Improving the effectiveness of treatment of deep soft tissue defects

Natalia KHRAMOVA¹, Lyubov KHEGAY², Alisher MAKHMUDOV³

Tashkent State Dental Institute
Tashkent Medical Academy

ARTICLE INFO

Article history:

Received May 2021

Received in revised form

20 May 2021

Accepted 15 June 2021

Available online

15 July 2021

Keywords:

regenerative medicine,
tissue engineering
construction,
fibroblasts,
nanocell,
wound healing,
soft tissue defect.

ABSTRACT

The effect of the created tissue-engineered construction based on the polyfunctional bioactive film with antimicrobial properties "Nanocel" with the addition of fibroblasts on the course of the wound process of a deep soft tissue defect was evaluated. The material for the study was 12 sexually mature male rats, in which a deep defect of soft tissues was formed on the back with resection of a section of muscle 1x1 cm in size. Observation was carried out for 1, 3, 7, 14 and 21, 28 days. During the experiments, the local status, general condition, food and water consumption, changes in body weight (every 3 days), behavioral features, intensity and nature of motor activity, coordination of movements, response to external stimuli, frequency and depth of respiratory movements, state of wool and the skin, the color of the mucous membranes, the position of the tail, the amount and type of fecal matter, clinical signs of intoxication were recorded. After decapitation, a histomorphological examination of the internal organs and the place of the formed defect was carried out. Pathomorphological studies of the internal organs of animals were carried out according to the generally accepted method. Pieces of tissue were placed in a 10% formalin solution, embedded in paraffin blocks. Sections 4-5 mm thick were stained with hematoxylin-eosin. Microscopic examination was carried out using a MIKMED-2 light microscope with a built-in camera with a magnification of 40, 100, 200, and 400 times. The results of the studied hematological and biochemical parameters of experimental animals exposed to the proposed tissue-engineered construct are within physiological norms and do not differ from the control values. When conducting a morphological study of a deep soft tissue defect

¹ Ph.D. Associate Professor, Tashkent State Dental Institute, Tashkent, Uzbekistan.
E-mail: nhramova@mail.ru.

² Ph.D. Associate Professor, Tashkent Medical Academy, Tashkent, Uzbekistan.
E-mail: luba0202.55@mail.ru.

³ Ph.D. Associate Professor, Tashkent State Dental Institut, Tashkent, Uzbekistan.
E-mail: alishermah@mail.ru.

using a tissue-engineered construction of a polyfunctional bioactive film with antimicrobial properties “Nanocel” with the addition of fibroblasts, it was determined that it is completely resorbed within 28 days and does not form a fibrous capsule. Based on the data of the study of histological sections of soft tissue samples, it was shown that the tissue-engineered structure creates conditions for tissue regeneration, which ensures the closure of the defect with connective tissue by adding allofibroblasts to the composition. According to the criteria for the parameters of acute and subchronic toxicity, a tissue-engineered structure to optimize the regeneration of deep soft tissue defects has no contraindications for clinical trials and medical use. It is recommended to use the proposed tissue-engineering structure as a regulator of the wound process for better engraftment of free skin grafts in the treatment of cicatricial deformities and facial skin defects of various origins and as a preparation of the surgical field in planned-operated patients.

2181-1415/© 2021 in Science LLC.

This is an open access article under the Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.ru>)

Yumshoq to‘qimalarning chuqur nuqsonlarini davolash samaradorligini oshirish

Kalit so‘zlar:

regenerativ tibbiyot,
to‘qimalarning muhandislik
tuzilishi,
fibroblastlar,
nanotsellalar,
yaralarni davolash,
yumshoq to‘qimalarning
defekti.

ANNOTATSIYA

“Nanocel” antimikrobiyal xususiyatlarga ega bo‘lgan ko‘p funktsional bioaktiv plyonka asosida yaratilgan to‘qima muhandisligi konstruksiyasining fibroblastlar qo‘shilishi bilan chuqur yumshoq to‘qimalar nuqsonining yara jarayoniga ta’siri baholandi. Tadqiqot uchun material jinsiy jihatdan etuk bo‘lgan 12 ta erkak kalamush bo‘lib, unda 1x1 sm hajmdagi mushak qismini rezektsiya qilish bilan orqa qismida yumshoq to‘qimalarning chuqur defekti hosil bo‘lgan va kuzatuv 1, 3, 7, 14 va 21, 28 kun tajribalar davomida mahalliy holat, umumiy holat, oziq-ovqat va suv iste’moli, tana vaznining o‘zgarishi (har 3 kunda), yurish-turish xususiyatlari, harakatlanish intensivligi va tabiati, harakatlarning muvofiqlashtirilishi, tashqi ta’sirlarga javob, nafas olishning chastotasi va chuqurligi, harakatlar, jun va terining holati, shilliq pardalarning rangi, dumining holati, najas moddalarining miqdori va turi, mastlikning klinik belgilari qayd etilgan. Boshini kesgandan so‘ng, ichki organlar va hosil bo‘lgan nuqson joyini histomorfologik tekshirish o‘tkazildi. Hayvonlarning ichki a‘zolarini patomorfologik tadqiqotlar umumiy qabul qilingan usul bo‘yicha olib borildi. To‘qimalarning qismlari parafin bloklariga singdirilgan 10% formalin eritmasiga joylashtirildi. 4-5 mm qalinlikdagi qismlar gematoksilin-eozin bilan bo‘yalgan. Mikroskopik tekshirish MIKMED-2 yorug‘lik mikroskopi yordamida o‘rnatilgan kamera bilan 40, 100, 200 va 400 marta kattalashtirildi. Tavsiya etilgan to‘qima tuzilishi ta’siriga uchragan eksperimental hayvonlarning o‘rganilgan

gematologik va biokimyoviy parametrlari natijalari fiziologik me'yorlarga mos keladi va nazorat qiymatlaridan farq qilmaydi. Fibroblastlar qo'shilgan antimikrobiyal xususiyatlarga ega bo'lgan "Nanosel" ko'p funktsional bioaktiv plyonkaning to'qima asosida yaratilgan konstruksiyasidan foydalangan holda chuqur yumshoq to'qima nuqsonini morfologik o'rganishda uning 28 kun ichida to'liq rezorbsiyalanganligi va hosil bo'lmasligi aniqlandi. Tolali kapsula, yumshoq to'qima namunalariining gistologik bo'limlarini o'rganish ma'lumotlariga asoslanib, to'qima tomonidan yaratilgan tuzilish tarkibida allofibroblastlarni qo'shish orqali nuqsonni biriktiruvchi to'qima bilan yopilishini ta'minlaydigan to'qimalarning yangilanishi uchun sharoit yaratishi ko'rsatildi. O'tkir va subkronik toksiklik parametrlari mezonlariga ko'ra, chuqur yumshoq to'qimalarning nuqsonlari regeneratsiyasini optimallashtirish uchun to'qimalar tomonidan yaratilgan struktura klinik tadqiqotlar va tibbiy maqsadlarda foydalanishga qarshi ko'rsatmalarga ega emas. Taklif etilayotgan to'qima tuzilishidan yara jarayonini regulyatori sifatida cicatricial deformatsiyalar va yuzning turli xil kelib chiqishi yuzidagi nuqsonlarni davolashda va terini jarrohlik amaliyotini tayyorlashda erkin terini payvand qilishni yaxshiroq qilish uchun foydalanish tavsiya etiladi.

Повышение эффективности лечения глубоких дефектов мягких тканей

Ключевые слова:

регенеративная медицина,
тканеинженерная
конструкция,
фибробласты,
наноцел,
заживление раны,
дефект мягких тканей.

АННОТАЦИЯ

Оценено влияние созданной тканеинженерной конструкции на основе полифункциональной биоактивной пленки с противомикробным свойством «Наноцел» с добавлением фибробластов на течение раневого процесса глубокого дефекта мягких тканей. Материалом для исследования послужили 12 половозрелых крыс -самцов, которым на спинке был сформирован глубокий дефект мягких тканей с резекцией участка мышцы размером 1х1 см. Наблюдение проводилось в течение 1-х, 3-х, 7-х, 14-х и 21-х, 28 суток. В ходе экспериментов оценивались локальный статус, общее состояние, потребление корма и воды, изменение массы тела (каждые 3 дня), особенности поведения, интенсивность и характер двигательной активности, координация движений, реакция на внешние раздражители, частота и глубина дыхательных движений, состояние шерстного и кожного покрова, окраска слизистых оболочек, положение хвоста, количества и видов фекальных масс, регистрировались клинические признаки интоксикации. После декапитации проводилось гистоморфологическое исследование внутренних органов и места сформированного дефекта. Патоморфологические исследования внутренних органов животных проводились по

общепринятой методике. Кусочки тканей помещались в 10% формалиновый раствор, заливались в парафиновые блоки. Срезы толщиной 4-5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. Микроскопическое исследование проводили с помощью светового микроскопа МИКМЕД-2 с встроенным фотоаппаратом с увеличением в 40, 100, 200 и 400 раз. Результаты изученных гематологических и биохимических показателей экспериментальных животных, подвергавшихся воздействию предложенной тканеинженерной конструкции в пределах физиологических норм и не отличаются от контрольных значений. При проведении морфологического исследования глубокого дефекта мягких тканей при применении тканеинженерной конструкции полифункциональной биоактивной пленки с противомикробным свойством «Наноцел» с добавлением фибробластов было определено что она полностью резорбируется в течение 28 дней и не образует фиброзную капсулу. Основываясь на данных исследования гистологических срезов образцов мягких тканей было показано что тканеинженерная конструкция создает условия для регенерации тканей, что обеспечивает закрытие дефекта соединительной тканью за счет добавления в состав аллофибробластов. По критериям параметров острой и субхронической токсичности тканеинженерная конструкция для оптимизации регенерации глубоких дефектов мягких тканей не имеет противопоказаний для клинических испытаний и медицинского применения. Рекомендовано использовать предложенную тканеинженерную конструкцию в качестве регулятора раневого процесса для лучшего приживления свободных кожных трансплантатов при лечении рубцовых деформаций и дефектов кожи лица различного генеза и в качестве подготовки операционного поля у планово-оперирующихся больных.

ВВЕДЕНИЕ

Основными направлениями в тканевой инженерии являются выделение и выращивание культуры клеток и тканей *invitro*, исследование свойств стволовых клеток, роли микроокружения дефекта, а также изучение возможностей использования биологически совместимых синтетических материалов [1, 4]. В результате работ в этих направлениях созданы тканеинженерные конструкции (эквиваленты), в частности эквивалент кожи человека. Такие эквиваленты в настоящее время используют для изучения и моделирования биологических процессов [2, 3]. Кроме того, их уже применяют в клинике для ускорения заживления острых и хронических ран и в фармацевтических исследованиях в качестве тест-систем (Мелешина А.В., Быстрова А.С., Роговая О.С., Воротеляк Е.А., Васильев А.В., Загайнова Е.В., 2017). Анализ мирового рынка клеточных технологий для оптимизации заживления ран различной этиологии определил тканеинженерные конструкции из ауто и алло фибробластов на различных носителях как наиболее перспективный способ [3].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полифункциональной биоактивной пленки с противомикробным свойством «Наноцел» и клеток соединительной ткани для оптимизации регенерации глубоких дефектов мягких тканей.

Материалы и методы. Изучена эффективность тканеинженерной конструкции, полученной из полифункциональной биоактивной пленки с противомикробным свойством «Наноцел» и с добавлением аллофибробластов для оптимизации регенерации глубоких дефектов мягких тканей на спинках крыс.

Ранозаживляющая эффективность глубоких дефектов мягких тканей *in vivo* изучена на 12 половозрелых крысах-самцах. Для исследований крысы массой тела $164,83 \pm 1,608$ - $173,33 \pm 2,32$ гр были разделены на 2 групп по 6 особей в каждой группе.

В 1-ой экспериментальной группе для терапии глубокого дефекта мягких тканей применена тканеинженерная конструкция на основе полифункциональной биоактивной пленки с противомикробным свойством «Наноцел» и с добавлением аллофибробластов.

В 2-й контрольной группе глубокий дефект мягких тканей ушивали без применения ТИК.

Животные содержали в условиях вивария Межвузовской научно-исследовательской лаборатории (МНИЛ) ТМА на стандартном рационе с учетом положений международной конвенции о «Правилах работ с экспериментальными животными» (European Communities Council Directives of 24 November 1986, 86/609/ЕЕС). После 2-х недельного карантина белые крысы были тщательно осмотрены, учитывался внешний вид, двигательная активность и реакция на рефлексы. Лабораторные животные содержались в стандартных условиях вивария и находились на полноценном лабораторном пищевом рационе при свободном доступе к воде.

Для моделирования глубокого дефекта мягких тканей и изучения характера клинических проявлений в измененных тканях с применением фибробластов на различных носителях в эксперименте проводили анестезию (внутрибрюшинно вводили наркотическое вещество Этаминал натрия 1,6% в расчете 0,5 мл на 200 г массы тела животного).

Создание модели экспериментального глубокого дефекта мягкой ткани осуществляли путем проведения продольного разреза с помощью скальпеля в области спины параллельно позвоночному столбу после предварительного сбривания волос и обработки операционного поля бетадином длиной 3.0 см на глубину до фасции. Далее тупым путем рассекали фасцию, покрывающую мышцу. После обнажения мышцы, используя микрометр, выделяли 10 мм мышечной ткани и удаляли ее с целью создания дефекта. Затем в сформированный дефект помещали созданную тканеинженерную конструкцию (ТИК) с фибробластами (размер пленки составлял 10x10мм). Рану послойно ушивали.

Наблюдение проводилось в течение 1-х, 3-х, 7-х, 14-х и 21-х, 28 суток. Наблюдение за животными проводилось через каждые 4 часа в течении 28 дней. В ходе экспериментов оценивались локальный статус, общее состояние, потребление корма и воды, изменение массы тела (каждые 3 дня), особенности поведения, интенсивность и характер двигательной активности, координация

движений, реакция на внешние раздражители, частота и глубина дыхательных движений, состояние шерстного и кожного покрова, окраска слизистых оболочек, положение хвоста, количества и вид фекальных масс, регистрировались клинические признаки интоксикации:

Выведение животных из эксперимента осуществлялось передозировкой эфира. Патоморфологические исследования внутренних органов животных проводились по общепринятой методике. Кусочки тканей помещались в 10% формалиновый раствор, заливались в парафиновые блоки. Срезы толщиной 4-5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. Микроскопическое исследование проводили с помощью светового микроскопа МИКМЕД-2 с встроенным фотоаппаратом с увеличением в 40, 100, 200 и 400 раз.

Клинико-лабораторные исследования периферической крови белых крыс и кроликов проводились на гематологическом анализаторе BC-3000 (Mindray, P.R. China). По развернутому анализу крови изучены количество эритроцитов и лейкоцитов, Hb, цветной показатель, гемограмма с подсчетом ретикулоцитов, тромбоцитов, базофилов, эозинофилов, палочкоядерных лейкоцитов, сегментоядерных лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов, СОЭ и др.

Биохимические показатели сыворотки крови определяли унифицированными методами: альбумин – бромкрезоловым; аспартат-аминотрансферазу (АСаТ) и аланинаминотрансферазу (АЛаТ) – унифицированным методом Райтмана-Франкеля; щелочную фосфатазу – унифицированным методом с нитрофенилфосфатом (наборы реактивов фирмы CYPRESS Diagnostics, Бельгия) на биохимическом анализаторе BA-88 A (Mindray, P.R.China).

Статистические исследования проведены на основании стандартных клинических рекомендаций. Количественные данные представлены как среднее арифметическое (M) $\pm$ стандартное отклонение (SD) в случае нормального распределения и как медиана (Md) и квартили (Q) или (SD) при других распределениях. За статистически значимые изменения принимался уровень достоверности $p < 0,05$. За статистически значимые изменения принимался уровень достоверности $p < 0,05$. Также мы использовали расчет доверительного интервала частоты и доли фактора в медицинских исследованиях (Свидетельство регистрации программы для электронных вычислительных машин, №DGU 06472).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных показал, что у опытных животных показатели содержания гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, эозинофилов, лимфоцитов, гранулоцитов, гематокрита, средней концентрации гемоглобина в эритроците, относительной ширины распределения эритроцитов, тромбоцитов в абсолютных числах, гетерогенности тромбоцитов, среднего объема тромбоцитов, тромбокрит, абсолютного содержания лимфоцитов и смеси моноцитов, базофилов и эозинофилов, СОЭ находятся на одном уровне с контрольными значениями, т.е. гематологические показатели крови белых крыс на протяжении всего времени исследований не претерпевали статистически значимых отклонений ($P > 0,05$), как от нормы, так и по группам наблюдения.

Анализ результатов исследований динамики биохимических показателей сыворотки крови белых крыс, приведенных в табл.2, свидетельствует о том, что уровни

аминотрансминазных ферментов (АЛТ, АСТ) и щелочной фосфатазы не выходят за рамки физиологической нормы и на одном уровне с контрольными значениями. Содержание гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП), общего белка, альбумина, холестерина, глюкозы и общего билирубина не показали статистически достоверных различий ($P > 0,05$) на протяжении всего срока наблюдения, что подтверждает безопасность применения предложенной ТИК.

РЕЗУЛЬТАТЫ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

В первой группе, где применялась тканеинженерная конструкция на основе полифункциональной биоактивной пленки с противомикробным свойством «Наноцел» и аллофибробластов выявлены скопления фибробластов (двойная стрелка, рис. 1., одна стрелка рис. 2).

Рис. 1.

Первая опытная группа. Дефект мягких тканей с применением ТИК. Разрастание участков фибробластов указано стрелками. Окраска ГЭ. Ув. 10x100.

Рис. 2.

Первая опытная группа. Дефект мягких тканей с применением ТИК. Фибробласты (стрелка). Окраска ГЭ. Ув. 10x10.

В контрольной группе, где дефект мягких тканей заживал без применения тканеинженерной конструкции, мышцы с интерстициальным отёком в тонких прослойках соединительной и жировой ткани, отмечается некроз, лимфоидная инфильтрация и единичные фибробласты, определяются очаги инфильтрации и некроза (рис. 3, 4).

Рис. 3. Вторая группа (контрольная).
Окраска ГЭ. Ув. 10x10.

Рис. 4. Вторая группа (контрольная).
Окраска ГЭ. Ув. 10x40.

Выводы

При проведении морфологического исследования глубокого дефекта мягких тканей при применении тканеинженерной конструкции на основе полифункциональной биоактивной пленки с противомикробным свойством «Наноцел» и аллофибробластов и может быть рекомендована для практического применения в качестве регулятора раневого процесса для лучшего приживления свободных кожных трансплантатов при лечении рубцовых деформаций и дефектов кожи лица различного генеза и в качестве подготовки операционного поля у планово-оперирующихся больных.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ:

1. Севастьянов В.И. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины // Регенеративная медицина и клеточные технологии – 2014. – Том XVI, № 3. – С. 93–108.
2. Храмова Н.В., Холматова М.А., Мунгиев М.З. К вопросу использования раневых покрытий и клеточных технологий для оптимизации регенерации кожи // Stomatologiya (Среднеазиатский научно-практический журнал). – Ташкент, 2018. – № 4 (73). – С. 57–59.
3. Храмова Н.В., Хусанова Ю.Б., Махмудов А.А. Эквиваленты кожи: за и против // Журнал стоматологии и краниофациальных исследований. – Ташкент, 2020. – № 1 (01). – С. 72–75.
4. Isabel Sánchez-Muñoz, Rosario Granados, Purificación Holguín Holgado, José Antonio García-Vela, Celia Casares, Miguel Casares. The use of adipose mesenchymal stem cells and human umbilical vascular endothelial cells on a fibrin matrix for endothelialized skin substitute. 2015 Jan;21(1-2):214-23. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.tea.2013.0626> (дата обращения: 17.07.21).