

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ПЕРЕСТРОЙКА ВОЛОКНИСТЫХ СТРУКТУР ДЕРМЫ КОЖИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ИМПЛАНТАЦИИ 3D-СКАФФОЛДА НА ОСНОВЕ ПОЛИПРОЛАКТОНА

*Е.С. Мишина¹, М.А. Затолокина¹, Л.М. Ряззева², В.С. Польской², В.В. Цымбалюк¹,
В.О. Неволько¹, И.А. Шматько¹, Е.С. Затолокина¹*

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Курск,

¹кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии,

²кафедра анатомии человека

Аннотация. Использование различных скаффолдов позволяет моделировать будущий волокнистый каркас новообразованного регенерата, а также служит субстратом для заселения клеточного компонента. Развитие тканевой инженерии в регенеративной медицине требует понимания более точных механизмов образования соединительного каркаса на месте дефекта. Целью данного исследования явилось изучение морфофункциональной перестройки волокнистых структур дермы кожи крыс, в ответ на имплантацию 3D-скаффолда на основе полипролактина. Исследование проводили на коже крыс-самцов линии Wistar в разные сроки после имплантации 3D-скаффолда на основе полипролактина. Биоматериал с имплантируемым скаффолдом изучали при помощи сканирующей электронной микроскопии. В результате проведенного исследования было выявлено, что вокруг структур 3D-скаффолда на основе полипролактина определяется активный коллагеногенез. К 14-м суткам визуализируется большое количество циркулярно-направленных коллагеновых волокон, которые являются основой для дальнейшего построения вокруг волокон соединительнотканной капсулы. Сделаны выводы об эффективности применения 3D-скаффолда на основе полипролактина. Данный имплант может быть эффективен для заселения аллогенных культивированных фибробластов и создания на его основе биомедицинских тканеинженерных продуктов.

Ключевые слова: кожа, 3D-скаффолд, регенерация, коллагеновые волокна.

MORPHOFUNCTIONAL REBUILDING OF FIBROUS STRUCTURES OF RAT'S SKIN DERMIS UNDER 3D-SCAFFOLD IMPLANTATION BASED ON POLYPROLACTONE

*E.S. Mishina¹, M.A. Zatokina¹, L.M. Ryzaeva², V. S. Pol'sko², V.V. Tsybalyuk¹,
V.O. Nevolko¹, I.A. Shmatko¹, E.S. Zatokina¹*

FSBEI HE "Kursk State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Kursk,

¹Department of histology, embryology, cytology,

²Department of human anatomy

Abstract. The use of various scaffolds makes it possible to model the future fibrous framework of the newly formed regenerate, and also serves as a substrate for the colonization of the cellular component. The development of tissue engineering in regenerative medicine requires an understanding of more precise mechanisms of the formation of the connective frame at the site of the defect. The aim of this study was to study the morphofunctional rearrangement of the fibrous structures of the dermis of the skin of rats, in response to for the implantation of a 3D-scaffold based on polyprolactone. The study was carried out on the skin of male Wistar rats at different times after implantation of a 3D-scaffold based on polyprolactone. The biomaterial with the implantable scaffold was studied using scanning electron microscopy. As a result of the study, it was revealed that active collagenogenesis is determined around the structures of the 3D-scaffold based on polyprolactone. By the 14th day, a large number of circularly directed collagen fibers are visualized, which are the basis for further building a connective tissue capsule around the fibers. Conclusions are drawn about the effectiveness of using a 3D-scaffold based on polyprolactone. This implant can also be effective for the colonization of allogeneic cultured fibroblasts and the creation of biomedical tissue engineering products on its basis.

Keywords: skin, 3D-scaffold, regeneration, collagen fibers.

В последнее десятилетие появилось большое количество работ, посвященных разработке скаффолдов для замещения дефектов кожи. Это связано, прежде всего, с необходимостью повышения эффективности

лечения ожогов, хронических ран (язва диабетической стопы, нейрогенные язвы и др.), а также реэпителизации больших площадей поврежденного кожного покрова при хирургических операциях.

Создаваемые дермальные скаффолды должны способствовать улучшению показателей заживления (снижению воспалительного ответа, формированию грануляционной ткани, стимуляции ангиогенеза, ускорению эпителизации раны и др.) и уменьшению осложнений [1, 5, 10].

В настоящее время не вызывает сомнения, что эффективность искусственных внеклеточных матриц в стимуляции регенерации тканей связана с обеспечением достаточной временной механической поддержки для формирования нового волокнистого остова [4, 7, 8, 12].

Для оценки перспективности скаффолдов необходимы морфологические исследования тканевой реакции на имплантацию скаффолдов *in vivo* и изучение особенностей формирования коллагенового каркаса [9, 11]. Такие исследования в научной литературе немногочисленны.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение морфофункциональной перестройки волокнистых структур дермы кожи крыс в ответ на имплантацию 3D-скаффолда на основе полипролактина.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент был выполнен на 30 белых крысах-самцах линии Wistar, весом (150 ± 15) г. Объектом исследования стал фрагмент кожи размером $0,5 \times 0,5$ см вместе с имплантируемым 3D-скаффолдом на основе полипролактина, взятый на 3, 7 и 14-е сутки после имплантации. Биоматериал был взят с латеральной поверхности спины путем иссечения кожи указанного размера до фасции подкожной мышцы.

Животные содержались в стандартных условиях экспериментально-биологической клиники ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) (утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ № 51 от 29 августа 2014 г.). Уход и содержание экспериментальных животных проводился в соответствии со стандартами, описанными Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, а также

Правилами, утвержденными Приказом Минздрава России от № 199н 01 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».

Для световой микроскопии материал фиксировали в 10%-м водном растворе нейтрального формалина. Заливку в парафин и микротомирование осуществляли по стандартным прописям. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали по методу Ван Гизон.

Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) кожу фиксировали 10%-м забуференным нейтральным формалином, обезвоживали в замороженном состоянии в спиртах возрастающих концентраций. Подготовленные таким образом образцы монтировали на специальный алюминиевый столик токопроводящим углеродным клеем, напыляли золотом или платино-паладиевым сплавом в напылительной установке Quorum Q150TS (Quorum gala instrument gmbh, Германия) и просматривали в сканирующем электронном микроскопе S 3400N (Hitachi, Япония).

Проводили обработку сканизображений с помощью программы ImageJ, на которых измеряли толщину коллагеновых волокон, окружающих нити полипролактоновой матрицы, в каждом случае в 50 полях зрения.

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программы STATISTICA 12.0, Stat Soft, Inc.

Для каждого показателя и групп наблюдений вычисляли $M [Q_1; Q_3]$. Поскольку признаки имели распределение, отличное от нормального, для проверки статистических гипотез при сравнении числовых данных использовали U-критерий Манна – Уитни. Различия между группами считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования было выявлено, что на 3-и сутки после имплантации 3D-скаффолда на основе полипролактина в дерме происходила дезорганизация волокнистых структур.

При этом на поперечных срезах их форма варьировала от уплощенной до округлой. Между волокон определялись большие межволоконистые промежутки, что может косвенно свидетельствовать о сохранении к данному сроку интерстициального отека.

В поле зрения определялось большое количество как отдельных фибрилл, так и объединенных в волокна (рис. 1).

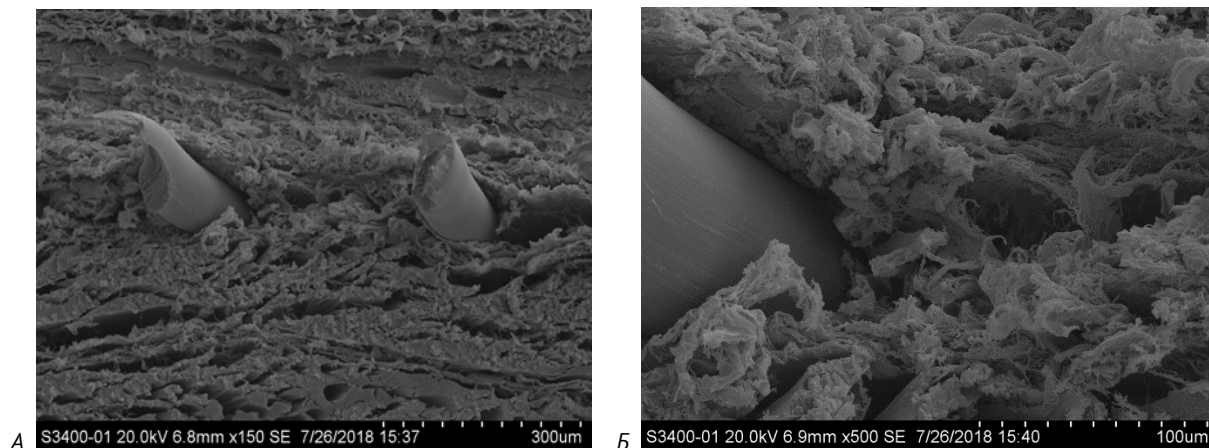


Рис. 1. Микрофотография дермы кожи крысы в месте имплантируемого 3D-скаффолда на основе полипролактона на 3-и сутки эксперимента. СЭМ. А – ув. $\times 150$, Б – ув. $\times 500$

К 7-м суткам в месте имплантации наблюдалась активная клеточная миграция. Клеточный состав преимущественно представлен лимфоцитами, многочисленными макрофагами и единичными клетками фибробластического ряда.

При изучении волокнистого компонента вокруг нитей скаффолда определялись строго ориентированные в одном направлении коллагеновые

волокна, толщина которых составила 0,13 [0,09; 0,16] мкм.

Ориентация коллагеновых структур повторяла форму структур импланта – они располагались как вокруг нитей скаффолда циркулярно, так и параллельно, прорастая между нитями полипролактона.

Данные особенности их расположения представлены на рис. 2.

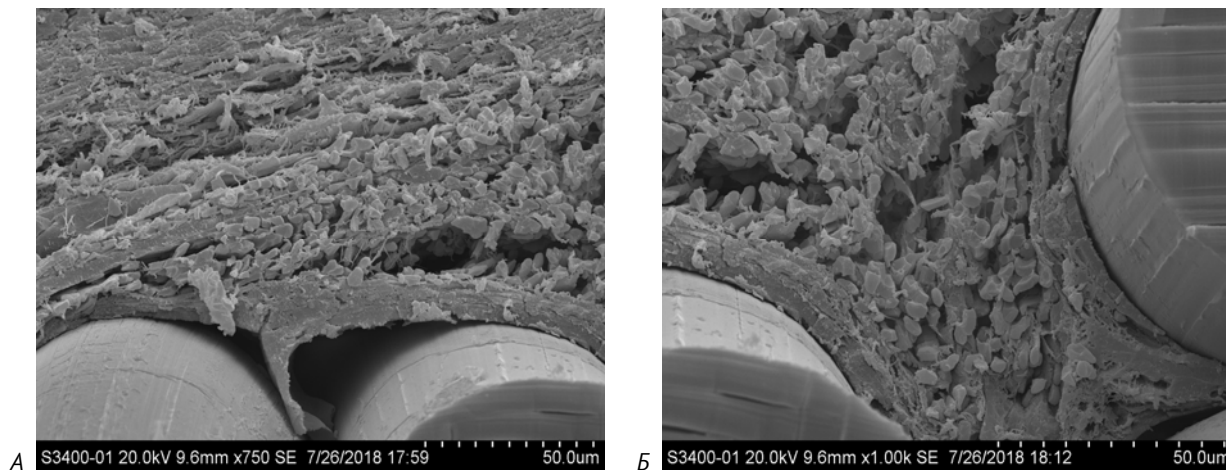


Рис. 2. Микрофотография дермы кожи крысы в месте имплантируемого 3D-скаффолда на основе полипролактона на 7-е сутки эксперимента. СЭМ. А – ув. $\times 750$, Б – ув. $\times 1000$

На 14-е сутки эксперимента вокруг структур матрицы наблюдалось увеличение количества коллагеновых структур. Толщина волокон возрастала до 0,24 [0,18; 0,84] мкм.

При этом отмечалась определенная пространственная закономерность – сагиттально направленные волокна расположены более компактно, практически не имеют межволоконных промежутков. Фронтальные волокна расположены более рыхло,

они тонкие и имеют большое количество разветвлений (рис. 3).

Данная организация волокнистых структур является основой для построения соединительнотканной капсулы и прорастания в нее сосудов, а также позволяет судить о завершении этапа адаптации и перестройки дермы для дальнейшего формирования соединительнотканной капсулы, ограничивающей скаффолд от окружающей ткани.

Тканевая инженерия в настоящее время считается ведущим направлением в регенеративной медицине. Тканеинженерные конструкции, состоящие из скаффолдов (матриц) и культивируемых на них клеток, используются в реконструктивных операциях в разных областях медицины.

Эти свойства, а также возможность моделирования трехмерной пористой структуры, подобной

естественным внеклеточным матриксам, позволяют создать условия для органотипической регенерации. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что 3D-скаффолд на основе полипролактона обладает хорошей биосовместимостью, вызывая слабую воспалительную реакцию, к 14-м суткам способствует формированию соединительно-тканного каркаса.

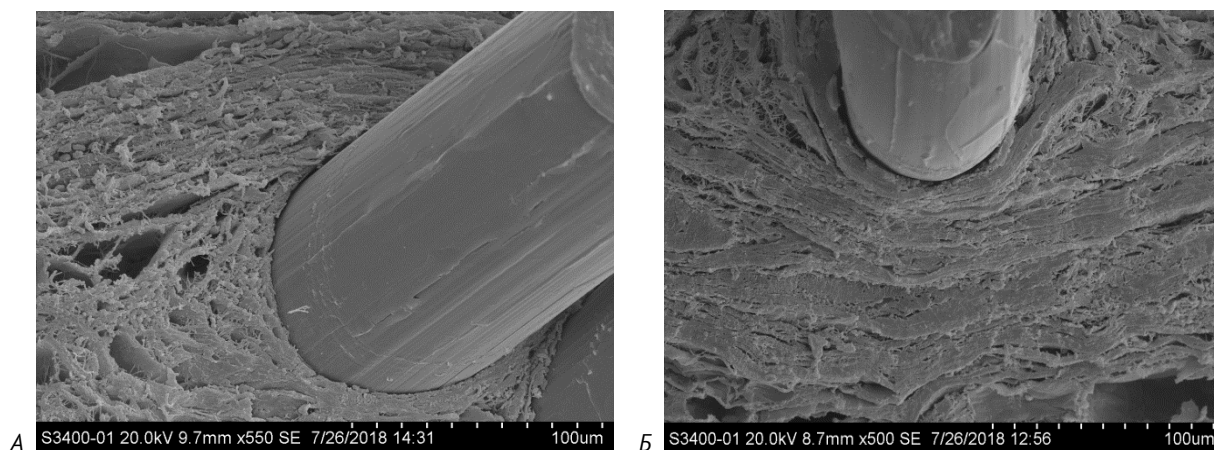


Рис. 3. Микрофотография дермы кожи крысы в месте имплантируемого 3D-скаффолда на основе полипролактона на 14-е сутки эксперимента. СЭМ. А – ув. $\times 550$, Б – ув. $\times 500$

Сопоставляя с данными других авторов, определили, что оптимальным сроком начала резорбции таких материалов должен быть промежуток с 10-х по 14-е сутки, необходимый для поддержания нормального метаболизма, пролиферативной активности и дифференцировки клеток, обуславливающей возможности васкуляризации и ремоделирования регенерирующей ткани [2, 3, 6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное экспериментальное исследование показало, что применение 3D-скаффолда на основе полипролактона способствует более быстрому образованию коллагенового каркаса в месте имплантации. Результаты исследования могут быть использованы для разработки новых скаффолдов или модификации уже имеющихся как «каркаса» для заселения клеточного компонента и создания тканеинженерных конструкций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бардакова К.Н., Гребеник Е.А., Истранова Е.В. и др. Армированные гибридные губки на основе коллагена для тканеинженерных конструкций // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2018. – № 1. – С. 31–37.
2. Егорихина М.Н., Левин Г.Я., Алейник Д.Я. и др. Скаффолд для замещения дефектов кожи на основе

естественных биополимеров // Успехи современной биологии. – 2018. – Т. 138, № 3. – С. 273–282.

3. Курков А.В., Гуллер А.Е., Истранов Л.П. и др. Структурные и механические особенности, биосовместимость, биодеградация и тканевая реакция на имплантацию коллагеновых скаффолдов для тканевой инженерии // Гены и Клетки. – 2019. – Т. 14, № 4-1 (Приложение). – С. 132.

4. Мишина Е.С., Затолокина М.А., Сергеева С.Ю. Изучение факторов динамического структурирования коллагеновых волокон в эксперименте // Морфология. – 2019. – № 11 (2). – С. 199.

5. Мутова Т.В, Затолокина М.А., Суковатых Б.С. и др. Влияние обогащенной тромбоцитами аутоплазмы на течение тканевой имплантационной реакции при суперлегком эндопротезировании брюшной стенки // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2018. – № 2 (66). – С. 74–80.

6. Файзуллин А.Л., Шехтер А.Б., Истранов Л.П. и др. Биорезорбируемые коллагеновые материалы в хирургии: 50 лет успеха // Сеченовский вестник. – 2020. – Т. 11, № 1. – С. 59–70. – URL: <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2020.11.1.59-70>

7. Фоминых Е.М., Митрофанов В.Н., Живцов О.П. и др. Трансплантация тканевых эквивалентов в лечении некоторых повреждений кожи // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22, № 1. – С. 165–173.

8. Chang W.K., Srinivasa S., MacCormick A.D., Hill A.G. Gentamicin-collagen implants to reduce surgical site infection: systematic review and meta-analysis of randomized trials // Ann Surg. – 2013. – Vol. 258, no. 1. – P. 159–65. – URL: <https://doi.org/10.1097/sla.0b013e3182895b8c>.

9. Gsib O., Egles C., Bencherif S.A. Fibrin: an underrated biopolymer for skin tissue engineering // *J. Mol. Biol. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 2, no. 2. – P. 1–4.

10. Hsu P.W., Salgado C.J., Kent K., et al. Evaluation of porcine dermal collagen (Permacol) used in abdominal wall reconstruction // *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* – 2009. – Vol. 62, no. 11. – P. 1484–1489. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2008.04.060>

11. Shekhter A.B., Fayzullin A.L., Rudenko T.G., Osi-pycheva V.D., Vukolova M.N. Medical applications of collagen and collagen-based materials // *Current Medicinal Chemistry.* – 2019. – Vol. 26, no. 3. – P. 506–516.

12. Zurina I.M., Shpichka A.I., Saburina I.N., et al. 2D/3D buccal epithelial cell self-assembling as a tool for cell phenotype maintenance and fabrication of multilayered epithelial linings *in vitro* // *Biomed Mater.* – 2018. – Vol. 3, no. 5. – P. 054104. – URL: <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aace1c>

REFERENCES

1. Bardakova K.N., Minaev N.V., Shavkuta B.S., et al. Armirovannye gibridnye gubki na osnove kollagena dlya tkaneinzhenernykh konstrukcij [Reinforced hybrid collagen sponges for tissue engineering]. *Kletochnye tekhnologii v biologii i medicine* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine], 2018, vol. 165, no. 1, pp. 142–147. (In Russ.; abstr. in Engl.).

2. Egorikhina M.N., Levin G.Ya., Aleinik D.Ya., et al. Skaffold dlya zameshcheniya defektov kozhi na osnove estestvennykh biopolimerov [Scaffold for skin replacement based on natural biopolymers]. *Uspekhi sovremennoj biologii* [Advances in modern biology], 2018, vol. 138, no. 3, pp. 273–282. (In Russ.; abstr. in Engl.).

3. Kurkov A.V., Guller A.E., Istranov L.P., et al. Strukturnye i mekhanicheskie osobennosti, biosovmestimost', biodegradaciya i tkanevaya reakciya na implantaciyu kollagenovykh skaffoldov dlya tkanevoj inzhenerii [Structural and mechanical features, biocompatibility, biodegradation and tissue response to implantation of collagen scaffolds for tissue engineering]. *Geny i Kletki* [Genes and cells], 2019, vol. 14, no. 4-1 (app.), p. 132. (In Russ.; abstr. in Engl.).

4. Mishina E.S., Zatolokina M.A., Sergeeva S.Ju. Izuchenie faktorov dinamicheskogo strukturirovaniya kollagenovykh volokon v jeksperimente [Experimental study of the factors of dynamic structuring of collagen fibers]. *Morgologia* [Morphology], 2019, no. 11 (2), pp. 99. (In Russ.; abstr. in Engl.).

5. Mutova T.V., Zatolokina M.A., Sukovatykh B.S., et al. Vliyanie obogashchennoj trombocitami autoplazmy na techenie tkanevoj implantacionnoj reakcii pri superlegkom endoprotezirovanii bryushnoj stenki [Influence of platelet-enriched autoplasm on the course of tissue implantation response in super-light abdominal wall endoprosthetics]. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta* [Journal of Volgograd State Medical University], 2018, no. 2 (66), pp. 74–80. (In Russ.; abstr. in Engl.).

6. Fayzullin A.L., Shekhter A.B., Istranov L.P., et al. Biorezorbiruemye kollagenovye materialy v hirurgii: 50 let uspekha [Bioresorbable collagen materials in surgery: 50 years of success]. *Sechenovskij vestnik* [Sechenov Medical Journal], 2020, no. 11(1), pp. 59–70. URL: <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2020.11.1.59-70>. (In Russ.; abstr. in Engl.).

7. Fominykh E.M., Mitrofanov V.N., Zhivtsov O.P., et al. Transplantaciya tkanevykh ekvivalentov v lechenii nekotorykh povrezhdenij kozhi [Transplantation of tissue equivalents in treatment of some skin injuries]. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov* [Bulletin of transplantology and artificial organs], 2020, vol. 22, no. 1, pp. 165–173. (In Russ.; abstr. in Engl.).

8. Chang W.K., Srinivasa S., MacCormick A.D., Hill A.G. Gentamicin-collagen implants to reduce surgical site infection: systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Ann Surg*, 2013, vol. 258, no. 1, pp. 159–65. URL: <https://doi.org/10.1097/sla.0b013e3182895b8c>

9. Gsib O., Egles C., Bencherif S.A. Fibrin: an underrated biopolymer for skin tissue engineering. *J. Mol. Biol. Biotechnol.*, 2017, vol. 2, no. 2, pp. 1–4.

10. Hsu P.W., Salgado C.J., Kent K., et al. Evaluation of porcine dermal collagen (Permacol) used in abdominal wall reconstruction. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2009, vol. 62, no. 11, pp. 1484–1489. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2008.04.060>.

11. Shekhter A.B., Fayzullin A.L., Rudenko T.G., et al. Medical applications of collagen and collagen-based materials. *Current Medicinal Chemistry*, 2019, vol. 26, no. 3, pp. 506–516.

12. Zurina I.M., Shpichka A.I., Saburina I.N., et al. 2D/3D buccal epithelial cell self-assembling as a tool for cell phenotype maintenance and fabrication of multilayered epithelial linings *in vitro*. *Biomed Mater*, 2018, vol. 3, no. 5, pp. 054104. URL: <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aace1c>.

Контактная информация

Мишина Екатерина Сергеевна – к. м. н., доцент кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России, e-mail: katusha100390@list.ru