IN VIVO STUDY OF HUMAN ACELLULAR DERMIS VERSUS HUMAN DE-EPIDERMIZED DERMIS

Mr. Sirapak Vongkulsiri

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

492009

การศึกษาในสัตว์ทดลองระหว่างผิวหนังมนุษย์ปราศจากเซลล์และผิวหนังมนุษย์ปราศจากผิวหนังกำพร้า

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นายศิรภัคย์ วงศ์กุลศิริ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	*IN VIVO* STUDY OF HUMAN ACELLULAR DERMIS VERSUS HUMAN DE-EPIDERMIZED DERMIS
By	Mr. Sirapak Vongkulsiri
Field of Study	Medical Science
Thesis advisor	Tanom Bunaprasert, M.D.

Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Medicine

(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Associate Professor Vilai Chentanez, M.D.)

.....Thesis Advisor

(Tanom Bunaprasert, M.D.)

.....Member

(Associate Professor Siriporn Damrongsakkul, Ph.D.)

.....Member

(Sorada Kanokpanont, Ph.D.)

ศิรภัคย์ วงศ์กุลศิริ: การศึกษาในสัตว์ทดลองระหว่างผิวหนังมนุษย์ปราศจากเซลล์และผิวหนังมนุษย์ปราศจากผิวหนังกำพร้า *(IN VIVO* STUDY OF HUMAN ACELLULAR DERMIS VERSUS HUMAN DE-EPIMERMIZED DERMIS) อ. ที่ปรึกษา: นพ.ถนอม บรรณประเสริฐ, 66 หน้า.

ผิวหนังมนุษย์ชนิดปราศจากเซลล์ (Human Acellular Dermis ,hADM) และผิวหนังมนุษย์ปราศจากผิวหนังชั้นนอก (Human de-epithilized dermis, hDED) เป็นเนื้อเยื่อคอลลาเจนชนิดที่ 1 ตามธรรมชาติที่มีโครงสร้างเหมาะสมสำหรับการยึดเกาะของเซลล์ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพสูงและมีการต่อต้านทางภูมิคุ้มกันต่ำ งานวิจัยนี้ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างโครงเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดซึ่งมีวิธีการเตรียมที่แตกต่างกัน โดยเก็บผิวหนังจากศพที่เสียชีวิตภายใน 24 ชั่วโมง การเตรียม hADM เตรียมโดยนำผิวหนังที่เก็บได้มาผ่านขบวนการฆ่าเชื้อโรค กำจัดผิวหนังชั้นนอก กำจัดไขมัน กำจัดเซลล์ด้วยเอนไซม์ กำจัดซากเซลล์ และทำแห้งแบบสุญญากาศ (Freeze-dry) ส่วนการเตรียม hDED เตรียมโดยขบวนการฆ่าเชื้อโรค กำจัดผิวหนังชั้นนอก กำจัดไขมัน และทำแห้งแบบสุญญากาศ หลังจากนั้นนำ hADM และ hDED ขนาด 1x1 เซนติเมตร ผ่าตัดฝังลงใต้ผิวหนังหนูทดลอง (Wistar rat) อายุ 3 สัปดาห์จำนวน 18 ตัว ฝัง hADM และ hDED ใต้ผิวหนังบนหลังหนูทางด้านซ้ายและขวาตามลำดับ การทดลองแบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 6 ตัวทำการเก็บตัวอย่างที่ฝังไว้ของแต่ละกลุ่มที่ระยะเวลา 1 2 และ 4 สัปดาห์ตามลำดับ นำตัวอย่างที่ได้ตรวจสองทางพยาธิวิทยาด้วยการย้อมสีแบบ H&E และย้อมพิเศษเส้นใยคอลลาเจนด้วยสีสะท้อนแสง (Fluorescence) ผลการทดลองพบว่าการย้อม hADM และ hDED ก่อนการฝังในสัตว์ทดลอง hADM มีโครงสร้างของเส้นใยคอลลาเจนที่หลวมกว่า มีการดูดน้ำที่ดีกว่า และมีความนิ่มมากกว่า hDED พบเซลล์ที่หลงเหลือในผิวหนังทั้งสองกลุ่มจำนวนน้อยมาก ผลการย้อม H&E และสีสะท้อนแสงของตัวอย่างที่ฝังใต้ผิวหนังหนู พบว่า hDED มีการสร้างระบบหลอดเลือดใหม่และการเคลื่อนที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เข้าสู่ชิ้นเนื้อเป็นจำนวนมากกว่า พบการสร้างเส้นใยคอลลาเจนใหม่ที่ค่อนข้างสมบูรณ์ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 และมีการสร้างคอลลาเจนใหม่มากขึ้นเรื่อยๆ ในตัวอย่างอายุ 2 และ 4 สัปดาห์คอลลาเจนที่เกิดใหม่มีลักษณะเป็นร่างแหตามแบบคอลลาเจนของเก่า ส่วน hADM พบปฏิกิริยาการต่อต้านสิ่งแปลกปลอม (foreign body reaction) ของกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นจำนวนมาก พบการสร้างระบบหลอดเลือดและเส้นใยคอลลาเจนใหม่น้อย และมีเส้นคอลลาเจนเรียงตัวแบบขนานคล้ายกับการเรียงตัวของโครงสร้างของเส้นใยคอลลาเจนของแผลเป็น จึงสรุปได้ว่า hDED มีปฏิกิริยาต่อต้านสิ่งแปลกปลอมต่ำกว่า สนับสนุนการเคลื่อนที่และการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เข้ามาภายในตัวอย่างดีกว่า hADM นอกจากนี้ยังพบการสร้างเส้นใยคอลลาเจนใหม่แบบร่างแห (reticular network) ภายใน hDED ดังนั้นการที่ hDED มีปฏิกิริยาต่อต้านสิ่งแปลกปลอมน้อยกว่า และมีการสร้างเส้นใยคอลลาเจนแบบร่างแหดีกว่า hADM เป็นเพราะ hDED มีเส้นใยคอลลาเจนเก่าที่คงคุณสมบัติทางชีววิทยาต่อเซลล์ดีกว่าเส้นใยคอลลาเจนเก่าของ hADM ซึ่งน่าจะถูกทำลายจากขบวนการกำจัดซากเซลล์ และซากเซลล์ที่หลงเหลืออยู่ใน hDED มีความสำคัญต่อปฏิกิริยาต่อต้านสิ่งแปลกปลอมน้อยกว่าคุณสมบัติทางชีววิทยาต่อเซลล์ของเส้นใยคอลลาเจนของ hDED และ hADM เป็นอย่างมาก

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

467 47945 30: MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORD: ACELLULAR DERMIS / DE-EPIDERMIZED DERMIS / SCAFFOLD / TISSUE ENGINEERING

SIRAPAK VONGKULSIRI: *IN VIVO* STUDY OF HUMAN ACELLULAR DERMIS VERSUS HUMAN DE-EPIMERMIZED DERMIS. THESIS ADVISOR: TANOM BUNAPRASERT, M.D., 66 pp.

Human Acellular Dermis (hADM) and Human de-epidermized dermis (hDED) are collagen type I tissue which suitable for cell attachment, high biocompatibility, and low host immunological rejection. In this study, *in vivo* study of hADM and hDED were performed. Fresh cadaver skins were harvested, then hADM was prepared by 5 processes, sterilization with glycerol, de-epidermized, fat removal, de-cellularized with enzymatic treatment, and cells residue removal by chemical treatment. hDED was prepared by following 3 processes, sterilization with glycerol, de-epidermized, and fat removal. Both of them were preserved by Freeze-dried method. After that, hADM and hDED were performed histological study, immunohistological study to investigate the architecture of collagen network, and *in vivo* study to evaluate cell-material interaction. In animal study (n=18), the specimens were cut into 1x1 cm and were subcutaneous implanted in the back of 3 week-old Wistar rat. 6 rats were sacrificed, and then specimens were collected in each 1, 2 and 4 weeks respectively. The specimens were histological measured by H&E staining and were immunohistochemical investigated the architecture of collagen network by special staining. As a result, neo-vascularization and host tissue fibroblasts infiltration were appeared in hDED more than hADM group. Neo-collagen networks, new extracellular matrix which generated by infiltrated fibroblasts, and high ability of cells attachment had been indicated since 1st week in hDED and gradually increased in 2nd and 4th week respectively. In contrast, numerous lymphocytes and foreign body reaction were investigated in hADM. In conclusion, hDED has low foreign body reaction and promote fibroblasts migration and differentiation including recticular network neo-collagen formation. We conclude that remnant fibroblasts which remain in hDED induce foreign body reaction less than losing biological properties of collagen during de-cellularized process of hADM. Biological properties of collagen fiber are important more than complete cell removal by enzymatic or chemical treatment.

Field of study Medical Science Student's signature.....

Academic year 2006 Advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I really would like to express my gratitude to all those who participated in the success of this work. First of all, I am deeply indebted to my advisor, Tanom Bunaprasert M.D., for his advice and encouragements help me all the time I have worked on this thesis. I also greatly express my sincere thanks to other committee members, Assoc. Prof. Vilai Chentanez, Assoc. Prof. Dr. Siriporn Damrongsakkul, and Dr. Sorada Kanokpanont for their helpful suggestion and corrections during my study.

I am so grateful to my colleagues, at i-tissue Laboratory, supports since the first time I started my laboratory practice. Furthermore, I would like to thank the staffs of Animal Laboratory at the Department of Anatomy, all members of Anatomy Department, the Department of Pathology, Research affair, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. I would like to give my special thanks to Mr. Preecha Ruangvetchvorachai and Miss Yaowapa Santikool for their helps, this thesis would have been impossible to accomplish without their helps.

Finally, I would like to express my deepest gratitude my dear parents for their loves and understandings to have brought me today's success.

This study was grants supported by National Research Council of Thailand (NRCT) and Ratchadapiseksompotch Fund, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

CONTENTS

PAGE

ABSTRACT (IN THAI) iv

ABSTRACT (IN ENGLISH) v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

CONTENTS vii

LIST OF FIGURES x

CHAPTER

I. INTRODUCTION 1

1.1 Problem and background 1

1.2 Objectives 4

1.3 Scope of work 4

II. RATIONAL AND THEORY 5

2.1 Skin 4

2.1.1 Human skin 5

2.1.1.1 Epidermis 6

2.1.1.2 Basement membrane 8

2.1.1.3 Dermis 8

2.2 Connective Tissue 11

2.2.1 Ground Substance 12

2.2.1.1 Glycoaminoglycans 12

2.2.1.2 Structural glycoproteins 13

2.2.2 Fibers 15

2.2.2.1 Collagen 15

2.2.3 Connective tissue cells 18

2.3 Wound 20

2.3.1 Classification of burn injuries 20

2.4 Immunology of skins 22

2.4.1 Molecular mechanisms of graft rejection 23

2.4.1.1 Direct presentation 23

CHAPTER **PAGE**

2.4.1.2 Indirect presentation 24
2.5 Fluorescence Microscopy.....24
2.5.1 Fluorescence Compounds 25
2.5.2.1 Coupling with fluorescent compound 26
2.5.2.2 Coupling with enzyme 26
2.5.2.3 Coupling to an electron-scattering compound..... 27
2.6 Review literature and related article.....28
III. RESEARCH METHODOLOGY 30
3.1 Conceptual framework of research 30
3.2 Materials 31
3.3 Equipment 32
3.4 Method 33
3.4.1 Human Acellular Dermis protocol 33
3.4.2 Human De-epidermized dermis protocol 34
3.4.3 Histological examination (Hematoxylin & Eosin staining).....34
3.5 Animal study (*in vivo* study).....35
3.5.1 Subcutaneous implantation 35
3.5.2 Collecting specimens 35
3.5.3 Preparation *in vivo* specimens for H&E staining.....36
3.5.4 Preparation in vivo specimens for immunohistrochemistry 36
IV. RESULTS 38
4.1 Human Acellular Dermis (hADM) and
Human De-epidermized Dermis (hDED) 38
4.1.1 Gross appearance of hADM and hDED 38
4.1.2 H&E staining and immunohistrochemistry of hDED and hADM 39
4.2 Animal study (*in vivo* study).....42
4.2.1 The 1st week of *in vivo* study 42
4.2.2 The 2nd week of *in vivo* study 48
4.2.3 The 4th week of *in vivo* study 54

CHAPTER **PAGE**

V. DISCUSSION 60

REFERENCES..... 63

VITAE.....66

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
1.1	Sources of skin replacement	1
1.2	Engineered skin substitutes in commercial product	3
2.1	The microanatomy of human skin	5
2.2	Epidermis layer	6
2.3	The four layers of epidermis	7
2.4	Basement membrane layer between epidermis and dermis	8
2.5	Dermis layer	9
2.6	Composition and distribution of glycoaminoglycans in connective tissue and their interaction with collagen fibers	14
2.7	Diagram show the model of triple helix collagen	16
2.8	Main characteristics of the different collagen type	17
2.9	Many kinds of connective tissue cells	18
2.10	Function of connective tissue cells	20
2.11	Degree of burn injuries	21
2.12	Major Histocompatibility Complex (MHC) on Human chromosome 6	22
2.13	Excited and emitted wavelength of each fluorescent compound	25
2.14	Applications of gelatin	33
2.17	The collagen triple helix	34
3.1	Conceptual framework of research	30
3.2	The investigation planes of the specimens	37
4.1	Pictures of human acellular dermis	38
4.2	Pictures of de-epidermized dermis	39
4.3	H&E staining under light microscope of hDED and hADM before implantation	39
4.4	Confocal microscopic pictures compared of center section of specimens between hDED (a) and hADM (b)	41

4.5 Gross specimens of hDED and hADM of *in vivo* specimens at 1st week 43
4.6 Comparison of center section between hDED and hADM of *in vivo* specimens H&E staining section at 1st week.....44
4.7 H&E staining under light microscope of hDED and hADM of *in vivo* specimens at 1st week 45
4.8 Confocal microscopic pictures compared of center section of *in vivo* specimens between hDED (a) and hADM (b) at 1st week 46
4.9 Confocal microscopic pictures compared of edge section of *in vivo* specimens between hDED (a-b) and hADM (c-d) at 1st week 47
4.10 Gross specimens of hDED and hADM of *in vivo* specimens at 2nd week.....49
4.8 Comparison of center section between hDED and hADM of *in vivo* specimens H&E staining section at 2nd week 50
4.9 H&E staining under light microscope of hDED and hADM of *in vivo* specimens at 2nd week 51
4.13 Confocal microscopic pictures compared of center section of *in vivo* specimens between hDED (a) and hADM (b) at 2nd week.....52
4.14 Confocal microscopic pictures compared of edge section of *in vivo* specimens between hDED (a-b) and hADM (c-d) at 2nd week.....53
4.15 Gross specimens of hDED and hADM of *in vivo* specimens at 4th week 55
4.10 Comparison of center section between hDED and hADM of *in vivo* specimens H&E staining section at 4st week 56
4.11 H&E staining under light microscope of hDED and hADM of *in vivo* specimens at 4th week 57
4.18 Confocal microscopic pictures compared of center section of *in vivo* specimens between hDED (a) and hADM (b) at 4th week.....58
4.19 Confocal microscopic pictures compared of edge section of *in vivo* specimens between hDED (a-b) and hADM (c-d) at 4th week..... 59