-тканными волокнами и мелкой сосудистой сетью и фиброзной ткани (рисунок 4).

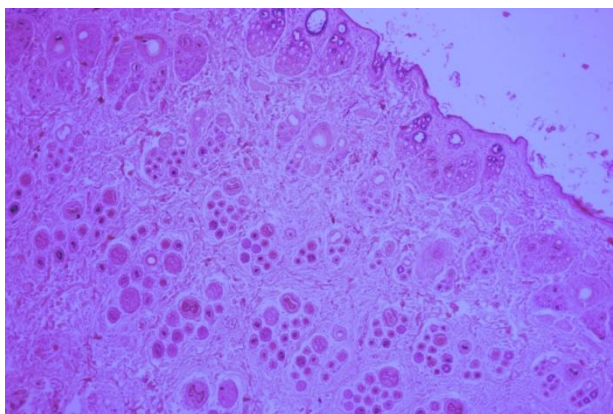


Рисунок 3 - Группа 2. Окраска гематоксилин и эозином, x100

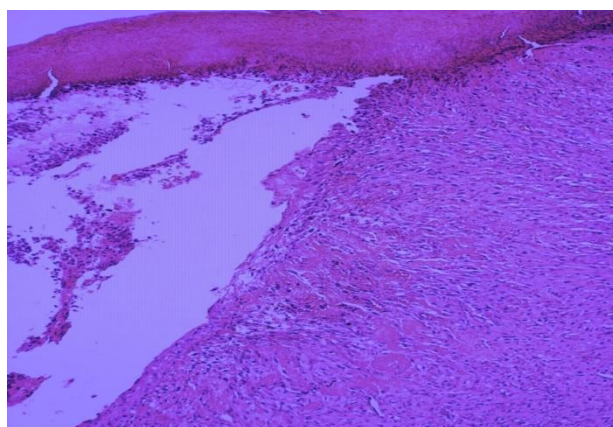


Рисунок 4 - Группа 2. Окраска гематоксилин и эозином, x100

В третьей группе животных, где лечение ран проводили с применением коллагеновых покрытий с ММСК ЖТ эпидермис представлен в виде рогового, блестящего, зернистого, шиповатого и базального слоев и собственно кожа в виде сосочкового и сетчатого слоев. В ткани кожи отмечается чередование истончения зон эпидермиса с участками выраженной пролиферации клеток базального слоя

с формированием акантотических выростов и внедрением их в ткань дермы. В толще эпидермиса видны единичные новообразованные сосуды и единичные кисты (рисунок 5). В дерме множество новообразованных сосудов с молодой соединительной тканью (грануляционная ткань) (рисунок 6).

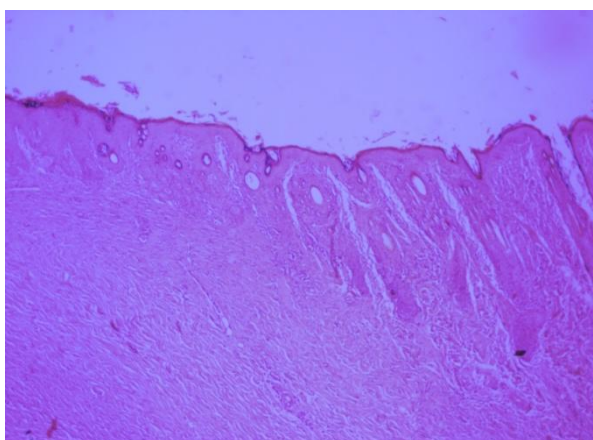


Рисунок 5 - Группа 3. Окраска гематоксилин и эозином, x50

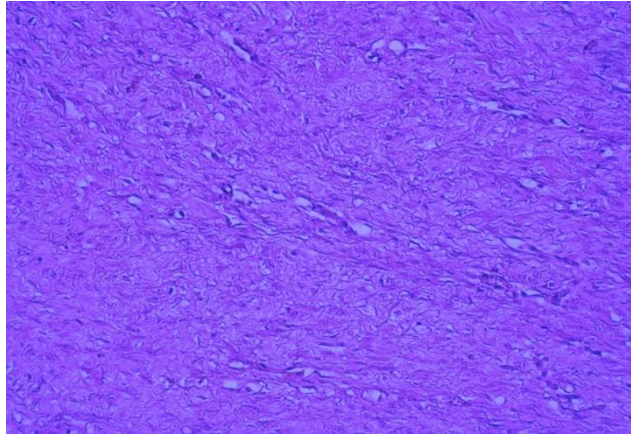


Рисунок 6 - Группа 3. Окраска гематоксилин и эозином, x200

В четвертой контрольной группе животных лечение ран проводили с применением мази левомиколь. На поверхности эпидермиса отмечаются незначительные участки рогового слоя с зонами отторжения. Определяется пролиферация базального слоя, в толще эпидермиса обнаруживаются новообразованные сосуды. В толще дермы определяются придатки кожи и воспалительная

инфильтрация вокруг сосудов и по ходу соединительной ткани (рисунок 7). Встречаются также в данной группе зоны повреждения эпидермиса в виде бесструктурных масс розового цвета и частичного отслоения эпидермиса, под ним в толще дермы воспалительная инфильтрация (рисунок 8).

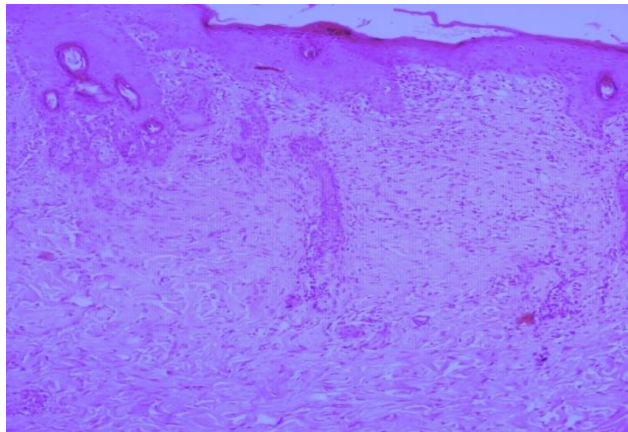


Рисунок 7 - Группа 4. Окраска гематоксилин и эозином, x100

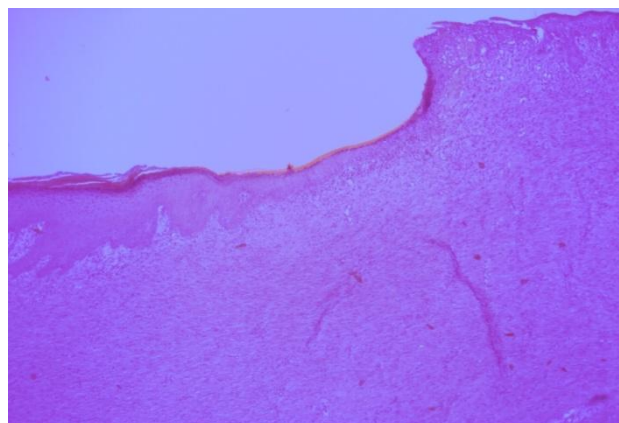


Рисунок 8 - Группа 4. Окраска гематоксилин и эозином, x50

Обсуждение.

Как видно из морфологического описания гистологических препаратов наилучшие результаты лечения были получены во второй и четвертой группы экспериментальных животных с применением раневых покрытий на основе культивируемых фибробластов и ММСК ЖТ кролика. Это объясняется высоким регенеративным

потенциалом фибробластов и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Таким образом, наиболее перспективным для лечения ран является применение раневых покрытий с культивируемыми фибробластами. Выделение и культивирование данных клеток технологически несложно и не так дорого как выделение и культивирование кератиноцитов и ММСК, так как не

требуются дорогостоящие питательные среды и саплимнты.

Выводы.

1. Наилучшие результаты наблюдаются у экспериментальных животных первой и четвертой группы, где проводили лечение с применением коллагеновых покрытий с культивируемыми фибробластами и мезенхимальными стромальными клетками жировой ткани (ММСК ПЖК).

2. Наиболее перспективным для лечения ран является применение раневых покрытий с культивируемыми фибробластами, как наиболее дешевый и технологически выполнимый вариант

Таким образом, преимуществами применения разработанного раневого биопокрытия являются: создание надежного контролируемого барьера, препятствующего инфицированию раневой поверхности; создание оптимальной микросреды для регенерации раны; способность рассасываться по мере заживления тканей; отсутствие или короткий болевой период; менее выраженный послеоперационный отек; сокращение сроков заживления ран; предупреждение развития воспалительных осложнений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 ВОЗ. Шестьдесят пятая сессия. 26 апреля 2012 г. ВОЗ. Ожоги. Информационный бюллетень №365. Май 2012г. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/ru/index.html>
- 2 Шаповалов С.Г. Современные раневые покрытия в комбустиологии // ФАРМиндекс-Практик. – 2011. - № 8. – С.38-46.
- 3 Dieckmann C, Renner R, Milkova L, Simon JC. Regenerative medicine in dermatology: biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond // Experimental Dermatology. – 2010. - № 19. – С. 697–706.
- 4 Fa-Ming Chen, Yi-Min Zhao, Yan Jin, Songtao Shi. Prospects for translational regenerative medicine // Biotechnology Advances. - 2012. - № 30. – С. 658-672.
- 5 Clark RA, Ghosh K, Tonnesen M G. Tissue engineering for cutaneous wounds // J Invest Dermatol. – 2007. - № 127. – С.1018–1029.
- 6 Ikada Y. Challenges in tissue engineering. // J R Soc Interface. – 2006. - № 3. – С. 589–601.
- 7 Metcalfe A D, Ferguson M W. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration // J R Soc Interface. – 2007. - № 4. – С.413–437.
- 8 Nolte S.V., Xu W, Rennekampff H.O., Rodemann H.P. Diversity of fibroblasts - a review on implications for skin tissue engineering // Cells Tissues Organs. – 2008. - 187(3). – С. 165-176.

**Г.С. СТАБАЕВА, А.Т. КОСМАГАНБЕТОВА, К.С. БИМЕНОВ, М.З. КАУЛАНБАЕВА,
С. ЖАНАХМЕТОВА, С. УСЕНБАЕВА**

*С.Ж. Асфендияров атындағы Қазақ Ұлттық медицина университеті,
хирургиялық стоматология кафедрасы, Алматы қ.*

ЭКСПЕРИМЕНТ КЕЗІНДЕ ЖАРА ЕМДЕУ ҮШІН КОЛЛАГЕНДІ МАТРИЦА ЖӘНЕ БЕЙІМДЕЛГЕН ТІНДЕР НЕГІЗІНДЕГІ ЖАРА ЖАБЫНҚЫЛЫРЫН ҚОЛДАНУ

Түйін: Мақсаты: жараларды емдеу үшін коллаген матрицасында иммобилизденген май тіндердің аллогенді қопсытылған фибробластарды, кератиноциттерді және мезенхимальді стромалді жасушалар негізіндегі жара жабындардың тиімділігін анықтау.

Материалдар мен әдістер: зерттеу дизайны: асептикалық жараларды жануарлар моделінде рандомизирленген бақыланатын клиникалық зерттеулер. Экспериментте салмағы 2,5-3 кг ер қояндар, 24 мөлшеде қолданылды. Жануарлар әдіс түріне қарай төрт топқа бөлінді. Нәтижелер көрсетті, жобаланған майлы тіндердің жаралық биожабындылармен қопсатылған фибробластар және мезенхимальді стромальді жасушалар жараны жазу және қабынуға қарсы әсерлерімен ие болады. Сонымен, қопсытылған фибробластар және мезенхимальді стромалді жасушалар негізіндегі жаралық биожабындылар ең перспективті боп дәлелденді.

Түйінді сөздер: толық қабатты жара, жаралық жабынды, фибробластар, кератиноциттер, мезенхимальді стромальді жасушалар.

G.S. STABAEVA, A.T. KOSMAGANBETOVA, K.S. BIMENOV, M.Z. KAULANBAEVA,
S. USENBAEVA, S. ZHANAHMETOVA

*Asfendiyarov Kazakh National medical university,
Department of surgical stomatology, Almaty c.*

APPLICATION OF WOUND COVERINGS BASED ON THE COLLAGEN MATRIX AND THE CULTURED CELLS TO TREAT WOUNDS IN THE EXPERIMENT

Resume: The aim of the study was to defining the effectiveness of wound surface usage on the base of allogeneic and autologous fibroblast's culture, keratinocytes or mesenchymal stromal cells of adipose tissue, which are immobilized on the biopolymer matrix.

Materials and methods: design of the usage: random controlled trials on the aseptic full-thickened layer wound of animal model. 24 rabbits with 2,5-3 kg were used in the experiment. Animals were divided into 4 groups. The results showed that established wound biosurfaces with cultivated fibroblasts and mesenchymal stromal cells of adipose tissue have the most expressed wound healing and anti-inflammatory action. Thus, the most promising are wound coverage with cultured fibroblasts and mesenchymal stromal cells of adipose tissue.

Keywords: wounds, wound dressings, fibroblasts, keratinocytes, mesenchymal stromal cells.