

КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

УДК 617.55-089.844

ПРИМЕНЕНИЕ АЛЛОГЕННЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ПРИ ЭНДОПРОТЕЗИРОВАНИИ ПЕРЕДНЕЙ БРЮШНОЙ СТЕНКИ

Появление современных синтетических протезов позволило изменить подходы к лечению послеоперационных вентральных грыж. Основным недостатком метода является имплантация чужеродного материала в организм и соответственно местные проявления воспалительного процесса. В связи с этим необходима разработка материала, вызывающего меньшую воспалительную реакцию при условии сохранения удовлетворительных прочностных и стоимостных характеристик. Важная составляющая течения раневого процесса – получение прочного рубца. Введение культуральных фибробластов позволяет получить на более ранних сроках зрелую соединительную ткань. На 270 белых мышцах проведено экспериментальное исследование синтетических протезов из лавсана, полипропилена и политетрафторэтилена с введением и без введения культуральных фибробластов. Получены результаты морфологических изменений в зависимости от использованного типа протеза и введения фибробластов.

Ключевые слова: послеоперационная грыжа, лавсан, полипропилен, политетрафторэтилен, фибробласт, эндопротезирование, соединительная ткань.

С.В. Иванов¹
А.А. Должиков²
И.С. Иванов¹
А.А. Мартынецв¹

¹ Курский государственный
медицинский университет

² Белгородский
государственный
университет

e-mail: main@kgmu.kursknet.ru

Проблема возникновения и лечения послеоперационных вентральных грыж остается актуальной до сих пор. Не вызывает сомнения, что наиболее эффективным методом лечения грыж передней брюшной стенки обширных и гигантских размеров является эндопротезирование с использованием синтетических эндопротезов. Однако, существенным недостатком данной методики является имплантация чужеродного материала в организм и соответственно местные проявления воспалительного процесса.

Стадийность течения раневого процесса является обязательным условием репаративной регенерации, приводящей к восстановлению тканей. В случае применения синтетических эндопротезов процессы репарации протекают в присутствии инородного тела и отличаются некоторыми особенностями. Главной же задачей при лечении ПОВГ является «получение» прочного соединительно-тканного рубца. Соединительная ткань состоит из белковых и гликопротеидных соединений, и взаимосвязанных с ними клеточных элементов, таких как фибробласты, фиброциты, тканевые макрофаги, тучные клетки, лимфоциты, полиморфноядерные лейкоциты и т.д.

Наиболее распространенным клеточным элементом соединительной ткани является фибробласт, играющий основную роль в формировании соединительной ткани и участвующий в регенераторных и регуляторных процессах. Фибробласты считаются регуляторами воспалительного процесса, благодаря контактному взаимодействию с клетками микроокружения и продукции растворимых медиаторов.

Одной из целей нашего исследования является экспериментальное изучение морфологической картины при введении и без введения культуральных фибробластов в область имплантации различных протезов.

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось на 270 белых мышах. Протезы «Эслан»-лавсан, «Эсфил»-полипропилен и «Экофлон»-политетрафторэтилен имплантировали только над мышечно-апоневротическим слоем, имитируя пластику типа «onlay». Производилась как имплантация без последующего введения культуральных фибробластов, так и однократное или двукратное введение фибробластов в область расположения эндопротеза.

В качестве исходного материала для культивирования аллогенных эмбриональных фибробластов использовали эмбрионы белых мышей на сроке беременности 2 – 4 недель.

Взятие материала мышечно-апоневротического слоя, с эндопротезом, передней брюшной стенки из области послеоперационного рубца выполнялось на 10, 30, 60-е сутки (эти сроки являются показательными с точки зрения естественного временного промежутка регенерации мышечно-апоневротической ткани). Изъятый материал сразу после извлечения фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, затем участки тканей подвергали обезвоживанию и заливали в парафин по стандартной методике. Парафиновые срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином Майера и эозином, окраской по Ван Гизон.

Для достоверности исследования проводилась морфометрическая оценка микропрепаратов полученных от 10-ти животных на каждом сроке. Подсчет клеток производился суммарно до 1000 клеток.

Учитывались следующие признаки:

- 1) клеточный состав (лейкоциты, макрофаги) инфильтрата в процентах;
- 2) активность воспалительной реакции по процентному содержанию сегментоядерных нейтрофилов в инфильтрате;
- 3) абсолютное количество лимфоцитов в инфильтрате,
- 4) степень зрелости фибробластов по процентному соотношению молодых форм и фиброцитов.

Таблица 1

Характеристика клеточного состава области расположения протеза (без введения фибробластов)

Сутки наблюдения	Фибробласты M±m	Макрофаги M±m	Лимфоциты M±m	Сегм. лейкоциты M±m
10 сутки «Эслан»	27,4±5,9*	26,2±5,6*	19,4±6,6	27±9,7*
10 сутки «Эсфил»	60,1±11 *	6±2*	14,5±6,8	19,4±10,8
10 сутки «Экофлон»	49±5,1*	17±7,4*	16±6,3	18±8,5
30 сутки «Эслан»	38,2±6,3*	7,9±1,9	26,5±7,9	27,4±8,8*
30 сутки «Эсфил»	63,2±13,6 *	6,1±5,8	16,1±3,7	14,6±5,6*
30 сутки «Экофлон»	53,9±11,7*	10,9±3,6*	33,2±3,6*	2±1,5*
60 сутки «Эслан»	47,8±11,6 *	7±2,4	15,7±5,3	29,5±5,2*
60 сутки «Эсфил»	65±13,2*	6±2,7	16±1,8	13±2,9*
60 сутки «Экофлон»	70,3±16,4*	2±0,9*	26±6,3*	1,7±1*

(n=10)

p<0,05 * – при сравнении показателей на одинаковых сроках.

Результаты и их обсуждение. Анализируя полученные количественные

признаки при исследовании гистологических препаратов в контрольных и опытных сериях на 10-е сутки исследования, можно отметить следующее: плотность клеточного инфильтрата, отражающая количественную сторону воспалительной реакции, достоверно выше в контрольной группе без введения фибробластов.

В экспериментах с введением культуральных фибробластов на сроке 7 суток, 7 и 10 суток обнаружено парадоксальное снижение содержания фибробластов в сопоставлении с предыдущими сериями.

Анализ цитограмм и морфологических картин, выявленных на данном сроке, свидетельствует, что причиной этого является, во-первых, гибель значительного числа введенных фибробластов, во-вторых, вероятный задерживающий эффект экзогенных фибробластов по типу механизма обратной связи. Среди показателей цитограммы косвенным свидетельством этому является большее в сравнении с серией без фибробластов содержание макрофагов, которые, вероятно, обеспечивают элиминацию дегенерировавших компонентов клеточной культуры.

В структуре тканевого ложа трансплантатов выявляется неоднородность. Явные очаги дистрофических изменений и гибели фибробластов, дезорганизации матрикса сочетаются с участками типичной грануляционной ткани, соответствующей по структуре 10-суточной давности.

Кроме этого, в отдельных микропрепаратах выявлены крупные поля скоплений незрелых фибробластических клеток и явления активного неоангиогенеза. Незрелые фибробластические клетки, имеющие «мезенхимоидную» структуру при этом тесно связаны со стенками новообразующихся сосудов.

Таблица 2

Характеристика клеточного состава области расположения протеза
(введение аллогенных эмбриональных фибробластов на 7-е сутки эксперимента)

	Фибробласты M±m	Макрофаги M±m	Лимфоциты M±m	Сегм. лейкоциты M±m
10 сутки «Эслан»	28,4±7	31,1±12,6	20,2±7,8	20,3±13,2 (p < 0,05)
10 сутки «Эсфил»	43,2±7,1 (p < 0,05)	19,5±8,2 (p < 0,05)	13,4±6,9	23,9±13,6
10 сутки «Экофлон»	29,9±5,5 (p < 0,05)	15,8±4,6	23,5±4,2	30,8±11,3 (p < 0,05)
30 сутки «Эслан»	50,2±5,6 (p < 0,05)	19,3±6,4 (p < 0,05)	16,5±6,8 (p < 0,05)	14,0±6,8 (p < 0,05)
30 сутки «Эсфил»	66,2±14,4	12,2±6,2	5,8±2 (p < 0,05)	15,8±6,9
30 сутки «Экофлон»	45,7±13,3 (p < 0,05)	22,8±14,4 (p < 0,05)	16,4±4,4 (p < 0,05)	15,1±4,2 (p < 0,05)
60 сутки «Эслан»	64±11,6 (p < 0,05)	18,4±9,9 (p < 0,05)	12,2±4,3	5,4±3,9 (p < 0,05)
60 сутки «Эсфил»	74,3±16,6 (p < 0,05)	16,0±14,5 (p < 0,05)	3,1±1,8 (p < 0,05)	6,6±2,9 (p < 0,05)
60 сутки «Экофлон»	78,3±19,1 (p < 0,05)	11,8±6,3 (p < 0,05)	6,7±4,3 (p < 0,05)	3,2±2

(n=10)

p – в таблице сравнение контрольной и опытной (однократное введение фибробластов) серий

В сериях с использованием сетки «Экофлон» с введением фибробластов на 7-е и на 7-е + 10-е сутки содержание их в составе клеточного инфильтрата еще меньше, в сравнении как с сеткой «Эсфил», так и с сеткой «Эслан» без введения фибробластов. Помимо отмеченных признаков гибели культуральных фибробластов в экспериментах с сеткой «Экофлон» установлена и вторая причина «потери» клеточной культуры. Пористая структура наружного слоя протеза способствует активной миграции в ее толщу фибробластов, которые вследствие этого не попадают в подсчет цитограммы. В динамике созревания соединительной ткани вокруг протезов содержание миг-



рировавших клеток в толще сетки снижается до единичных, вокруг сетки формируется тонкая фиброзная капсула. В опытной группе возрастает процентное содержание лимфоцитов в инфильтрате, что указывает на смену стадий воспаления с переходом от экссудативной к пролиферативной.

Таким образом, на 10-е сутки в микропрепаратах опытных серий уменьшается плотность клеточного инфильтрата по сравнению с контрольной группой, увеличивается процентное содержание лимфоцитов в инфильтрате.

Анализируя полученные данные в контрольных и опытных сериях на 30-й день исследования, можно отметить следующее. Процентное содержание лимфоцитов выше в сериях при ведении аллогенных эмбриональных фибробластов на 7-е и 10-е сутки послеоперационного периода выше по сравнению с другими сериями, что указывает на смену фаз воспаления и переход от экссудативной фазы к пролиферативной. В опытных сериях достоверно больше количество фибробластов, чем в контрольных сериях, что указывает на более лучшие условия для реализации стимулирующих свойств эмбриональных фибробластов на этом сроке после операции.

Анализ соотношения молодых фибробластических элементов и фиброцитов при использовании всех сеток свидетельствует о значимом модифицирующем действии введения культуральных клеток на скорость созревания соединительной ткани. При использовании сетки «Эсфил» с введением фибробластов на 7-е и на 7-е + 10-е сутки соотношение молодых клеток и фиброцитов на 60-е сутки противоположно в сравнении с серией без имплантации клеточной культуры и по динамике не отличается от сетки «Экофлон».

При использовании сетки «Экофлон» с введением фибробластов на сроке 60-суток содержание фиброцитов больше, чем в серии без использования клеточной культуры. Среди значительно преобладающих фиброцитов встречаются мелкие очаги пролиферации незрелых фибробластов.

Таблица 3

Характеристика клеточного состава области расположения протеза
(введение аллогенных эмбриональных фибробластов на 7-е сутки и 10-е эксперимента)

	Фибробласты M±m	Макрофаги M±m	Лимфоциты M±m	Сегм. лейкоциты M±m
10 сутки «Эслан»	32,4±6 (p < 0,05)	30,9±10,2	20,4±7,7	16,3±14,5 (p < 0,05)
10 сутки «Эсфил»	42,5±7,5 (p < 0,05)	21,5±5,1 (p < 0,05)	16,0±5,5	20,0±14,9
10 сутки «Экофлон»	31,8±4,6 (p < 0,05)	21,2±4,7*	17,1±8*	29,9±9,3 (p < 0,05)
30 сутки «Эслан»	53,2±6 (p < 0,05)	15,6±6,2	15,4±7 (p < 0,05)	15,8±5,8 (p < 0,05)
30 сутки «Эсфил»	60,7±13,3	13,4±5,2	13,0±5,3*	12,9±7,2
30 сутки «Экофлон»	64,8±17,0* (p < 0,05)	12,1±3,3*	14,1±4,4 (p < 0,05)	9,0±4,8* (p < 0,05)
60 сутки «Эслан»	67,0±13,3 (p < 0,05)	15,0±4,1 (p < 0,05)	10,7±4,5 (p < 0,05)	7,3±2,9 (p < 0,05)
60 сутки «Эсфил»	79,8±12,3* (p < 0,05)	11,4±8,9 (p < 0,05)	5,8±4,1 (p < 0,05)	3,0±2,4* (p < 0,05)
60 сутки «Экофлон»	80,0±19,4 (p < 0,05)	11,2±3,5 (p < 0,05)	6,7±5,4 (p < 0,05)	2,1±1,2

(n=10)

p < 0,05 * – сравнение опытной (однократное введение фибробластов) и опытной (двукратное введение фибробластов) серий;

p – в таблице сравнение контрольной (без введения фибробластов) и опытной (двукратное введение фибробластов) серий.

В опытных сериях сформировалась зрелая фиброзная ткань; в контрольной группе она имела структуру грануляционной. Плотность клеточных инфильтратов в

опытных сериях достоверно ниже, чем в контрольной группе. Это говорит о более быстром разрешении воспаления при введении эмбриональных фибробластов. Процент активных форм фибробластов в опытных сериях достоверно ниже, чем в контрольных, и находится на минимальных цифрах ($p < 0,05$), что указывает на завершение фибропластических процессов.

При сравнении опытных серий на 60-й день после операции следует отметить следующее: в опытных сериях достоверно ниже, чем в контрольных сериях активность воспалительной реакции, количество лимфоцитов в инфильтрате, что говорит о более быстром стихании воспаления при введении аллогенных эмбриональных фибробластов на 7-е сутки после операции; содержание активных форм фибробластов в опытных сериях достоверно ниже, чем в контрольных сериях, что говорит о более быстром завершении фибропластических процессов при введении аллогенных эмбриональных фибробластов на 7-е сутки после операции.

При использовании же сетки «Экофлон» отмечается эффект второго введения в виде более раннего (на 30-е сутки) выравнивания содержания фибропластических элементов в сравнении с использованием сетки «Эсфил». При однократном введении содержание фибробластов при использовании разных сеток выравнивается только на 60-е сутки. Вероятно, второе введение компенсирует «потерю» культуральных клеток по указанным выше причинам.

Кроме этого, раньше (также на 30-е сутки) наступает изменение пропорции клеток фибропластической популяции с преобладанием фиброцитов.

Введение культуральных фибробластов оказывает выраженный модифицирующий эффект на формирование и созревание клеточных компонентов волокнистой соединительной ткани при использовании как сетки «Эслан», так и сеток «Эсфил», «Экофлон», ускоряя во всех случаях дифференцировку фиброцитов.

Двукратное введение культуры фибробластов дополнительно ускоряет созревание фибропластических элементов при использовании сетки «Экофлон». При использовании сеток «Эслан» и «Эсфил» данный эффект двукратного введения клеточной культуры не выявлен.

Эндопротез «Эслан» при имплантации в ткани характеризуется низкими биосовместимыми свойствами, что подтверждают результаты наблюдения за послеоперационными ранами, данные цитологического и гистологического исследований. Полифиламентный характер, адгезионные и реактогенные свойства полиэфирных нитей обуславливают неблагоприятное течение раневого процесса.

Имплантация эндопротеза «Эсфил» характеризуется наиболее благоприятным течением раневого процесса. Это говорит об идеальных биосовместимых свойствах этого материала и подтверждается данными наблюдений за состоянием послеоперационных ран, цитологическим и гистологическим методами исследования. Монофиламентный характер нитей, отсутствие воспалительной реакции при имплантации и экономическая доступность делают его материалом выбора для пластики брюшной стенки. Этот эндопротез характеризуется достаточной механической прочностью для противодействия внутрибрюшному давлению и отсутствием воспалительной реакции тканей при имплантации вплоть до поздних сроков наблюдения.

«Экофлон», так же характеризуется достаточной механической прочностью для противодействия внутрибрюшному давлению и отсутствием воспалительной реакции тканей при имплантации вплоть до поздних сроков наблюдения.

В сериях с введением аллогенных эмбриональных фибробластов выявляется опережающее формирование фиброзной соединительной ткани, сходной по структуре с апоневротическими структурами, и рубцовых участков с низкой клеточностью и гомогенной структурой гиалинизированного межклеточного вещества. Это свидетельствует об активном индуцирующем влиянии культуральных фибробластов на дифференцировку соединительной ткани в области пластики передней брюшной стенки.

Таким образом, гистологические и морфометрические исследования тканей передней брюшной стенки, используя различные материалы для ее пластики, выявили существенные особенности течения раневого процесса при имплантации аллогенных эмбриональных фибробластов по сравнению с контрольной группой. Это проявлялось более быстрым купированием воспалительной реакции, значительно более ранней по срокам и более выраженной пролиферативной активностью фибробластов, что влекло за собой более раннее наступление фаз организации и ремоделирования соединительной ткани, создания анатомической целостности апоневротического регенерата. Эти данные позволяют сделать выводы:

1. Трансплантация аллогенных эмбриональных фибробластов в зону герниопластики количественно и качественно изменяет течение воспалительного процесса в ране, приводит к ускоренному купированию воспалительной реакции, потенцирует и ускоряет процесс созревания фиброзной ткани.

2. Применение аллогенных эмбриональных фибробластов в герниологии способствует уменьшению срока образования прочного рубца в зоне хирургического вмешательства и профилактике послеоперационных осложнений.

3. Двукратное введение культуры фибробластов дополнительно ускоряет созревание фибробластических элементов при использовании сетки «Экофлон». При использовании сеток «Эслан» и «Эсфил» данный эффект двукратного введения клеточной культуры не выявлен.

Литература

1. Келлер, Г. Сохранность инъекцируемых аутологичных человеческих фибробластов / Г. Келлер, Дж. Себастиан, Ю. Лакомбс и др. // Бюллетень эксперим. биол. и мед. – 2000. – Т. 130, № 8. – С. 203–206.
2. Колокольчикова, Е. Г. Морфологические изменения ожоговых ран после пересадки аллогенных фибробластов / Е. Г. Колокольчикова, Л. И. Будкевич, А. Э. Бобровников и др. // Бюллетень эксперим. биол. и мед. – 2001. – № 1. – С. 107–111.
3. Милонов, О. Б. Послеоперационные осложнения и опасности в абдоминальной хирургии / О. Б. Милонов, К. Д. Тоскин, В. В. Жебровский. – М.: Медицина, 1990. – 558 с.
4. Саркисов, Д. С. Теоретические и практические аспекты использования культивированных фибробластов при восстановлении кожных покровов / Д. С. Саркисов, В. Д. Федоров, Е. В. Глущенко и др. // Вестник Рос. АН. – 1994. – № 6. – С. 6–11.
5. Сухих, Г. Т. Трансплантация фетальных клеток в медицине: настоящее и будущее / Г. Т. Сухих // Бюллетень эксперим. биол. и мед. – 1998. – Т. 126. – С. 3–13. – Прилож. 1: науч. тр. «Трансплантация фетальных тканей и клеток».
6. 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.
7. Фёдоров, И. В. Протезы в хирургии грыж: столетняя эволюция / И. В. Фёдоров, А. Н. Чугунов // Герниология. – 2004. – № 2. – С. 45–52.
8. Хрупкин, В. И. Использование фибробластов для лечения гранулирующих ран / В. И. Хрупкин, А. В. Низовой, С. В. Леонов и др. // Воен.-мед. журн. – 1998. – № 1. – С. 38–42.
9. 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, № 3. – P. 245–251.
10. Jordana, M. Immune-inflammatory functions of fibroblasts / M. Jordana, B. Sarnstrand, P. J. Sime, I. Ramis // Eur. Respir. J. – 1994. – Vol. 7, № 12. – P. 2212–2222.
11. Sciaky, D. Cultured human fibroblasts express constitutive IL-16 mRNA: cytokine induction of active IL-16 protein synthesis through a caspase-3-dependent mechanism / D. Sciaky, W. Brazer, Center et al. // J. Immunol. – 2000. – Vol. 164, № 7. – P. 3806–3814.
12. Smith, R. S. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation / R. S. Smith, T. J. Smith, T. M. Blieden, R. P. Phipps // Am. J. Pathol. – 1997. – Vol. 151, № 2. – P. 317–322.



THE USE OF ALLOGENIC EMBRYONIC FIBROBLASTS WITH ARTHROPLASTY OF ANTERIOR ABDOMINAL WALL

S.V. Ivanov¹

A.A. Doljikov²

I.S. Ivanov¹

A.A. Martincev¹

¹*Kursk State Medical University*

²*Belgorod State University*

e-mail: main@kgmu.kursknet.ru

The appearance of modern synthetic prostheses allowed us to change approaches to the treatment of postoperative ventral hernias. The main disadvantage is the implantation of foreign material, into the organism and, as a result, the development of local inflammatory process. It is necessary to create the material, which leads to less inflammatory reaction while the satisfactory characteristics of strength and price are kept. The important component of wound process is getting the stable cicatrix. The introduction of cultural fibroblasts allows us to get mature connective tissue at early stages. The experimental research of synthetic prostheses from lavsan, polypropylene and polytetrafluorineethylene with the introduction of cultural fibroblasts or without it has been held on 270 white mice. They got the results of morphologic changes in according to the used type of prosthesis and fibroblasts introduction.

Key words: postoperative hernia, lavsan, polypropylene, polytetrafluorineethylene, fibroblast, endoprosthesis replacement, connective tissue.