

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОРФОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи
УДК 611.771:616-089.843-092.9

ЛЕВЭ Олег Иосифович

МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИДЕРМИСА,
ОТСЛОБЕННОГО С ПОМОЩЬЮ ОТРИЦАТЕЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ

14.00.23 – гистология, цитология, эмбриология

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва - 1993

Работа выполнена в Гродненском государственном медицинском институте и в Институте биохимии АН республики Беларусь.

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук, доцент А. А. Островский.

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук,

ведущий научный сотрудник

Е. А. Ефимов.

Кандидат медицинских наук,

старший научный сотрудник

А. Ю. Цибулевский.

Ведущее учреждение - Институт эволюционной морфологии и экологии животных им. А. Н. Северцова Российской академии наук.

Защита диссертации состоится "24" июня 1993 г. в 12 часов на заседании специализированного совета Д 001.04.01 по защите диссертаций при НИИ морфологии человека РАМН (Москва, 117418, ул. Цурупы, 3).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИ морфологии человека РАМН.

Автореферат разослан " " мая 1993 г.

Ученый секретарь

специализированного совета

кандидат биологических наук

И. Н. Емельяненко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Лечение полнослойных кожных дефектов, вызванных различными воздействиями внешней среды, одна из крупнейших проблем современной медицины. При поражении достаточно большого участка кожного покрова человека возникает вопрос о необходимости применения того или иного способа кожной пластики. В условиях нерешенности проблемы иммунологической совместимости алло- и ксеногенных трансплантатов, лишь кожный покров самого больного может быть источником пластического материала для закрытия раны. Поэтому в процессе лечения очень важно обеспечить минимальное травмирование донорского участка.

В настоящее время из вариантов свободной кожной пластики наиболее широко применяется трансплантация расщепленного кожного лоскута, полученного с помощью различных дерматомов, поскольку данный метод является одним из наиболее простых и надежных. Однако при его использовании донорский участок повреждается все же достаточно сильно. Процесс взятия трансплантата нуждается в обезболивании. Полное заживление донорского участка наступает через 2-4 недели, оставляя в последующем зону гипер- или депигментации (Золтан Я., 1984). Перечисленные недостатки дерматомной кожной пластики оставляют по-прежнему актуальной проблему уменьшения степени травматизации донорского участка при получении кожных трансплантатов.

Для экспериментальной дерматологии также нужны простые методы получения различных трансплантатов, включая чисто эпидермальные. В настоящее время для этих целей широко используется механическое отделение эпидермиса от дермы после помещения лоскута кожи в культуральную среду, содержащую различные протеолитические ферменты или этилендиаминтетраацетат (Kitano Y. et al., 1983; Baker K. W. et al., 1983; Longley J. et al., 1981). Однако с помощью этой процедуры крайне трудно отслоить эпидермис у покрытых перстью животных. Кроме того, поскольку для получения эпидермального пласта таким путем нужно предварительно срезать кожный лоскут, данный метод не может быть

использован в клинике.

Весьма перспективным методом получения кожных трансплантатов является выращивание их *in vitro*. После его первого применения в лечении ожогов кожи человека в начале 80-х годов (O'Connor N. E. et al., 1981), данный метод интенсивно совершенствуется в настоящее время. Основное его преимущество связано с возможностью получения из относительно небольшого биоптата трансплантата такого размера, который способен закрыть всю поверхность тела обожженного человека (Pittelkow M. R. et al., 1986; Kusagai H. et al., 1988; Cerny M., 1987). Однако предложенный метод очень трудоемок, требует наличия специального оборудования и подготовленного персонала. Значительным недостатком является большой промежуток времени, проходящий с момента взятия биоптата до трансплантации. Все это существенно ограничивает возможности широкого распространения упомянутого метода (Туманов В. П. и др. 1988, 1989).

В связи с этим, по-прежнему сохраняет актуальность проблема разработки новых, минимально травматичных методов получения кожных трансплантатов и изучения их свойств. Уменьшению остроты данной проблемы может способствовать использование отрицательного давления для получения кожных трансплантатов. Первые сообщения о возможности образования пузырей на коже здорового человека под воздействием неполного вакуума появились в 60-х годах (Slowey S. et al., 1961; Kiistala U. et al., 1964), а первые работы, в которых бы использовались их крышки в качестве трансплантата - значительно позже (Falabella R., 1971, 1984; Koga M., 1988). Однако с морфологической точки зрения такие трансплантаты не изучались. Остается много не выясненного также в вопросе о морфо-функциональном состоянии вакуумно отделенного эпидермиса, оставленного в различных условиях на донорском участке.

В связи со всем, указанным выше, возникла необходимость на основе предварительно разработанных методик вакуумной отслойки и трансплантации эпидермиса человека и крыс изучить изменения его морфо-функционального состояния в различных условиях после данных процедур. Последнее имеет существенное значение для экспериментальной и клинической практики.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: оценить морфо-функциональное состояние эпидермиса после вакуумной отслойки и возможность использования его в качестве трансплантата.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Изучить динамику изменения структуры компонентов кожно-вакуумных пузырей крыс.
2. Охарактеризовать процессы, происходящие в отслоенном эпидермисе крыс, помещенном после вакуумной отслойки на прежнее место.
3. Изучить изменение морфо-функционального состояния вакуумноотделенного эпидермиса человека в составе крыш кожно-вакуумных пузырей.
4. Охарактеризовать развитие вакуумноотслоенного эпидермиса крыс, аутотрансплантированного непосредственно после отслойки на поверхность подкожной клетчатки.
5. Охарактеризовать особенности развития эпидермиса человека после ксенотрансплантации на поверхность подсослойного кожно-го дефекта.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА. Впервые современными количественными методами изучено изменение основных структурных компонентов кожно-вакуумных пузырей крыс. Показано, что скорость гибели эпидермиса в составе крыш пузырей зависит от лейкоцитарного состава пузырной жидкости.

В эксперименте на животных продемонстрированы особенности развития вакуумноотслоенного эпидермиса на поверхности интактной дермы с сохраненной базальной мембраной и на поверхности клетчатки. Показано, что отслоенный эпидермис, размещенный на поверхности дермы, быстро приобретает черты интактного эпидермиса, тогда как на клетчатке, поверхностные слои которой перестраиваются в грануляционную ткань, длительное время остается в состоянии гиперплазии.

Впервые изучено изменение морфо-функционального состояния вакуумноотделенного эпидермиса человека в составе крыш кожно-вакуумных пузырей. Показано, что после отслойки и сопутствовавшей этому частичной травматизации, регенерация эпи-

дермиса в составе крыш образовавшихся пузырей и развитие признаков дифференцировки осуществляется без пролиферации.

Дана морфо-функциональная характеристика ранних стадий развития эпидермотрансплантата человека, полученного в результате вакуумной отслойки.

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РАБОТЫ.

В результате проведенного исследования расширены представления о клеточных основах реакций эпидермиса в ответ на травмирующие влияния и различные условия развития.

На примере крыс показано, что судьба вакуумноотслоенного эпидермиса зависит от того, в каких условиях он окажется в последующем: в отслоенном эпидермисе, размещенном на своем прежнем месте, практически все кератиноциты сохраняют жизнеспособность и быстро приживаются; в эпидермисе, перенесенном на поверхность стерильной клетчатки, некоторая часть из них погибает, большая же часть развивается, а сам эпидермотрансплантат длительное время остается в состоянии гиперплазии; в эпидермисе, оставленном в приподнятом состоянии, кератиноциты базального слоя погибают в течение 1-2 суток. Это подтверждает господствующее в настоящее время представление о том, что в целом структурная реакция эпидермиса определяется основой, на которой происходит его развитие.

Кератиноциты эпидермиса человека, оказавшись в составе крыш пузыря, регенерируют, перестраиваются и дифференцируются, но не делятся. Лишь через 3 суток некоторая часть клеток начинает погибать, остальные и на этот срок сохраняют признаки жизнеспособности. Это подтверждает представление о структурно-функциональной разнородности кератиноцитов в пределах росткового слоя эпидермиса человека.

Показаны черты сходства и различия в развитии вакуумноотслоенного и трансплантированного эпидермиса человека и крыс. Первые из них связаны с началом пролиферативных процессов после размещения эпидермиса на поверхности рецептивного ложа, вторые - с различной интенсивностью процессов пролиферации и разной скоростью развития деструктивных процессов в

составе крыш кожно-вакуумных пузырей.

Полученные данные показывают, что предварительно разработанные модели отслойки и трансплантации эпидермиса у экспериментальных животных позволяют проводить широкие исследования по изучению его морфо-функциональных свойств.

Экспериментально подтверждена возможность использования вакуумноотслоенного эпидермиса человека в качестве полноценного кожного трансплантата.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ. Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

-Гродненских областных конференциях молодых ученых и специалистов, Гродно, 1980, 1981, 1983г.

-2-м съезде анатомов, гистологов и эмбриологов Беларуси, Минск, 1981г.

-Гродненском областном обществе анатомов, гистологов и эмбриологов, Гродно, 1983г.

Работа была рассмотрена и обсуждена в научно-исследовательском институте морфологии человека РАМН.

По теме диссертации опубликовано 6 работ. Имеется авторское свидетельство на изобретение.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов, изложения результатов исследований, их обсуждения, выводов и списка литературы. Материал изложен на 110 страницах машинописного текста. Работа содержит 22 таблицы, иллюстрирована 4 графиками, 49 электронно-микроскопическими и светооптическими микрофотографиями. Список цитированной литературы включает 281 наименование, из них 189 иностранных авторов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В процессе выполнения данного исследования во всем объеме использовано 280 беспородных крыс-самок массой 180-240 г., ряд явлений изучен у 146 мужчин, в возрасте 18-23 лет. В процессе манипуляций требовавших обезболивания или обездвиживания животных использовали эфирный наркоз. У человека ввиду незначительной болезненности процедур отслойки и взятия крыш пузырей, обезболивающие мероприятия не проводились.

Распределение материала по сериям, методам исследования и срокам изучения представлено в таблице I.

Т а б л и ц а I.
ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗУЧЕННОГО МАТЕРИАЛА

Экспериментальные серии	:Ко- :ли- :чес- :тво	:Ко- :ли- :чес- :тво	:Сроки :наблю- :дения, (сут.)	:Методы :иссле- :дова- :ния *
	:крыс	:лю-	:	:
	:дей	:	:	:
1	2	3	4	5

ПРОЦЕССЫ НА КОЖЕ ПОСЛЕ ОТСЛОЙКИ ЭПИДЕРМИСА

У крыс:				
1. При оставлении эпидермиса в приподнятом состоянии.	43	-	0-5	А, В, С
2. После удаления жидкости из пузырей.	42	-	0-5	А, В, С
3. Контрольные группы.	46	-	0-5	А, В, С
У человека:				
4. После оставления эпидермиса в приподнятом состоянии.	-	84	0-3	А, С, Д

РАЗВИТИЕ ЭПИДЕРМИСА ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

1. Аутотрансплантация у крыс.	87	-	1-28	А, В, С
2. Ксеенотрансплантация эпидермиса человека крысам.	62	62	1-7	А, В, С

Всего: 426 биологических объектов (280 крыс и 146 людей)

- *: А - световая микроскопия,
В - тритий-тимидиновая автордиография,
С - морфометрия гистологических препаратов,
Д - электронная микроскопия.

Для изучения процессов, происходящих на коже крыс, у животных в межлопаточной области выщипывали шерсть и с помощью вакуумной камеры отслаивали эпидермис на площади около 2 кв. см, который либо оставляли в приподнятом над дермой состоянии, либо размещали на прежнем месте (сосочковый слой дермы), удаляя из образовавшихся пузырей жидкость.

Дополнительно использовали два контроля. Животных первой контрольной группы использовали для того, чтобы выяснить в какой степени манипуляции, связанные с подготовкой крыс к отслойке эпидермиса, влияли на динамику изменений структурных показателей. Вторую контрольную группу составили крысы, у которых лишь выщипывали шерсть непосредственно перед взятием участка кожи для исследования.

Животных всех групп за исключением второй контрольной забивали либо непосредственно после окончания всех манипуляций (срок 0 часов), либо через 1, 2, 3, 5 суток. В межлопаточной области на месте соответствующих воздействий вырезали прямоугольный участок кожи для дальнейших гистологического и радиоавтографического исследований. У крыс второй контрольной группы непосредственно после удаления шерсти брали два участка кожи: с правого бока и из межлопаточной области.

Вакуумную отслойку эпидермиса у человека осуществляли так, чтобы получить 3-4 пузыря на внутренней поверхности плеча, диаметром 5-5,5 мм. Затем либо непосредственно после прекращения воздействия отрицательного давления, либо спустя 1, 3, 6, 12, 24, 48 и 72 часа крышки пузырей с помощью глазных ножниц подрезали по всему периметру и использовали для проведения гистологического исследования, в интервале 0, 1, 2 и 3 суток - для электронно-микроскопического.

Для изучения развития аутотрансплантированного эпидермиса крыс, последний после отслойки на боку животного с помощью специальной подложки переносили на раневую поверхность, предварительно подготовленную в межлопаточной области. Животных с целью последующего гистологического исследования структуры эпидермотрансплантата забивали через 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 20 и 28 суток по 6-8 на срок. В этой же серии 24 крысы готовили для автордиографического исследования и забивали по од-

ной с интервалом 6 часов, начиная с двухчасового промежутка после трансплантации.

Для изучения развития ксенотрансплантированного эпидермиса человека, его после отслоения с помощью отрицательного давления на внутренней поверхности плеча мужчин переносили с помощью специально разработанной петли с изменяющейся конфигурацией на предварительно подготовленное рецептивное ложе крысы. При этом островки донорского эпидермиса последовательно укладывали один за другим впритык вдоль сагитальной линии на поверхности рецептивного ложа и тщательно расправляли. Для гистологического исследования ксеноэпидермотрансплантата крыс забивали через 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7 суток после трансплантации по 5-6 штук на срок. Для автордиографического исследования 24 крысы забивали по одной с 6-часовым интервалом, начиная с двухчасового интервала после трансплантации.

В процессе изучения препаратов на светооптическом уровне дополнительно определяли ряд морфометрических показателей, характеризующих обшеморфологические признаки эпидермиса, процессы удаления некротических масс, внутриклеточной регенерации, миграции, пролиферации, дифференцировки кератиноцитов. При этом использовали известные методики (Автандилов Г. Г., 1973).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ПРОЦЕССЫ НА ДОНОРСКОМ УЧАСТКЕ ПОСЛЕ ВАКУУМНОЙ ОТСЛОЙКИ ЭПИДЕРМИСА.

В отличие от животных контрольных групп, у крыс, подвергшихся местному воздействию отрицательного давления на большей части поверхности кожи происходила отслойка эпидермиса. В последующем во всех компонентах образовавшихся пузырей наблюдались выразительные динамичные процессы в течение всего срока наблюдения.

Так, при изучении препаратов, полученных от крыс, забитых непосредственно после прекращения всех манипуляций, 59,4% поверхности дермы было лишено эпидермиса (табл. 2), поскольку все слои последнего, оторвавшись от нее, образовывали крыши

Т а б л и ц а 2.

ФОРМИРОВАНИЕ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ПОКРЫТИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ ДЕРМЫ
В ДВУХ УСЛОВИЯХ ПОСЛЕ ВАКУУМНОГО ОТСЛОЕНИЯ ЭПИДЕРМИСА

С	Приподнятое состояние		Отслоенное состояние	
Р	эпидермиса		эпидермиса	
О				
Код-ва-ри-ант	Доля по-верхности дермы (%), не покры-тая эпи-дермисом	Доля по-верхности кожи (%), с отслоен-ным эпи-дермисом	Доля по-верхности дермы (%), не покры-тая эпи-дермисом	Доля по-верхности кожи (%), с отслоен-ным эпи-дермисом
0	П 1		П 5	
сут	59,4±3,47		34,3±4,41	
n	9		9	
			P1=0,3838*	
1	П 2	П 4	П 6	П 8
сут	2,96±0,65	45,3±3,98	0,16±0,09	12,4±2,84
n	9	9	9	8
	P1=0,0000*	P1=0,0171	P5=0,0000	P5=0,0000
			P2=0,0006	P4=0,0000
2	П 3		П 7	
сут	0,00±0,00		0,00±0,00	
n	10		9	
	P2=0,0013		P6=0,1516	

*Примечание: показатель достоверности (P) с номером переменной (П), относительно которой определена достоверность.

пузырей. При этом сосочковый слой дермы не был поврежден и не имел на своей поверхности ни клеток, ни их остатков. Большинство кератиноцитов базального, инноватого и зернистого слоев в составе крыш пузырей содержали по одной крупной центрально расположенной вакуоли, деформировавшей ядро. Кератиноциты с вакуолями часто встречались и на территории участков кожи между пузырями. Это свидетельствовало, что вакуолизация кератиноцитов предшествовала отделению эпидермиса.

Через сутки после отслойки 83,8% поверхности дна пузырей было покрыто новым эпителием в 1-2 клеточных слое, в которых шли процессы синтеза ДНК. В базальном слое появились первые делящиеся митозом клетки. Источником формирования нового эпителиального покрытия поверхности дермы, судя по доле меченых клеток, были прежде всего наружные корнивые влагалища волос-

ных фолликулов (доля меченых клеток в базальном слое новообразованного эпидермиса дна пузырей составила 183,6 %, а в базальном слое верхнего фрагмента корневых влагалищ - 381,2 %). В крыше пузырей часть кератиноцитов сохранили признаки жизнеспособности, однако меченые клетки там не встречались. Причем доля клеток с признаками жизнеспособности коррелировала с долей нейтрофильных лейкоцитов в составе пузырной жидкости ($r = -0,800$; $P = 0,0001$).

Через 2 суток после отслойки эпителий, выросший на дно пузырей нередко состоял уже из 3-5 клеточных слоев, причем во многих клетках обнаруживались кератогмалиновые гранулы. По сравнению с первыми сутками в последующие двое суток количество меченых клеток резко снижалось и к третьим суткам после отслойки приходило к значениям не отличающимся достоверно от контрольных (доля меченых клеток в базальном слое новообразованного эпидермиса дна пузырей составила 85,3 %, а в базальном слое верхнего фрагмента корневых влагалищ - 76,0 %). Через 5 суток на большинстве участков кожи практически невозможно было отличить эпидермис, который не был отслоен, оказавшись в промежутке между пузырями, от эпидермиса, новообразованного на месте дна пузыря.

У животных второй подопытной группы на срок 8 суток на 54,3 % поверхности дермы можно было найти отслоенный эпидермис. Большинство кератиноцитов в его составе также были вакуолизированы. Однако в данном случае между отслоенным эпидермисом и соответствующей ему поверхностью дермы было видно лишь щелевидное пространство. У крыс этой подопытной группы уже через сутки на большей части протяжения сосочкового слоя дермы не только находился эпидермис, но имел в большинстве своем практически нормальный вид и интенсивно накапливал радиоактивную метку (доля меченых клеток в базальном слое эпидермиса дна пузырей составила 149,2 %). Интенсивно мечеными и в этом случае были клетки базального слоя верхнего фрагмента наружных корневых влагалищ волосяных фолликулов (311,4 %). Через 2-5 суток после отслойки эпидермиса и удаления жидкости из пузырей в препаратах трудно было найти какие-либо признаки, отличающие отслаивавшийся ранее эпидермис от интактного.

В том числе количество меченых клеток к третьим суткам после отслойки приходило к значениям не отличающимся достоверно от контрольных (доля меченых клеток в базальном слое эпидермиса дна пузырей составила 70,0 %, а в базальном слое верхнего фрагмента корневых влагалищ - 74,78 %).

Рассматривая в сравнительном аспекте процессы, протекающие на коже крыс после вакуумной отслойки эпидермиса, следует обратить внимание на то, что доля поверхности дермы, не покрытая эпидермисом на нулевые сутки у крыс 1-й группы была на 14% больше доли поверхности кожи с отслоенным эпидермисом через сутки (табл. 2, переменные 1 и 4). Это позволяет предположить, что приблизительно на такую величину на части поверхности дермы был вторично восстановлен эпидермальный покров за счет спадения мелких пузырей и приживления эпидермиса их крыш. Это же сопоставление во 2-й подопытной группе (переменные 5 и 8) позволяет утверждать, что около 42% эпидермального покрытия могло повторно восстановиться на поверхности дермы за счет повторного приживления эпидермиса крыш кожно-вакуумных пузырей, из которых была выдавлена жидкость. Рассмотренное сопоставление, а также ряд других морфометрических показателей свидетельствует в пользу способности вакуумноотслоенного эпидермиса повторно приживаться на поверхности сосочкового слоя дермы, ускоряя восстановление эпидермального покрытия на ней. Учитывая это, а также то, что эпидермис быстрее разрастается на дне сохранных пузырей в сравнении с состоянием, когда крыши удалены (Кравчук Н. С., 1971), возникает основание для предложений по поводу тактики хирургов и дерматологов, когда им приходится иметь дело с состояниями кожи, одним из основных клинических признаков которых - наличие пузырей, крыши которых представлены жизнеспособным эпидермисом, а полость содержит стерильную жидкость. Если существует возможность обеспечения неподвижного состояния эпидермиса при его размещении на прежнем месте, а причина, вызвавшая образование пузырей устранена, то в этом случае их можно вскрыть и прижать. Если таких условий создать не удастся и есть уверенность, что жидкость пузыря не будет инфицирована, пузырь лучше оставить в интактном состоянии. Выполнение этих условий будет способ-

ствовать ускоренной реэпидермизации поверхности кожи.

В эпидермисе человека непосредственно после вакуумного отделения и оставления в приподнятом состоянии, также как у крыс, присутствовали все клеточные слои, имеющиеся в интактном состоянии. Однако при этом выявлялись признаки травмирования клеток, особенно в базальном и шиповатом слоях. В первом в значительной части клеток была повреждена базальная поверхность, во втором - в подавляющем большинстве клеток была видна крупная, круглая, центрально расположенная вакуоля, оттеснявшая к периферии и деформировавшая ядро. При электронно-микроскопическом исследовании было установлено, что вакуоли были окружены мембраной и неизменно находились около ядра, которое приобретает полулунную форму. Вакуоли не включали перинуклеарного пространства, как можно было предположить на основе светоптических данных, а образовывались за счет расширения и слияния цистерн эндоплазматической сети.

Через 3 часа после отделения в базальном слое эпидермиса в составе крыши пузыря уже достаточно четко различались клетки с признаками гибели. Они занимали около 50% площади базальной поверхности эпидермиса (табл. 3) и, в отличие от жизнеспособных клеток, сохраняли изрезанный контур базального края. Их цитоплазма, как правило, была оксифильной, просветленной, ядра находились в состоянии кариопикноза и карioreк-сиса. Наблюдалось групповое расположение погибающих и жизнеспособных клеток, что может быть объяснено неодинаковой степенью развития полудесмосом у различных групп базальных кератиноцитов (Lavker R. M. et al., 1982; Schulze H.-J. et al., 1991). Через 12 часов после отслойки эпидермиса основным процессом, происходящим в базальном слое, было распластывание жизнеспособных клеток по поверхности шиповатого слоя, приводящее к 24 часам экспозиции к восстановлению непрерывности базального слоя (табл. 3). На этот срок остатки погибших клеток, расположенные группами или по-отдельности, нередко можно было встретить вытесненными на поверхности восстановленного базального слоя.

Спустя еще сутки (48 часов экспозиции) в толще эпидермиса начала возрастать объемная доля участков с признаками нек-

Т а б л и ц а 3.
ИЗМЕНЕНИЕ ВО ВРЕМЕНИ ОХАРАКТЕРИЗОВАННЫХ КОЛИЧЕСТВЕННО
ПРИЗНАКОВ СТРУКТУРЫ ОТДЕЛЕННОГО ЭПИДЕРМИСА ЧЕЛОВЕКА

Вре- мя экс- пози- ции (часы)	Общая толщина базально- го, шипо- ватого и зернисто- го слоев (мм)	Доля по- верхности эпидерми- са, покры- тая жизне- способными базальными клетками (%)	Индекс ! формы кле- точных ядер в ба- заль- ном слое	Шиповатый слой		
				Объемная доля некроти- ческих участков (%)	Относи- тельное число клеток без ва- куолей (%)	Доля кле- точных ядер с ядрыш- ками (%)
0 ч	30,1	-	-	-	10,8	-
ш	0,99				1,11	
1 ч	29,6	-	-	-	21,4	-
ш	1,37				1,05	
3 ч	29,3	48,4	1,15	1,46	38,0	22,7
ш	1,00	1,24	0,04	0,50	1,23	1,01
6 ч	28,2	48,1	1,45	1,58	38,5	34,3
ш	1,02	2,49	0,05	0,33	1,03	1,30
12 ч	25,5	60,5	2,38	2,33	39,4	34,1
ш	1,32	1,84	0,09	0,45	1,25	2,06
24 ч	24,5	84,7	4,04	5,58	50,8	20,1
ш	1,14	1,98	0,17	1,89	2,17	1,82
48 ч	21,8	82,5	4,46	20,0	73,7	8,00
ш	1,32	2,61	0,18	2,42	1,64	0,79
72 ч	24,2	45,4	-	55,7	71,2	4,50
ш	1,79	5,02		3,18	3,18	0,75

роза клеток (табл. 3). В цитоплазме некоторых из клеток появились специфические кератогиалиновые гранулы, причем нередко в кератиноцитах, расположенных на границе с базальным слоем. Наличие этих гранул в кератиноцитах, расположенных базально, было подтверждено электронно-микроскопически через 72 часа после отслойки. В целом же морфологическая картина эпидермиса в составе крышки пузыря была достаточно пестрой на данный срок и характеризовалась преобладанием процессов деструкции. В течение всего срока исследования вакуумноотслоенного эпидермиса человека не было выявлено никаких признаков пролиферации кератиноцитов.

РАЗВИТИЕ ВАКУУМНО ОТСЛОЕННОГО ЭПИДЕРМИСА ПОСЛЕ
ТРАНСПЛАНТАЦИИ.

Через сутки после аутографта трансплантации эпидермис крыс, оказавшийся на поверхности подкожной клетчатки, состоял в основном из 1-3 рядов ядродержащих жизнеспособных клеток и рогового слоя, причем последний практически всегда был складчатым. Зернистый слой был прерывистым. На этот срок не встречались фигуры митотического деления клеток, которые появились на 2-е сутки, а некротические участки элиминировались к 3-м суткам. Через 5-10 суток после трансплантации в эпидермисе на различных участках можно было насчитать от 4 до 10 слоев клеток. Зернистый слой практически на всем протяжении был непрерывным и состоял из 1-4 рядов клеток, часто содержащих крупные кератогиалиновые гранулы. В трансплантате между зернистым слоем эпидермиса и старым роговым слоем можно было обнаружить новый роговой слой. Через 14-28 суток после трансплантации толщина эпидермиса и количество рядов клеток в нем сильно колебались на протяжении одного и того же препарата, хотя в эпидермисе на большинстве участков встречались все его слои. Клетки базального слоя оставались мельче и чаще были вытянутыми вдоль поверхности рецептивного ложа в отличие от таковых в интактной коже. Была заметна избыточная мононуклеарная инфильтрация в толщу эпидермотрансплантата. На тех участках, где длительно не удалялся роговой слой, он был достаточно мощным.

Краткое обобщение динамики основных количественных показателей, характеризующих структуру эпидермиса в течение месяца после его трансплантации представлено в таблице 4. Видно, что величина большинства из показателей нарастала к определенному сроку, а затем медленно уменьшалась. Так, число ядер с ядрышками в толще шиповатого слоя было максимальным на 3-5-е сутки и достигало более 65%. Пик митотического индекса наблюдался на 3-5-е сутки и превысил 2,5%, достоверно отличаясь от такого же показателя как на 2-е, так и 7-28-е сутки. Доля клеток, содержащих кератогиалиновые гранулы, среди общего числа клеток супрабазальных слоев была максимальной на 3-7-е сутки и составила около 20 %, а общая толщина базально-

Т а б л и ц а 4.
ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ ЭПИДЕРМИСА КРС, АУТОТРАНСПЛАНТИРОВАННОГО
НА ПОВЕРХНОСТЬ КЛЕТЧАТКИ

С	У	Т	К	Н	Общая тол- щина ба- зального, шиповато- го, зер- нистого слоев (мкм)	Доля по- верхности эпидерми- с жизне- способным базальным слоем (%)	Митоти- ческий индекс в базаль- ном слое (%)	Доля ядер с ядрыш- камн в шипо- ватом слое (%)	Доля кле- ток с гра- нулами ке- ратинофи- ла в суп- рабазаль- ных слоях (%)
1	н				14,4	64,8	0,0	56,1	4,40
	в				1,6	4,8	0,0	2,2	0,72
2	н				17,6	81,6	14,4	64,0	17,60
	в				0,9	3,0	3,6	3,7	1,98
3	н				24,1	100,0	28,1	69,0	21,40
	в				1,7	0,0	4,4	4,0	2,43
5	н				42,3	-	25,4	57,0	10,70
	в				2,8	-	3,7	2,7	2,32
7	н				47,7	-	9,2	55,0	10,22
	в				5,0	-	2,3	2,7	1,80
10	н				47,5	-	0,1	50,1	10,00
	в				5,2	-	2,0	2,5	2,25
14	н				46,1	-	0,4	50,2	15,27
	в				3,4	-	1,0	1,5	2,23
20	н				43,1	-	0,0	52,0	12,30
	в				2,0	-	2,0	2,3	1,90
28	н				41,6	-	0,3	45,7	11,00
	в				2,1	-	1,0	3,0	0,90

го, шиповатого и зернистого слоев эпидермиса - на срок 7-16 суток. С учетом совокупности всех этих показателей временной промежуток между 5-ми и 7-ми сутками соответствует пяду мак- симального развития эпидермотрансплантата. Аутотрансплантиро- ванный эпидермис даже через месяц после пересадки, в отличие от состояния, когда он был размещен на поверхности кожи, ос- тавался в гиперплазмированном состоянии (большое количество рядов клеток, непрерывный зернистый слой). Это позволяет ут- верждать, что грануляционная ткань, хотя и обеспечивает ос-

новные условия для жизнедеятельности, развития и специфической гистодифференцировки эпидермиса, но, в то же время, она является далеко не адекватной дерме. Полученные данные в целом согласуются с таковыми других авторов (Briggaman R. A., 1982; Lenoir M. C. et al., 1985).

При радиоавтографическом исследовании установлено, что первые меченные клетки при аутотрансплантации были обнаружены сначала в развивающейся грануляционной ткани (срок - 20 часов после трансплантации эпидермиса), а первые меченые кератиноциты появились в базальном слое еще спустя 8 часов. Средняя интенсивность мечения ядер кератиноцитов крыс примерно была равна интенсивности мечения ядер фибробластов формирующейся грануляционной ткани рецептивного ложа. После появления первых меченых клеток в базальном слое эпидермотрансплантата их доля быстро достигала 20-25% к концу вторых суток и оставалась в этих пределах вплоть до начала 4-х суток. Затем вплоть до конца исследования доля меченых клеток в базальном слое эпидермотрансплантата постепенно снижалась до 7-10%. Однако она оставалась высокой по краям эпидермотрансплантата.

Островки эпидермиса человека, оказавшиеся на поверхности клетчатки крысы и находившиеся там в течение суток, состояли из всех слоев, характерных для интактного эпидермиса, а клетки в их составе в большинстве своем сохраняли основные признаки жизнеспособности. В то же время в базальном и шиповатом слоях встречались участки с явными признаками гибели клеток. Митозы на данный срок еще отсутствовали. Зернистый слой был представлен одним прерывистым рядом клеток. Через 2 суток в базальном слое эпидермиса нередко обнаруживались фигуры митотического деления клеток. В цитоплазме части верхних клеток шиповатого слоя обнаруживались многочисленные, очень мелкие кератогиалиновые гранулы. К 3-м суткам полностью элиминировались погибшие во время отслойки эпидермиса клетки. В составе части клеток рогового слоя обнаруживались ядра. Однако уже спустя сутки (4 суток после ксенотрансплантации) не происходило дальнейшего роста митотической активности кератиноцитов трансплантированного эпидермиса и увеличения числа содержащих кератогиалиновые гранулы клеток, а начиная с 5-х суток и

вплоть до 7-х доля митотически делящихся клеток в составе трансплантированного эпидермиса, а также число клеток с кератогиалиновыми гранулами постепенно уменьшалось. На срок 7 суток большинство участков эпидермиса человека оказывалось полностью разрушенными.

По данным морфометрии трансплантированный эпидермис крысы пузырей человека также активно развивался на поверхности рецептивного ложа первые трое суток (табл. 5). Росла митотическая активность. К трети суткам полностью элиминировались некротические участки из шиповатого слоя, восстанавливалась целостность жизнеспособного базального слоя. С 4-х суток, процесс развития эпидермиса замедлялся, а с 5-х начинался процесс деструкции трансплантата.

Т а б л и ц а 5.
СТРУКТУРА КСЕНОТРАНСПЛАНТИРОВАННОГО ЭПИДЕРМИСА ЧЕЛОВЕКА

С У Т К И	Общая тол- щина ба- зального, шиповато- го, зер- нистого слоев (МКМ)	Доля по- верхности эпидерми- с жизне- способным базальным слоем (%)	Митоти- ческий индекс в базаль- ном слое (%)	Доля ядер с ядрыш- ками в шипо- ватом слое (%)	Доля клеток с керато- гиалиновы- ми грану- лами в су- пербазаль- ных слоях (%)
1 И	46,2	75,2	8,88	75,9	4,38
в	3,15	5,16	8,88	4,33	1,42
2 И	53,4	93,3	9,28	79,9	9,55
в	1,88	1,94	2,47	2,68	1,33
3 И	58,1	100,0	15,8	67,9	19,8
в	3,71	0,0	1,76	5,89	3,18
4 И	57,1	-	11,8	62,8	19,6
в	1,54	-	1,69	4,48	1,74
5 И	48,4	-	7,45	58,7	16,7
в	2,67	-	1,45	3,17	2,45
6 И	46,3	-	4,88	58,6	10,6
в	2,89	-	0,57	4,21	3,15

В ксенотрансплантированном эпидермисе человека, так же как и в опыте с аутотрансплантацией крысиного эпидермиса, первые меченные клетки были обнаружены сначала в развивающейся грануляционной ткани (срок - 28 часов после удаления полноклойного кожного лоскута и трансплантации эпидермиса), а первые меченные кератиноциты появились в базальном слое ксеноэпидермотрансплантата спустя еще 6 часов (1 сутки и 2 часа после трансплантации). Однако в отличие от аутотрансплантированного эпидермиса крыс средняя интенсивность мечения ядер кератиноцитов человека, определяемая по количеству зерен серебра, расположенных над ядрами меченых клеток, с самого начала была и в течение всего срока исследования оставалась несколько ниже, чем ядер фибробластов формирующейся грануляционной ткани рецептивного ложа, что можно объяснить видовыми особенностями эпидермиса человека. После появления первых меченых клеток в базальном слое эпидермотрансплантата их доля быстро достигала 12-16% к концу вторых суток и оставалась в этих пределах вплоть до начала 4-х суток. Затем вплоть до конца исследования (конец 8-х суток) доля меченых клеток базальном слое эпидермотрансплантата постепенно снижалась до 4%. В супрабазальном слое ксеноэпидермотрансплантата в отличие от крысиного аутоэпидермотрансплантата меченые клетки к началу 6-х суток перестали выявляться.

Таким образом данное исследование подтвердило, что эпидермис человека и крыс в целом сохраняет свою жизнеспособность после вакуумной отслойки. Его структурная перестройка в последующем определяется главным образом условиями его дальнейшего развития. С практической точки зрения важно, что отслоенный с помощью отрицательного давления эпидермис является полноценным кожным трансплантатом.

ВЫВОДЫ

1. Вакуумно отслоенный эпидермис человека и крыс может быть эффективно использован в качестве полноценного кожного трансплантата.
2. Пузыри, образующиеся под воздействием отрицательного давления на коже крыс, характеризуются мелкими размерами и обладают тенденцией к спадению в результате реабсорбции жидкости. В составе крыш неспавшихся пузырей в течение 1-2 суток происходит гибель эпидермиса. За это время их дно покрывается новым многослойным эпидермисом.
3. После повторного приведения отслоенного эпидермиса крыс в контакт с поверхностью дермы, он успешно приживается на прежнем месте и быстро приобретает черты исходного состояния, обеспечивая ускоренное заживление поверхности кожи.
4. Большая часть эпидермоцитов человека после вакуумной отслойки сохраняет жизнеспособность. В кератиноцитах, оказавшихся в составе крыш кожно-вакуумных пузырей исчезают первоначально возникшие вакуоли, перестраивается тонофибрилярная сеть и десмосомы, формируются признаки дифференцировки. В ростковом слое кератиноциты распластываются и вытесняют погибшие клетки в полость пузыря. Все эти преобразования происходят в отсутствие пролиферации. К концу 3-х суток в толще крыш пузырей нарастают деструктивные явления.
5. Вакуумно отслоенный эпидермис крыс, аутооттрансплантированный на поверхность стерильной клетчатки приживается и развивается на новом месте. Кератиноциты в его составе активно делятся и типично дифференцируются. Эпидермотрансплантат проходит фазу наиболее активного развития в интервале 5-10 суток, а затем по своей структуре начинает постепенно возвращаться к норме, однако даже через месяц его гистоструктура полностью не восстанавливается.
6. Вакуумно отслоенный эпидермис человека, ксенотрансплантированный на поверхность полнослойного кожного дефекта, активно развивается в течение первых 3-4 суток. Большинство кератиноцитов росткового слоя в его составе делится и типично дифференцируется. Явные признаки отторжения ксенотрансплантата появляются к 7-м суткам.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. ЛЕВЭ О.И., ОСТРОВСКИЙ А.А. Структурные преобразования ксенотрансплантированного эпидермиса человека // Материалы 6-й Гродненской областной конференции молодых ученых и специалистов "Наука-практике". - Гродно, 1990. - С.68.
2. ЛЕВЭ О.И., ШАТРОВА В.О., ОСТРОВСКИЙ А.А. Преобразования структуры эпидермального аутотрансплантата у лабораторных крыс // Материалы 6-й Гродненской областной конференции молодых ученых и специалистов. - Гродно, 1990. - С.69.
3. ОСТРОВСКИЙ А.А., ЛЕВЭ О.И., ШАТРОВА В.О. Развитие аутоэпидермотрансплантата на поверхности некоторых видов рецептивного ложа в эксперименте // 2-й съезд анатомов, гистологов и эмбриологов БССР. - Мн., 1991. - С.134.
4. ЛЕВЭ А.І., АСТРОУСКІ А.А. Эпітэлізацыя паверхні дэры пасля адслаення эпідэрыміса і яго выдалення // Матэрыялы 7-й гродзенскай абласной канферэнцыі маладых вучоных і спецыялістаў. - Гродна, 1991. - С.14.
5. ЛЕВЭ О.И., ОСТРОВСКИЙ А.А., ШАТРОВА В.О. Восстановительные процессы на коже крыс после отслоения эпидермиса с помощью отрицательного давления, удаления жидкости из образовавшихся пузырей или их крыш / Гродн. мед. ин-т. - Гродно, 1992. - 40 с. Деп. в ВИНТИ 06.05.92, N. 1495-В 92.
6. ОСТРОВСКИЙ А.А., ЛЕВЭ О.И. Развитие и деструкция эпидермиса человека, ксенотрансплантированного лабораторным крысам // Морфология. - 1992. - N1. - том 102. - с. 78-83.
7. ОСТРОВСКИЙ А.А., ЛЕВЭ О.И., ШАТРОВА В.О. Развитие мекфолликулярного эпидермиса крыс после аутотрансплантации // Морфология. - 1992. - N6. - с. 105-112.
8. ЛЕВЭ А.І., АСТРОУСКІ А.А. Праліферацыя керацінацытаў вакуумнаадслаенага эпідэрымісу чалавека і пацукоў пасля трансплантацыі // Матэрыялы 8-й гродзенскай абласной канферэнцыі маладых вучоных і спецыялістаў. - Гродна, 1993. - С.10.

Основные показатели изобретательской деятельности

1. А.с. N.1718884 "Устройство для трансплантации крыш кожно-вакуумных пузырей" на заявку на изобретение N.4894795/14, приоритет от 20 марта 1990г.
Опубл. 15.03.92 г. Булл. изобретений N.10, 1992 г.
Соавторы: Островский А.А., Мехамед В.Д.