

Морфологическая оценка влияния коллагеновой повязки на заживление ожоговых ран IIIa степени

Е.Г. Колокольчикова, М.В. Сычевский, Е.А. Жиркова, С.В. Смирнов, В.С. Бочарова
НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва

Контакты: Елена Георгиевна Колокольчикова, kolokol_eg@mail.ru

Цель исследования — морфологическое (гистологическое) изучение влияния разработанной коллагеновой повязки на заживление ожоговой раны IIIa степени.

Материалы и методы. Исследованы биоптаты ран 19 больных с ожогами IIIa степени (от 10 до 60% поверхности тела, средний возраст — 50 лет), для лечения которых использовали биологическую повязку на основе коллагена типа I. Контролем служили раны тех же больных, которые лечили с помощью повязок с мазью левомеколь. Проведено гистологическое исследование заживления ожоговых ран IIIa степени при использовании в 1–2-е сутки после травмы биологической повязки на основе коллагена типа I, обогащенной тромбоцитарным фактором роста (PDGF-BB).

Результаты. Эпителизация ожоговых ран при использовании коллагеновой повязки наблюдалась на 7–9-е сутки. В контроле при благоприятном течении раневого процесса — на 20–22-е сутки.

Выводы. Применение биологической повязки на основе коллагена типа I, обогащенной PDGF-BB, в 1–2-е сутки после травмы значительно ускоряет процесс заживления ожоговых ран IIIa степени. Вероятно, стимулирующий эффект повязки в первую очередь связан с тем, что на ранней стадии раневого процесса экзогенный коллаген повязки создает условия, необходимые для закрепления и движения клеток (как кератиноцитов, так и фибробластов).

Ключевые слова: межклеточный матрикс, стволовая клетка, ожоги, коллагеновая повязка, морфология

Morphological evaluation of the effect of collagen bandage on grade IIIa burn wound healing

E.G. Kolokolchikova, M.V. Sychevsky, E.A. Zhirkova, S.V. Smirnov, V.S. Bocharova
N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Care, Moscow

Objective: to conduct a morphological (histological) study of the effect of a designed collagen bandage on grade IIIa burn wound healing.

Materials and methods. Wound biopsy specimens taken from 19 patients (mean age 50 years) with grade IIIa burns (10 to 60% of the body surface) were examined. A type I collagen-based biological bandage was used for their treatment. The wounds of the patients who were treated with a levomecol ointment-containing bandage served as a control. The healing of Grade IIIa burn wounds, by applying a type I collagen-based platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB)-enriched biological bandage, was histologically studied.

Results. Burn wound epithelialization was observed on days 7 to 9 when the collagen-based bandage was applied. It was seen in the controls on days 20–22 if the course of the wound process was favorable.

Conclusion. The application of the type I collagen-type PDGF-BB biological bandage on days 1–2 after injury considerably accelerated grade IIIa burn wound healing processes. The stimulating effect of the bandage is likely to be associated mainly with the fact that in the early stage of the wound healing process, exogenous collagen of the bandage creates the conditions that are necessary for the fixation and movement of cells (both keratinocytes and fibroblasts).

Key words: intercellular matrix, stem cell, burns, collagen-based bandage, morphology

Введение

Клеточная трансплантология бесспорно считается одним из важнейших направлений развития будущей регенеративной медицины. В отличие от органной трансплантологии, не меняя поврежденного органа, клеточные технологии позволяют «обновлять» его клеточный состав. В настоящее время развитие клеточных технологий связывают главным образом со стволовыми клетками (СК). Применение СК основано на их способности дифференцироваться в клетки различных типов в зависимости от микроокружения. Подходы к использованию СК в клинической практике усиленно разрабатываются во всем мире [1–4]. Однако, несмотря на

колоссальный прорыв в изучении СК в последние десятилетия, остается нерешенным целый ряд вопросов, что делает весьма проблематичным их применение сегодня. Прежде всего это осуществление контролируемой направленной дифференцировки СК и исключение опасности их использования за счет возможной малигнизации. В силу этих причин внимание ученых в настоящее время в значительной степени сосредоточено на поиске тех стимулов, которые бы могли активизировать собственные взрослые СК, содержащиеся во многих органах и тканях организма [4, 5]. Это так называемые резидентные СК, имеющие свою тканевую нишу. Поведение СК определяется окружением (нишей) и внутренними

программами [6]. Понимание механизмов, которые регулируют пролиферацию взрослых СК, ставится сегодня главной целью регенеративной медицины [7].

Значительная роль в организации ниши взрослых СК принадлежит межклеточному матриксу (МКМ) [8]. Благодаря накоплению многочисленных экспериментальных данных к настоящему времени установлено, что МКМ не только субстрат для закрепления клеток, он контролирует такие важнейшие функции клеток, как пролиферация, дифференцировка, миграция, апоптоз [9–12]. Важнейшие компоненты внеклеточного матрикса — это коллаген, фибронектин, ламинин, протеогликаны, различные растворимые соединения, а также такие биологически активные вещества, как ростовые факторы, цитокины и хемокины. Как неотъемлемая составляющая часть кожи МКМ играет одну из ключевых ролей в ее регенерации. Изучение роли компонентов МКМ в процессе заживления ран кожи важно не только для того, чтобы влиять на этот процесс, но имеет большое значение для изучения биологии регенерации органов вообще и разработки трансплантационных подходов в регенеративной медицине, так как кожа служит для этого прекрасной моделью [7].

В дерме кожи среди фибриллярных коллагенов, продуцируемых фибробластами, самым распространенным является коллаген типа I [12]. Сразу после ранения коллаген инициирует движение фибробластов в рану из окружающей дермы, которое усиливается тромбоцитарным фактором роста (PDGF-BB) [10, 12]. Прямая аппликация PDGF-BB на кожные раны ускоряет процесс их заживления [10].

Показано, что экзогенный коллаген также оказывает влияние на функциональную активность фибробластов, стимулирует регенерацию соединительной ткани [13, 14]. Его использование в биологических покрытиях хорошо себя зарекомендовало [13, 15]. В НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского для лечения ожоговых ран IIIa степени была разработана биологическая повязка на основе коллагена типа I, обогащенная PDGF-BB [16].

Цель исследования — морфологическое (гистологическое) изучение влияния разработанной коллагеновой повязки на заживление ожоговой раны IIIa степени.

Материалы и методы

Исследованы биоптаты ран 19 больных с ожогами IIIa степени (от 10 до 60% поверхности тела, средний возраст 50 лет), для лечения которых использовали биологическую повязку на основе коллагена типа I. Контролем служили раны тех же больных, которые лечили с помощью повязок с мазью левомеколь. Повязку с коллагеном накладывали на обожженную поверхность пострадавших в 1–2-е сутки после травмы.

Взятие материала для гистологического исследования производилось во время перевязок: на 2–3, 5–7, 9–22-е сутки после ожога. Ткань раны фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, срезы

окрашивали гематоксилином и эозином по методу Ван Гизона.

Разработанная биологическая повязка (патент на изобретение РФ №2314129, 2007 г.) состоит из тонкого слоя коллагеновой губки (1 мм), полученного методом лиофилизации 1–2% раствора коллагена человека после его нанесения на перфорированную подложку из кремнеорганической пленки — карбосил-П [16]. Коллаген типа I выделяли по методу Abedin и Riemschneider [17]. Микроскопия в проходящем свете показала фибриллярное строение коллагена в повязке (рис. 1а). Перед наложением повязки на рану ее пропитывали сывороткой крови донора с фенотипом АВ(IV), Rh-Kell, которая служила источником тромбоцитарного фактора роста (PDGF-BB) [10].

Результаты

В 1–2-е сутки после травмы ожог IIIa степени характеризуется отсутствием эпидермиса, отеком и деструктивными изменениями дермы (рис. 1б). Заметная лейкоцитарная инфильтрация и разрушение сосочкового слоя дермы сопровождаются выраженным в различной степени разрушением клеток, сосудов в сетчатом слое, денатурацией коллагенового матрикса. Однако при ожоге IIIa степени сохраняются отдельные придатки кожи (волосяные фолликулы, сальные и потовые железы), некоторые сосуды и фибробласты.

Уже на 3–5-е сутки (в зависимости от состояния пациента) после наложения разработанной повязки на поверхность раны образовывался тонкий эпителиальный покров, состоящий из 2–3 слоев клеток — неэпителий (рис. 1в, д). При этом в дерме (особенно на 3 сут) отмечено большое количество сосудов с активной клеточной реакцией вокруг них. Фибробласты составляли значительную часть клеток, окружающих сосуды. Наблюдалась выраженная пролиферация эпителиальных клеток волосяных фолликулов (рис. 1е) и потовых желез (рис. 1е), что свидетельствовало об инициации процесса заживления, так как придатки кожи содержат стволовые эпителиальные клетки [18]. В контрольных ранах на этих сроках эпителий отсутствовал, была отмечена лейкоцитарная инфильтрация дермы и тромбоз сосудов (рис. 1з).

Через 7–9 сут после наложения коллагеновой повязки ожоговая рана IIIa степени полностью эпителизировалась. Через 7 сут в многослойном новообразованном эпителии обнаруживали все слои, кроме рогового, формирование которого отмечено через 9 сут (рис. 2а, 2б). Следует отметить некоторую дезорганизацию клеток в эпителиальных слоях. Дерма представляла собой молодую соединительную ткань с довольно большим числом клеток, преимущественно фибробластов, сосудов и рыхло расположенных коллагеновых волокон. Морфологически аналогичная рана в контроле через 7 сут не имела эпителиального покрова, сохраняла деструктивные изменения дермы и отек. Вместе с тем в дерме была отмечена активная пролиферация эпителиальных клеток потовых желез.

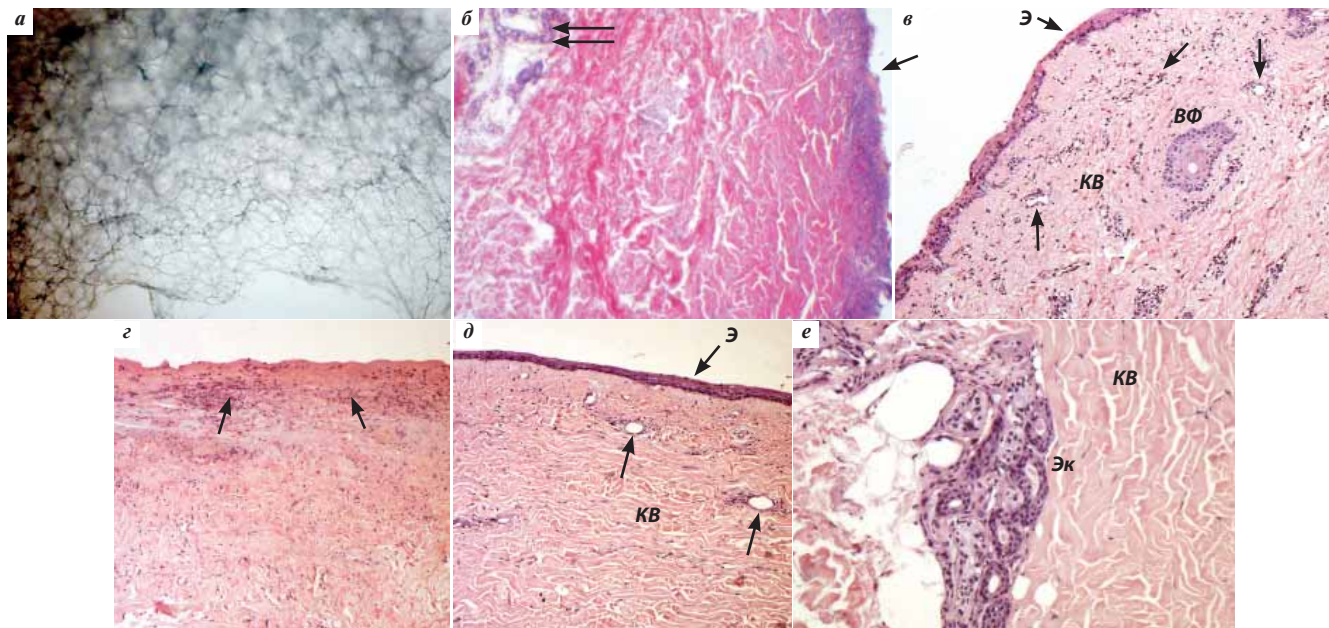


Рис. 1. Коллагеновая повязка и заживление ожоговых ран IIIa степени после ее применения. Везде (кроме а) — окраска гематоксилином и эозином:
 а — фибриллярное строение коллагена в повязке. Съемка в проходящем свете, $\times 10$;
 б — ожоговая рана IIIa степени. Отсутствие эпидермиса. Лейкоцитарная инфильтрация и разрушение сосочкового слоя дермы (стрелка), отек, денатурация коллагенового матрикса в сетчатом слое. В глубине дермы сохранились потовые железы (двойная стрелка), $\times 10$;
 в — ожоговая рана IIIa степени больного Т. через 3 сут после наложения коллагеновой повязки. На поверхности раны — тонкий эпителиальный покров (Э). Дерма имеет однородное строение: среди рыхлых коллагеновых волокон (КВ) расположено большое количество сосудов (стрелки) с активной клеточной реакцией вокруг них. Проплиферация эпителия в волосяном фолликуле (ВФ), $\times 10$;
 г — контрольная рана того же больного в это же время. Отсутствие эпидермиса, лейкоцитарная инфильтрация дермы и тромбоз сосудов (стрелки), $\times 10$;
 д — ожоговая рана IIIa степени больного В. через 5 сут после наложения коллагеновой повязки. Тонкий эпителиальный покров (Э) закрывает рану. В сосочковом слое дермы (стрелки) — сосуды с активной клеточной реакцией вокруг них. Рыхлое расположение коллагеновых волокон в сетчатом слое (КВ), $\times 10$;
 е — та же рана. В глубине дермы — активная пролиферация эпителиальных клеток (ЭК) потовых желез. КВ — коллагеновые волокна, $\times 20$.

Раны при лечении мазевыми повязками закрывались эпителием, как правило, на 20–22-е сутки. При этом нередко рану покрывал довольно тонкий эпителиальный пласт, местами прорастая под струп (рис. 2в). Отчетливо была видна его неполноценность: отсутствовала послойная дифференцировка, клетки разной формы и величины редко и хаотично располагались в несколько слоев (рис. 2г). В дерме сохранялись деструктивные изменения и выраженная очаговая лейкоцитарная инфильтрация (рис. 2в).

Таким образом, эпителизация ожоговых ран при использовании коллагеновой повязки наблюдалась на 7–9-е сутки. В контроле при благоприятном течении раневого процесса — на 20–22-е сутки.

Физическое состояние коллагена оказывает существенное влияние на поведение клеток [9, 19]. Денатурированный коллагеновый матрикс ожоговой раны не обеспечивает условия, необходимые для закрепления и движения клеток на ранней стадии раневого процесса. Экзогенный коллаген повязки, по-видимому, способствует миграции сохранившихся кератиноцитов на краях раны, а также инициирует движение фибробластов из неповрежденных участков дермы. PDGF-BB усиливает движение фибробластов и способствует их пролиферации [11, 12].

Существенный вклад в стимуляцию эпителия вносят придатки кожи, содержащие СК. Ранее в радиоавтографическом исследовании мы показали, что на 2-е сутки после применения повязки активируются пролиферативные процессы в эпителиальных клетках волосяных фолликулов и потовых желез [16]. В данном исследовании нами также отмечена выраженная пролиферация эпителиальных клеток в этих придатках кожи.

Важнейшая роль в процессе регенерации дермы принадлежит клеткам стенки микрососудов. Помимо осуществления обменных процессов, микрососуды в ткани являются центрами клеточной пролиферации и дифференцировки [20]. Клетки стенки микрососудов (эндотелиоциты и перициты) — основные источники новых клеточных элементов ткани, в частности фибробластов, так как установлено, что стенка микрососудов служит нишей для резидентных СК ткани, обеспечивающих ее регенерацию [21, 22]. Наше исследование показало, что количество микрососудов резко возрастало в дерме на 3-и сутки после применения коллагеновой повязки. Доказано также, что микрососуды поставляют в рану кожи костномозговые СК, необходимые для восстановления дермы [23].

Большое значение в выраженном эффекте повязки мы придаем ее применению в ранние сроки (1–2-е сутки)

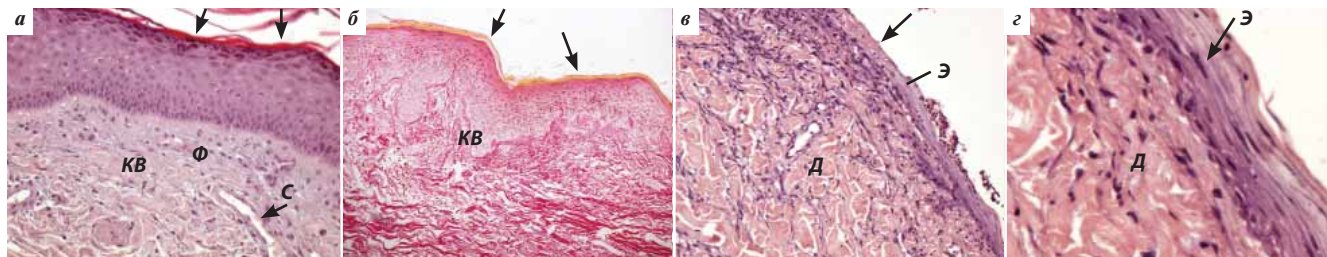


Рис. 2. Заживление ожоговых ран IIIа степени. Везде (кроме б) — окраска гематоксилином и эозином: а — через 7 сут после наложения биологической повязки у больного А. в многослойном эпителии присутствуют все слои, кроме рогового. На поверхности кожи — отторгающийся струп (стрелки). Дерма (Д) — молодая соединительная ткань со множеством клеток, преимущественно фибробластов (Ф), сосудами нормального строения (С) и collagenовыми волокнами (КВ), $\times 20$; б — через 9 сут после применения collagenовой повязки у больного Т. характерное желтое окрашивание кератина рогового слоя эпидермиса (стрелки). Четко выделяются 2 слоя дермы по архитектонике collagenовых волокон (КВ). Образуются дермальные сосочки. Окраска по Ван-Гизону, $\times 10$; в — заживление ожоговой раны IIIа степени у больного В. при лечении мазевыми повязками на 21-е сутки. Довольно тонкий эпителиальный пласт (Э) закрывает рану, прорастая под струп (стрелка). В дерме (Д) сохраняются деструктивные изменения, выражена очаговая лейкоцитарная инфильтрация, $\times 20$; г — при большем увеличении видна неполноценность этого эпителия (Э). Отсутствует его послойная дифференцировка: клетки разной формы и величины редко и хаотично располагаются в несколько слоев. Д — дерма, $\times 60$.

после ожога. В этот период мобилизуются все резервные возможности организма, в частности, отмечается высокая биологическая активность веществ (цитокины, ростовые факторы), содержащихся в раневом экссудате [24].

Заключение

Применение биологической повязки на основе коллагена типа I, обогащенной PDGF-BB, в 1–2-е сутки после травмы значительно ускоряет процесс заживления ожоговых ран IIIа степени (7–9-е сутки против 20–22 в контроле). Стимулирующий эффект повязки может быть обусловлен следующими основными механизмами:

- Экзогенный коллаген повязки на ранней стадии раневого процесса создает условия, необходимые для закрепления и движения клеток (как кератиноцитов, так и фибробластов). PDGF-BB усиливает движение фибробластов и способствует их пролиферации.
- Активируются пролиферативные процессы в эпителии придатков кожи, содержащих СК.
- Резко возрастает количество микрососудов и усиливается клеточная реакция вокруг них, что имеет первостепенное значение в процессе регенерации дермы, так как клетки стенки микрососудов (эндотелиоциты и перициты) содержат стволовые и/или прогениторные клетки.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- Hassan H.T., El-Sheemy M. Adult bone-marrow stem cells and their potential in medicine. J R Soc Med 2004;97:465–71.
- Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng 2001;7:211–28.
- Shi Ch., Zhu Y., Su Y. et al. Stem cells and their applications in skin-cell therapy. Trends in Biotechnology 2006;24:48–52.
- Papathanasopoulos A., Giannoudis P. V. Biological considerations of mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells. Injury 2008;39(Suppl 2):21–32.
- Blau H.M. The evolving concept of a stem cell: entity or function? Cell 2001;105:829–41.
- Yin T., Li L. The stem cell niches in bone. J Clin Investigation 2006;116:1195–201.
- Yu B.D., Mukhopadhyay A., Wong C. Skin and hair: models for exploring organ regeneration. Hum Mol Genet 2008;17:R54–9.
- Greco V., Guo S. Compartmentalized organization: a common and required feature of stem cell niches? Development 2010;137:1586–94.
- Schor S.L., Court J. Different mechanisms in the attachment of cells to native and denatured collagen. J Cell Sci 1979;38:267–81.
- Li W., Chen M., Guan S. et al. Mechanism of human dermal fibroblast migration driven by type I collagen and platelet-derived growth factor-BB. Mol Biol Cell 2004;15:294–309.
- Somasundaram R., Schuppan D. Type I, II, III, IV, V, and VI collagen serve as extracellular ligands for the isoforms of platelet-derived growth factor (AA, BB, and AB). J Biol Chem 1996;271:26884–90.
- Xu J., Clark R.A.F. Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. J Cell Biol 1996;132:239–49.
- Хилькин А.М., Шехтер А.Б., Истранов Л.П. и др. Коллаген и его применение в медицине. М., 1976; с. 228.
- Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология). М., 1981; 312 с.
- Белозерская Г.Г., Макаров В.А., Абоянц Р.К. и др. Аппликационное средство гемостаза при капиллярно-паренхиматозном кровотечении. Хирургия 2004;9:55–9.
- Ермолов А.С., Смирнов С.В., Хватов В.Б. и др. Биологическая повязка для лечения ожоговых ран IIIа степени. Хирургия 2008;10:4–9.
- Abedin M.Z., Riemschneider R. Collagens heterogeneity and its functional significance. Die Angewandte Makromolekulare Chemie 1983;11:107–22.
- Alonso L., Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. PNAS 2003;100(Suppl 1):11830–5.
- Mercier I., Lechaire J.P., Desmouliere A. et al. Interactions of human skin fibroblasts with monomeric or fibrillar collagens induce different organization of the cytoskeleton. Exp Cell Res 1996;225:245–56.
- Колокольчикова Е.Г., Пальцын А.А., Щеголев А.И. и др. О пролиферативной активности адипоцитов в опухолях жировой ткани. Клет технол в биол и мед 2005;3:140–5.
- Shen Q., Wang Y., Kovay E. et al. Adult SVZ stem cells lie in vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. Cell Stem Cell 2008;3:289–300.
- Corselli M., Chen Ch., Crisan M. et al. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010;30:1104–9.
- Ярыгин К.Н. Роль резидентных и циркулирующих стволовых клеток в физиологической и репаративной регенерации. Пат физиол и экспер терапия 2008;1:2–8.
- Воронкина И.В., Калмыкова Н.В., Пинаев Г.П. и др. Изменение биологической активности ожогового экссудата человека в ходе заживления ожога. Цитология 2004;361–75.