УДК 616.5-089-74

КЛЕТОЧНО-ТКАНЕВЫЕ КОМПЛЕКСЫ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОЖНОГО ПОКРОВА

Кулакова К.В., Бугров С.Н., Алейник Д.Я., Чарыкова И.Н., Сидорова Т.И., Стручков А.А.

ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Н. Новгород, e-mail: kulakova-k@yandex.ru

Цель представленного исследования – создание биологически активных клеточно-тканевых комплексов на основе разработанного базового модуля для замещения раневых дефектов кожи и оценка их свойств и эффективности в эксперименте. Исследованы физико-механические свойства предложенных материалов. Выбран наиболее прочный образец, проведена оценка его цитотоксичности. Эффективность разработанных клеточно-тканевых комплексов оценивалась в эксперименте на животных (крысах) на модели скальпированной раны. В эксперименте in vitro на культуре дермальных фибробластов человека и мультипотентных мезенхимных стволовых клеток жировой ткани продемонстрировано отсутствие цитотоксичности разработанного материала. Прочностные характеристики позволили сделать вывод о пригодности материала для создания на его основе клеточно-тканевого комплекса и экспериментальных исследований in vivo. В эксперименте на крысах показано, что материал способствует созреванию грануляционной ткани, более ранней и выраженной краевой эпителизации в пограничных участках дефектов. Планиметрическое исследование показало, что в случае совместного применения коллагенового материала с культурой клеток наблюдается тенденция более быстрого сокращения размеров дефекта. Таким образом, применение клеточно-тканевого комплекса более эффективно, по сравнению с применением пленочного покровного материала аналогичного состава без клеток. Полученные результаты подтвердили возможность разработки на основе базового модуля комбинированных клеточно-тканевых комплексов и способов их применения для замещения дефектов кожи различного происхождения.

Ключевые слова: тканевая инженерия, клеточная культура, коллаген, регенерация, мезенхимные стволовые клетки, фибробласты

CELLULAR AND TISSUE COMPLEXES FOR ELIMINATION OF SKIN DEFECTS

Kulakova K.V., Bugrov S.N., Aleyinik D.Y., Charykova I.N., Sidorova T.I., Struchkov A.A.

Nizhny Novgorod Research Institute of Traumatology and Orthopedics of Public Health Ministry of Russian Federation, N. Novgorod, e-mail: kulakova-k@yandex.ru

The purpose of this study is creation of biologically active cellular and tissue-based systems on the base of the previously developed module for replacement of skin wound defects and evaluation of their properties and effectiveness in the experiment. The physical and mechanical properties of the created materials were researched. The most robust sample was chosen and its cytotoxicity was evaluated. The experiment to evaluate the efficacy of cell-tissue complexes was performed on rats on a model scalped wound. In vitro experiments confirmed that the developed material is not toxic to the culture of dermal fibroblasts and human multipotent mesenchymal stem cells. Strength characteristics led to the conclusion about the suitability of the material for the creation on its base of a cell-tissue complex and experimental studies in vivo. The experiment on rats showed that the material promotes maturation of granulation tissue, earlier and more pronounced boundary epithelization in the border areas of defects. Planimetric study demonstrated that when the collagen material is applied together with the cell culture there is a tendency for faster size reduction of the defect. Thus, the use of cell-tissue complex is more efficient compared with a film coating material of similar composition without cells. These results confirmed that it is possible to develop combined cellular and tissue systems based on the basic module, and work out the methods of using them for substitution of skin defects of different origin.

Keywords: tissue engineering, cell culture, collagen, regeneration, mesenchymal stem cells, fibroblasts

Последствия травматического повреждения тканей организма человека являются значимой медико-социальной и экономической проблемой. Одним из наиболее разрабатываемых направлений тканевой инженерии является использование клеточно-тканевых эквивалентов для лечения повреждений кожи, в том числе включение в их состав мезенхимных стволовых клеток (МСК) [1-4]. В ряде исследований показана способность МСК различного происхождения оптимизировать условия для заживления ран [5, 6]. В клинических испытаниях [7] продемонстрирована способность МСК, иммобилизованных внутри искуственной коллагеновой матрицы, ускорять заживление повреждений кожи.

К настоящему времени нами разработана гетерогенная матрица на основе нейтрального коллагена [Патент РФ 2456810. 27.07.2012], способная адсорбировать широкий спектр биологически активных веществ. Запатентованный коллективом авторов материал представляет собой двухслойную мембрану, состоящую из коллагенового и полисахаридного компо-

нентов [Патент РФ 2136318. 10.09.1999]. В основу создания материала положен следующий принцип: базовый модуль может модифицироваться в зависимости от технологических условий его изготовления и дополняться компонентами, актуальными в конкретной клинической ситуации. Коллагеновый слой покрытия может быть импрегнирован мелкодисперсным деминерализованным костным матриксом – ДКМ, содержащим комплекс тканевых факторов роста, которые оказывают влияние на пролиферацию и дифференцировку клеток. Дегидратированный материал представляет собой раневое покрытие, выполненное с учетом современных требований и способное оптимизировать раневой процесс и значительно сокращать сроки эпителизации ран кожи [8, 9].

Цель представленного исследования – создание биологически активных клеточно-тканевых комплексов на основе разработанного базового модуля для замещения раневых дефектов кожи и оценка их свойств и эффективности в эксперименте.

Материалы и методы исследования

Физико-механические свойства разработанных пленочных материалов были исследованы на разрывной машине марки Zwick 5 (Германия) на базе кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. Для исследования выбраны следующие образцы разработанных материалов.

Образец № 1. Покрытие раневое коллагеново-полисахаридное с ДКМ, представляющее собой двуслойную мембрану с пограничным положением частиц (материал I поколения). Образцы № 2 и № 3. Коллагеново-полисахаридные матрицы для клеток с ДКМ и гентамицином (материалы II поколения), отличающиеся профилем поверхности, толщиной и эластичностью. Образец № 4. Подложка для клеток коллагеново-полисахаридная с ДКМ повышенной прочности (материал III поколения). Прочностные характеристики и свойства при растяжении разработанных материалов на основе коллагеновых комплексов оценивались в сравнении с контролем – коллагеновой пленкой Биокол.

После исследования физико-механических свойств разработанных материалов для дальнейшей работы был выбран наиболее прочный образец и проведена оценка его цитотоксичности. В качестве тестовой культуры использованы 3 штамма диплоидных фибробластов человека 4-6 пассажа (культура стерильна, микоплазмами и вирусами не контаминирована, исходная концентрация $2x10^5$ кл/мл, контрольные точки после пересева 48, 72, 96 часов) и 3 штамма МСК (исходная концентрация $2x10^5$ кл/мл). Состояние культуры оценивали визуально с помощью инвертированного микроскопа Leica (DM IL), оснащенного компьютерной программой контроля роста культуры (Leica IM 1000).

Эксперимент in vivo был выполнен на крысах линии Wistar, средней массой тела 230 г, наркоз – «Золетил» (15 мг/кг) и «Ксила» (5 мг/кг). Животным на предварительно освобожденную от шерсти среднюю треть спины наносили скальпированную круглую рану площадью 2% поверхности тела. У животных контрольной группы раневые дефекты не укрывались (заживление под естественным струпом), у животных двух опытных групп – укрывались разработанным коллагеновым плёночным материалом. У животных второй опытной группы в область дефекта кожи были введены инъекционно 1 мл МСК в PBS – по 0,2 мл в 4 точки по периметру раны и 0,2 мл непосредственно под раневое покрытие. МСК получали из бедренных костей костного мозга крысы [10] после эвтаназии под наркозом («Золетил» и «Ксила»). Экспериментальных животных рассаживали в клетки по 1 особи с целью предупреждения взаимного травмирования и повреждения зон дефекта. Животных содержали в стандартных условиях вивария; все манипуляции проводили в соответствии с приказом Минздравсоцразвития РФ № 708н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики». Выведение крыс из эксперимента производили через 3, 6, 12 суток после нанесения раны. На этих сроках проводили визуальную оценку состояния ран, планиметрические исследования, фотодокументирование. После выведения животных из эксперимента и предварительной фиксации материала в растворе нейтрального формалина заготавливались образцы ткани для гистологического исследования. Стандартную гистологическую проводку осуществляли на аппарате «Excelsior ES» (Thermo Scientific). После проводки изготавливали парафиновые блоки с использованием заливочной станции «HistoStar» (Thermo Scientific). Серийные срезы толщиной 4-6 микрон получали на микротоме «Microm HM 325» (Thermo Scientific), окрашивали гематоксилином и эозином и заключали в монтирующую среду.

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе исследования были изучены прочностные характеристики и свойства при растяжении различных вариантов синтезированных пленок. Полученные средние значения разрушающего напряжения и величины относительной деформации при разрыве, рассчитанные по результатам 10 измерений, приведены в таблице. Результаты экспериментов показали, что образец № 4 – разработанная подложка для клеток коллагеновая повышенной прочности с измененным профилем поверхности – обладает высокой механической прочностью при разрыве по сравнению с ранее синтезированными образцами и более чем в 2,8 раз превосходит соответствующий показатель образца промышленного материала «Биокол». Однако пласто-эластические свойства данного материала в 2 раза ниже, чем у материала «Биокол».

Далее на первом этапе исследования проведен ряд экспериментов in vitro по оценке жизнеспособности фибробластов и МСК в условиях культивирования на подложке из разработанного коллагенсодержащего материала (тестирование в системе

in vitro на цитотоксичность и адгезивную способность). Исследования показали отсутствие выраженной гибели клеток на пленках-подложках в процессе наблюдения за ростом культуры в течение 96 часов, а также отсутствие клеточного дебриса в среде. Таким образом, на первом этапе в эксперименте in vitro было подтверждено, что разработанный материал не является токсичным для культуры дермальных фибробластов человека и мультипотентных мезенхимных стволовых клеток. Прочностные характеристики позволили сделать вывод о пригодности материала для создания на его основе клеточно-тканевого комплекса и проведения экспериментальных исследований in vivo.

воспалительной инфильтрацией с примесью значительного количества нейтрофильных сегментоядерных лейкоцитов и гнойных телец. В центральной части дефекта происходило начальное и незначительное по протяженности формирование молодой грануляционной ткани. Через 12 суток в контроле фиксировалась слабовыраженная эпителизация по периферии раны, а также широкий слой грануляционной ткани с большим количеством сосудов капиллярного типа и хаотично расположенными фибробластами.

В первой опытной группе на 3 сутки эксперимента между поверхностью ран и пленочными покрытиями наблюдали прослойку, образованную скоплениями нейтрофильных сегментоядерных лейкоцитов.

Физико-механические свойства различных пленочных материалов при растяжении

№ образца	Название материала	Напряжение при разрыве, мПа	Деформация при разрыве, %
1	Покрытие раневое двухслойное коллагеново-полисахаридное с ДКМ (материал I поколения)	22.52	2.71
2	Коллагеново-полисахаридная матрица для клеток с ДКМ и гентамицином (материал II поколения)	18.41	6.42
3	Коллагеново-полисахаридная матрица для клеток с ДКМ и гентамицином (материал II поколения, повышенная прочность)	26.85	3.25
4	Подложка для клеток коллагеново-полисахаридная с ДКМ повышенной прочности (материал III поколения)	34.30	2.80
5	Биокол	11.94	6.69

На втором этапе исследования была проведена оценка ранозаживляющих свойств разработанного материала следующего формата: базовый модуль (полисахаридно-коллагеновая матрица повышенной прочности), импрегнированный ДКМ, с введением культуры МСК. Оценка результатов проводилась планиметрически и гистологически на примере изменений, происходящих в области краев раны, со стороны её дна и непосредственно в зоне дефекта, которую оценивали по характеру клеточных элементов, степени выраженности воспалительной реакции, наличию некрозов, степени зрелости грануляционной ткани.

Визуальная оценка показала, что образцы коллагеновых материалов удовлетворительно прилегали к поверхности ран без дополнительной фиксации и без необходимости замены на всем протяжении эксперимента (до 12 суток) и обеспечивали достаточную защиту от внешних загрязнений. Результаты гисто-морфологического анализа показали, что через 3 суток после травмы в контроле (заживление под естественным струпом) в области раневого дефекта имелись обширные участки некрозов с выраженной

Во второй опытной группе на 3 сутки к покрытию плотно прилежали фибробластоподобные клеточные элементы, образующие местами несколько рядов клеток. Уже на этом сроке грануляционная ткань характеризовалась зональностью строения с более выраженной зрелостью в верхних слоях и менее выраженной – в глубоких слоях.

В первой опытной группе на 12 сутки в зоне дефекта присутствовала сформированная зрелая грануляционная ткань с наличием большого количества фибробластов и коллагеновых волокон, приобретающих параллельную ориентацию. Вновь образованная эпителиальная выстилка более протяженная, чем в контроле.

Во второй опытной группе на 12 сутки эксперимента в зоне дефекта имелась зрелая грануляционная ткань со значительным количеством коллагеновых волокон, большая часть из которых располагалась параллельно поверхности раны, с преобладанием клеток фиброцитарного ряда. Протяженная эпителиальная выстилка покрывала зрелую грануляционную ткань.

Оценка результатов планиметрического исследования показала, что применение

покровных материалов способствует сокращению размеров дефектов уже с 3 суток эксперимента. При сравнении двух опытных групп между собой отмечено, что в случае совместного применения коллагенового материала с культурой клеток (выбранный способ применения клеточно-тканевого комплекса), начиная с 6 суток эксперимента, наблюдалась тенденция более быстрого сокращения размеров дефекта, по сравнению с опытной группой, в которой использовалось только раневое покрытие.

Заключение

Разработанный нами коллагенсодержащий дегидратированный пленочный материал не является токсичным для культуры дермальных фибробластов человека и мультипотентных мезенхимных стволовых клеток. Оценка его прочностных характеристик подтвердила пригодность материала для создания на его основе клеточно-тканевого комплекса для проведения экспериментальных исследований in vivo. В эксперименте на животных показано, что разработанный коллагенсодержащий клеточно-тканевой комплекс способствует более раннему созреванию грануляционной ткани, более ранней и более выраженной краевой эпителизации в пограничных участках дефекта. Разработанный материал хорошо моделируется на экспериментальных ранах, точно повторяет особенности рельефа дефектов кожи, его прозрачность достаточна для оценки течения раневого процесса без удаления его с поверхности. Применение клеточно-тканевого комплекса более эффективно, по сравнению с применением пленочного покровного материала аналогичного состава без клеток. Исходя из предварительных результатов целесообразно продолжить дальнейшее совершенствование биологически активных коллагеновых комплексов, а также экспериментальные и клинические исследования различных способов их применения и эффективности. Полученные результаты подтвердили возможность разработки на основе базового модуля комбинированных клеточно-тканевых комплексов и способов их применения для замещения дефектов кожи различного происхождения.

Авторы выражают благодарность Апрятиной Кристине Викторовне – аспиранту кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского за проведение эксперимента по оценке физико-механических свойств созданных материалов.

Список литературы

1. Shahrokhi S., Arno A., Jeschke M.G. The use of dermal substitutes in burn surgery: acute phase // Wound Repair. Regen. – 2014. – Vol. 22, № 1. – P. 14–22.

2. Han S.K., Yoon T.H., Lee D.G., et al. Potential of human bone marrow stromal cells to accelerate wound healing in vitro // Ann. Plast. Surg. – 2005. – Vol. 55, № 14. – P. 414–419.

3. Liu P., Deng Z., Han S. et al. Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds // Artif. Organs. – 2008. Vol. 32, № 12. – P. 925–931.

4. Laverdet B., Micallefa L., Lebretonb C. et al. Use of mesenchymal stem cells for cutaneous repair and skin substitute elaboration // Pathologie Biologie. – 2014. – Vol. 62. – P. 108–117.

5. Lu D., Chen B., Liang Z. et al. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with one marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial // Diabetes Res. Clin. Pract. – 2011. – Vol. 92, № 1. – P. 26–36.

6. Fong C.Y., Tam K., Cheyyatraivendran S. et al. Human umbilical cord Wharton's jelly stem cells and its conditioned medium enhance healing of excisional and diabetic wounds // J. Cell Biochem. – 2014. – № 115. – P. 290–302.

7. Yoshikawa T., Mitsuno H., Nonaka I. et al. Wound therapy by marrow mesenchymal cell transplantation // Plast. Reconstr. Surg. – 2008. – № 121. – P. 860–77.

8. Стручков А.А., Анфимов П.Е., Кулакова К.В. и соавт. Применение раневого покрытия «Биотекст» для местного лечения ожогов // Вопросы травматологии и ортопедии. – 2012. – № 2. – С. 16–7.

9. Кулакова К.В., Бугров С.Н., Алейник Д.Я. и соавт. Результаты применения разрабатываемых биологически активных материалов на основе коллагена для замещения тканевых дефектов в эксперименте // Технологии живых систем. – 2013. – Т. 10, №8. – С. 59–64.

10. Javazon E.H., Colter D.C., Schwartz E.J. et al. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells // Stem Cells. – 2001. – Vol. 19, № 3. – P. 219–25.