

И.С. ИВАНОВ, С.В. ИВАНОВ, Г.Н. ГОРЯИНОВА,
А.В. ИВАНОВ, Д.В. ТАРАБРИН

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ С ЦЕЛЬЮ УЛУЧШЕНИЯ СВОЙСТВ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет»,
Российская Федерация

Цель. Изучить влияния места введения экзогенных эмбриональных фибробластов относительно стороны эндопротеза на динамику коллагенового обмена.

Материал и методы. Эксперимент выполнен на 150 мышах. Стерильный протез из политетрафторэтилена (ПТФЭ) располагали над апоневрозом. Животные были разделены на 3 группы (по 50 животных): 1 группа – без введения фибробластов; 2 группа – однократное введение фибробластов на 7 сутки; 3 группа – двукратное введение фибробластов на 7 и 10 сутки. Культивированные фибробласты получали из эмбрионов белых мышей. Экзогенные фибробласты вводились в паратрансплантатную зону только со стороны протеза, обращенной к коже и подкожной клетчатке. Животные выводились из эксперимента на 10, 30 и 60 сутки. Срезы окрашивали по Sirius Red.

Результаты. Выявлено, что на ранних сроках, введение фибробластов и кратность введения не влияют на соотношение типов коллагена в зависимости от пространственной ориентации протеза. В дальнейшем отмечается достоверное увеличение содержания коллагена I типа. Введение экзогенных фибробластов ускоряет увеличение соотношения I и III типов коллагена, в большей степени при двукратном введении. На 30-х и 60 сутках эксперимента отмечены достоверные различия в соотношении I и III типов коллагена, увеличение содержания коллагена I типа отмечается на стороне протеза обращенной к коже. Депонирование экзогенных фибробластов благодаря структуре ПТФЭ материала и их последующее участие в коллагеновом обмене, является решающим положительным фактором в процессе образования соединительно-тканной капсулы и превалирования коллагена I типа на поздних сроках эксперимента.

Заключение. Применение экзогенных эмбриональных фибробластов оказывает достоверный модифицирующий эффект на динамику образования коллагена I типа на стороне введения.

Ключевые слова: фибробласт, коллаген, поляризационная микроскопия, эндопротезы

Objectives. To study the impact of the site of the ectogenous embryonic fibroblasts introduction in regard to endoprosthesis on the collagen metabolism dynamics.

Methods. The experiment was conducted on 150 mice. The sterile polytetrafluoroethylene prosthesis was placed above the aponeurosis. The animals were divided into 3 groups numbering 50 animals: the 1st group – without fibroblasts introduction; the 2nd – a single introduction of fibroblasts on the 7th day; the 3rd group – the fibroblasts were injected twice on the 7th and 10th days. Cultivated fibroblasts were obtained from the embryos of white mice. Ectogenous fibroblasts were injected in the paratransplant zone only on the side of prosthesis inverted to the skin and subcutaneous tissue. Animals were derived from the experiment on the 10th, 30th and 60th days. The sections were stained with Sirius Red.

Results. It has been revealed that at early terms the introduction of fibroblasts and repetition factor of the introduction don't influence the collagen types correlation depending on the spatial orientation of the prosthesis. Further a reliable increase of the collagen type I is registered. Introduction of the ectogenous fibroblasts accelerates the increase of collagen correlation of I and III types more in the case of repeated introduction. On the 30th and 60th days of the experiment reliable differences in the collagen correlation of I and III types have been registered and the increase of the collagen type I content has been observed on the side of prosthesis inverted to the skin. Deposition of the ectogenous fibroblasts due to the structure of the polytetrafluoroethylene prosthesis material and their further participation in the collagen metabolism is considered to be a critical factor in the process of connective tissue capsule formation and prevalence of the collagen type I at the late terms of the experiment.

Conclusions. The application of the ectogenous fibroblasts has a reliable modifying effect on the dynamics of the collagen type I formation on the introduction side.

Keywords: fibroblast, collagen, polarized microscopy, endoprotheses

Novosti Khirurgii. 2012; Vol 20 (4): 3-8

Experimental using of cellular technologies to improve the properties of connective tissue

I.S. Ivanov, S.V. Ivanov, G.N. Goryainova, A.V. Ivanov, D.V. Tarabrin

Введение

Хирургическое лечение грыж передней брюшной стенки заставляет хирургов искать

пути для получения более прочного рубца, способного предотвратить рецидив заболевания. Имплантация синтетического протеза, на данный момент является исключительной

технологией, позволяющей надежно ликвидировать дефект. [1, 2, 3, 4]. Однако присутствие эндопротеза может приводить к развитию специфических реакций на инородное тело, из-за чего возникают экссудативные образования, ухудшающие и удлиняющие процесс развития соединительной ткани.

Не подлежит сомнению главенствующая роль нарушения коллагенового обмена в развитии послеоперационных вентральных грыж (ПОВГ) и в проблемах формирования зрелой соединительной ткани. По данным ряда авторов, именно нарушение коллагенового обмена считается основной причиной возникновения абдоминальных грыж [5, 6, 7, 8, 9]. Можно добиться ускорения созревания соединительной ткани в области пластики при использовании ряда клеточных технологий, в том числе введения клеточных элементов превалирующих в ее образовании – фибробластов. Фибробласты оказывают стимулирующее влияние на пролиферацию клеток соединительной ткани реципиента, модифицируя ее структуру [10, 11]. Использование эмбриональных фибробластов представляет несомненный интерес при эндопротезировании ПОВГ, для улучшения процесса организации соединительной ткани в зоне пластики.

Исследование коллагенового обмена возможно с использованием моноклональных антител или при использовании специальной окраски и поляризационного микроскопа. Последний метод более простой в применении и менее затратен.

Целью исследования является изучение влияния места введения экзогенных фибробластов относительно стороны эндопротеза на динамику коллагенового обмена.

Материал и методы

Эксперимент выполнялся на 150 мышах. Стерильный протез (0,5×0,5 см) располагали над апоневрозом. Использовали участки стандартного протеза из политетрафторэтилена (ПТФЭ). Животные были разделены на 3 группы (по 50 животных в каждой группе):

1 группа – без введения фибробластов;

2 группа – однократное введение фибробластов на 7 сутки;

3 группа – двукратное введение фибробластов на 7 и 10 сутки.

Культивированные фибробласты получали из эмбрионов белых мышей (на сроке беременности 2-4 недели) в лаборатории отделения клеточной трансплантации и иммунологии Курской областной клинической боль-

ницы. Экзогенные фибробласты вводились в стерильных условиях в паратрансплантатную зону со стороны протеза, обращенной к коже и подкожной клетчатке.

Животные выводились из эксперимента на 10, 30 и 60 сутки. Исследования проводили с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (г. Страсбург, Франция).

Получаемые ткани с частью протеза заключали в парафиновые блоки, и по стандартной методике окрашивали по Sirius Red. Исследования проводились в обычном и поляризованном свете при помощи поляризационного микроскопа Altami Polar 2. Фотосъемку производили цифровой окулярной камерой Altami 3 Мрх. Выполнялось фотографирование 10 «полей зрения» при увеличении ×250 и ×400. ×630. Оценка соотношения типов коллагена (ТК) основывалась на изучении цветовой гистограммы, с использованием программного комплекса и ImageJ 1,46h.

Исследование ТК производилось непосредственно в области капсулы эндопротеза или в паратрансплантатном пространстве. Увеличение соотношения ТК означает повышение содержания коллагена I типа и снижение содержания III типа. Исследовались данные, получаемые при исследовании капсулы или паратрансплантатного пространства с обеих сторон протеза (со стороны апоневроза и со стороны кожи).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью встроенных функций ЭВМ приложения Microsoft Excel-2003. Вычислялись средние величины количественных показателей и средней ошибки. Существенность различий средних величин оценивали по коэффициенту Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Эндопротез из ПТФЭ препятствует миграции экзогенных фибробластов и других клеток, вследствие своей оригинальной структуры, напоминающий пленку с отверстиями. Поэтому важным является изучение различий в соотношении ТК в зависимости от использования экзогенных фибробластов в условиях, когда сам протез разделяет место имплантации на две части (таблица 1).

Изучение результатов животных 1 группы не показало достоверных отличий в соотношении ТК в зависимости от стороны эндопротеза. Цветовая гистограмма в группе без введения фибробластов, с обеих сторон протеза

Соотношение и динамика содержания I и III типа коллагена в зоне расположения эндопротеза из ПТФЭ

Срок	Коллаген I тип (М, %)	Коллаген III тип (М, %)	m	Соотношение
1 группа				
10 сут.	50,09	49,91	±0,567	1,01
30 сут.	54,76*	45,24*	±1,414	1,21
60 сут.	61,56*	38,44*	±0,875	1,6
2 группа				
10 сут.	50,19	49,81	±0,659	1
30 сут.	60,06*	39,94*	±0,578	1,5
60 сут.	69,45*	30,55*	±0,697	2,27
3 группа				
10 сут.	50,66	49,34	±0,412	1,02
30 сут.	61,64*	38,36*	±0,53	1,6
60 сут.	71,48*	28,52*	±0,488	2,5

Примечание: * $p \leq 0,01$ (при сравнении между материалами на одном сроке)

демонстрирует одинаковые результаты.

Во 2 и 3 группе на сроке 10 суток, введение культуральных фибробластов и даже кратность этого введения достоверно не влияют на соотношение ТК, в том числе и при учете ориентации стороны протеза к апоневрозу или коже. Соотношение ТК на 10 сутки эксперимента не отличается во всех сериях и стремится к 1. По нашему мнению, отсутствие эффекта от введения фибробластов объясняется малым временем. Культуральные фибробласты за столь короткое время «не успели» модифицировать процесс организации соединительной ткани.

В 1 группе нет достоверных отличий в соотношении ТК в зависимости от сторон эндопротеза и на более поздних сроках исследования. Применение культуральных фибробластов на ранних сроках не влияют на соотношение ТК относительно стороны эндопротеза. Двукратное введение на сроке 10 сут. также не

меняет соотношения ТК.

2 группа. При введении фибробластов к 30-м суткам в зависимости от пространственной ориентации сторон протеза отмечены достоверные изменения в соотношении ТК. Имеет место достоверное соотношение ТК в обеих сторонах протеза. Со стороны, обращенной к коже содержание коллагена I типа на 20 % больше, чем содержание III типа (по сравнению со стороной, обращенной к апоневрозу) (таблица 2).

Соотношение ТК к 60 суткам различаются еще существеннее: 1,51 для стороны, прилегающей к апоневрозу передней брюшной стенки и 2,27 со стороны, обращенной к коже. При однократном введении экзогенных фибробластов толщина капсулы на разных сторонах протеза достоверно различается – со стороны, обращенной к апоневрозу она значительно тоньше (рис. 1).

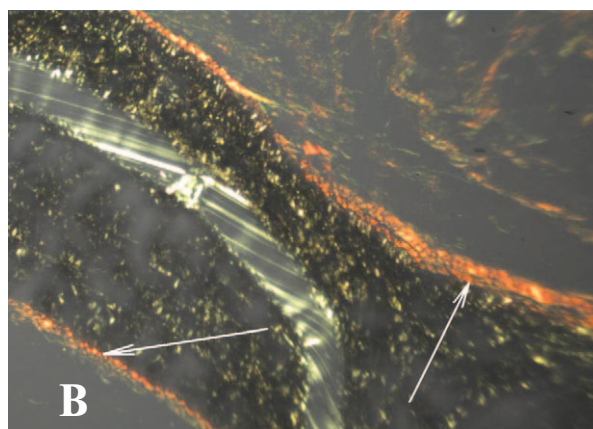
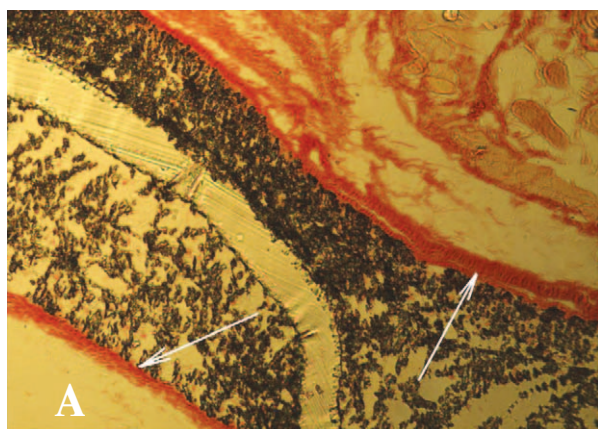


Рис. 1. Гистологическая структура паратрансплантатного пространства, протез ПТФЭ, 2 группа, 30-е сут. А – световая микроскопия. Левый указатель обращен к апоневрозу, правый к подкожной клетчатке. Окраска Sirius Red. Объектив $\times 25$. Окуляр $\times 10$. В – Поляризационная микроскопия. Левый указатель обращен к апоневрозу, правый к подкожной клетчатке. Окраска Sirius Red. Объектив $\times 25$. Окуляр $\times 10$.

Таблица 2

Соотношение и динамика содержания I и III типа коллагена во 2 группе в зависимости от стороны эндопротеза

I тип коллагена (М, %)	III тип коллагена (М, %)
10 суток сторона – кожа	
50,19	49,81
m±0,659	
30 суток сторона-кожа	
60,06	39,93
m±0,578	
60 суток сторона-кожа	
69,45	30,55
m±0,697	
10 суток сторона-апоневроз	
50,23	49,77
m±0,743	
30 суток сторона-апоневроз	
55,46	44,54
m±0,602	
60 суток сторона-апоневроз	
60,17	39,83
m±0,493	

Таблица 3

Соотношение и динамика содержания I и III типа коллагена в 3 группе в зависимости от стороны эндопротеза

I тип коллагена (М, %)	III тип коллагена (М, %)
10 суток сторона – кожа	
50,66	49,34
m ±0,412	
30 суток сторона-кожа	
61,63	38,36
m ± 0,53	
60 суток сторона-кожа	
70,8	29,2
m ±0,488	
10 суток сторона-апоневроз	
49,95	50,05
m ± 0,591	
30 суток сторона-апоневроз	
60,38	39,62
m ± 0,399	
60 суток сторона-апоневроз	
65,33	34,67
m ±0,372	

3 группа. На сроке 10 суток данные анализа цветовой гистограммы указывают на отсутствие достоверных отличий с показателями 1 и 2 групп. Имеет место синхронное увеличение соотношения ТК с обеих сторон материала к 30 суткам эксперимента (таблица 3).

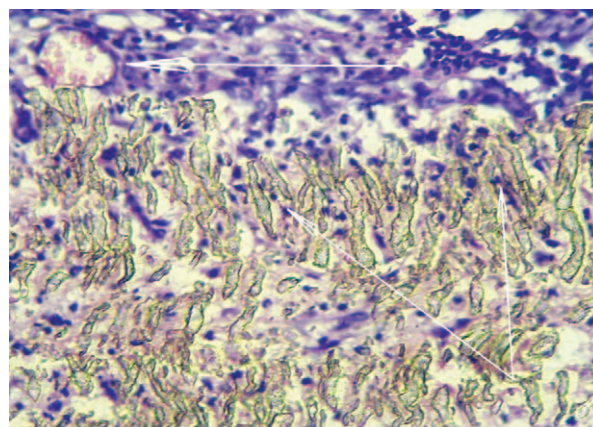
Не выявлено различий при исследовании результатов соотношения ТК в капсуле со стороны апоневроза во 2 и 3 группах животных. Тем временем, в капсуле, обращенной к коже во 2 и 3 сериях эксперимента, определяются достоверные отличия в соотношении ТК. Со стороны кожи соотношения ТК в 3 группе соответствуют результатам животных 2 группы на 60 сутках от момента имплантации. По нашему мнению, это возникает из-за второго, дополнительного введения культуральных фибробластов. Кроме того, структура протеза из ПТФЭ делает возможным депонирование экзогенных эмбриональных фибробластов, что имеет существенное значение на более поздних сроках эксперимента (рис. 2).

Максимальное соотношение ТК с превалированием I типа коллагена отмечается в 3 группе животных на стороне протеза, обращенного к коже к 60-м суткам. Соотношение ТК увеличивается и на стороне, обращенной к апоневрозу, но в отличие от 30 суток 3 группы соотношение ТК достоверно меньше, чем на

стороне, обращенной к коже. Происходит стимулирование синтеза коллагена I типа и возникают условия для образования структурно и механически более прочной соединительной ткани в месте использования клеточных технологий.

Различия в соотношении ТК между сторонами имплантата меньше выражено вблизи от технологических отверстий протеза, пред-

Рис. 2. Гистологическая структура, протез ПТФЭ, 3 группа, 60-е сут. Световая микроскопия, Окраска Sirius Red. Объектив ×63. Окуляр ×10. Верхний указатель – новообразованные сосуды на границе протеза и соединительнотканной капсулы, окруженные большим числом фибробластов. Нижние указатели – депонированные в толще протеза фибробласты.



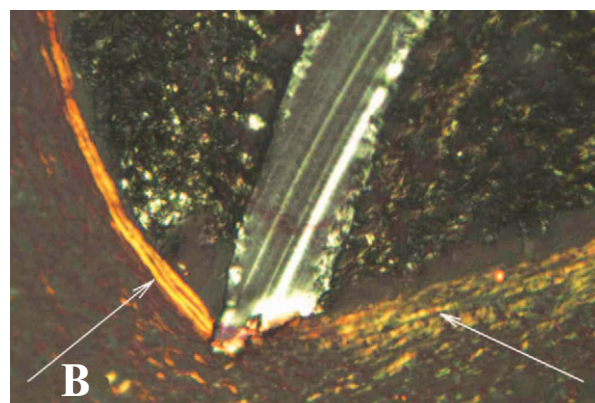
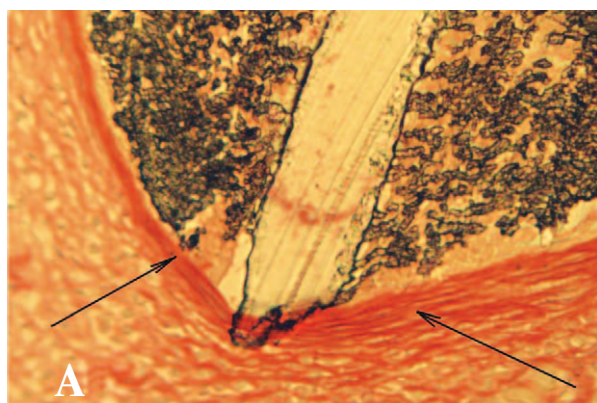


Рис. 3. Гистологическая структура паратрансплантатного пространства, протез ПТФЭ, 3 группа, 30-е сут. А – Световая микроскопия. Левый указатель обращен к подкожной клетчатке, правый к апоневрозу. Окраска Sirius Red. Объектив $\times 25$, Окуляр $\times 10$. В – Поляризационная микроскопия. Левый указатель обращен к подкожной клетчатке, правый к апоневрозу. Окраска Sirius Red. Объектив $\times 25$. Окуляр $\times 10$.

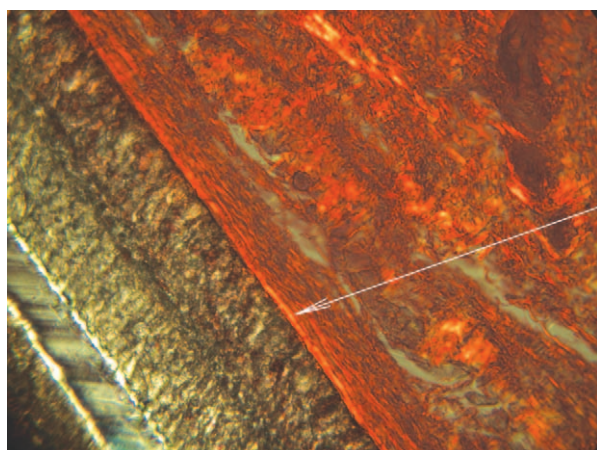
назначенных для формирования швов, из-за предоставляющейся возможности миграции клеток на сторону апоневроза.

Максимальные различия имеют место на краях протеза, что связано с наибольшим механическим взаимодействием краев протеза и формирующейся капсулы (рис. 3).

В 3 группе к 60 суткам на стороне, обращенной к коже, определяется максимальное содержание коллагена I типа в непосредственно контактирующей с поверхностью эндопротеза части капсулы, достигая значения 3 и более (рис. 4).

Максимальное содержание коллагена I типа в парапротезной зоне, со стороны, обращенной к коже, в серии с двукратным введением экзогенных фибробластов указывает на положительный, достоверный и значимый эффект от применения клеточных технологий.

Рис. 4. Гистологическая структура паратрансплантатного пространства, протез ПТФЭ, 3 группа, 60-е сут. Поляризационная микроскопия. Окраска Sirius Red. Объектив $\times 40$. Окуляр $\times 10$. Указатель показывает на участки капсулы с максимальным содержанием коллагена I типа.



Выводы

1. Применение клеточных технологий не дает достоверных изменений в коллагеновом обмене на ранних сроках эксперимента.

2. Введение культуральных фибробластов во 2 и 3 группах на поздних сроках достоверно повышает содержание коллагена I типа.

3. При однократном и двукратном введении отмечено достоверно большее содержание коллагена I типа со стороны введения экзогенных фибробластов – кожи и подкожной клетчатки.

3. Депонирование экзогенных фибробластов благодаря структуре ПТФЭ-материала и их последующее участие в коллагеновом обмене является решающим положительным фактором в процессе образования соединительнотканной капсулы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егиев В. Н. Сравнительная оценка степени фиксации фибробластов на синтетических эндопротезах, используемых для пластики дефектов передней брюшной стенки / В. Н. Егиев // Герниология. – 2006. – № 2. – С. 37–41.
2. Тимошин А. Д. Концепция хирургического лечения послеоперационных грыж передней брюшной стенки / А. Д. Тимошин, А. В. Юрасов, А. Л. Шестаков // Герниология. – 2004. – № 1. – С. 5–10.
3. Ярош А. Л. Исследование биосовместимости хирургических имплантатов нового поколения для пластики передней брюшной стенки. Фундаментальные исследования. – 2011. – № 10. – Ч. 1. – С. 186–189.
4. Ganadha S. Laparoscopic ePTFE mesh repair of incisional and ventral hernias / S. Ganadha [et al.] // ANZ Journal of Surgery. – 2008. – Vol. 78. – Is. 10. – P. 907–913.
5. Ильин Д. А. Модель воздействия полимерного материала на культуру фибробластов / Д. А. Ильин

// Естествознание и гуманизм. – 2006. – Т. 3, № 3. – С. 91–97.

6. Никитин В. Н. Возрастная и эволюционная биохимия коллагеновых структур / В. Н. Никитин. – Киев : Наукова думка, 1977. – 297 с.

7. Decreased collagen type I/III ratio in patients with recurring hernia after implantation of alloplastic prostheses / K. Junge [et al.] // Arch Surg. – 2004. – Vol. 389, N 1. – P. 17–22.

8. Quantitative and qualitative analysis of collagen types in the fascia transversalis of inguinal hernia patients / A. Monteiro [et al.] // Arq Gastroenterol. – 2007. – Vol. 44, N 3. – P. 177–182.

9. Rosch R. A role for the collagen I/III and MMP-1/-13 genes in primary inguinal hernia? / R. Rosch [et al.] // BMC Medical Genetics. – 2002. – N 3. – P. 69–74.

10. Dermal collagen matrices for entral hernia repair: comparative analysis in a rat model / G. Broderick [et al.] // Hernia [Electronic Resource]. – 2011. – Nov.

PMID 22120024

11. Hebda P. A. Transplanted fetal fibroblasts: survival and distribution over time in normal adult dermis compared with autogenic, allogenic, and xenogenic adult fibroblasts / P. A. Hebda, J. E. Dohar // Otolaryngol Head Neck Surg. – 1999. – Vol. 121, N 3. – P. 245–251.

Адрес для корреспонденции

305000, Российская Федерация,
г. Курск, ул. К.Маркса, д. 3,
ГБОУ ВПО «Курский государственный
медицинский университет»,
кафедра хирургических болезней № 1,
тел. раб.: +7 4712 35-36-90,
тел. моб.: +7 904 528-14-28,
e-mail: ivanov.is@mail.ru,
Иванов Илья Сергеевич

Сведения об авторах

Иванов И.С., к.м.н., доцент кафедры хирургических болезней № 1 ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет».

Иванов С.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой хирургических болезней № 1 ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет».

Горяинова Г.Н., к.м.н., доцент кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО «Курский государственный

медицинский университет».

Иванов А.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой гистологии, эмбриологии, цитологии ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет».

Тарабрин Д.В., ординатор кафедры хирургических болезней № 1 ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет».

Поступила 14.05.2012 г.

УВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ!

**Организационный комитет и Белорусская ассоциация хирургов
имеют честь пригласить Вас принять участие в работе
XXVI ПЛЕНУМА ХИРУРГОВ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
И РЕСПУБЛИКАНСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
«АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКОЙ ХИРУРГИИ»,
которые состоятся 27-28 сентября 2012 года в г. Бобруйске.**

Основные программные вопросы:

1. Хирургическая инфекция: проблемы и достижения.
2. Инфекция в абдоминальной хирургии.
3. Инфекция в торакальной хирургии.
4. Инфекция в сосудистой хирургии.
5. Амбулаторно-поликлиническая гнойная хирургия.
6. Инфекция в детской хирургии.
7. Хирургия инфекционных осложнений у пациентов с сахарным диабетом
8. Сепсис и интенсивная терапия тяжелых форм хирургической инфекции.

Адрес оргкомитета: 220096, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Уборевича 73,
УЗ «10-я городская клиническая больница», 1-ая кафедра хирургических болезней БГМУ.
E-mail: bel_surgery@tut.by