

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



64701323T

การศึกษาในสัตว์ทดลองระหว่างผิวหนังมนุษย์ปราศจากเซลล์และผิวหนังมนุษย์ปราศจากผิวหนังกำพืด



นายศิริภคย์ วงศ์กุลศิริ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

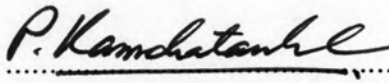
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

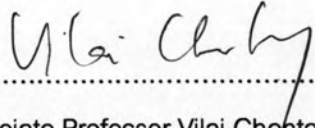
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

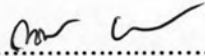
Thesis Title *IN VIVO* STUDY OF HUMAN ACELLULAR DERMIS VERSUS
 HUMAN DE-EPIDERMIZED DERMIS
By Mr. Sirapak Vongkulsiri
Field of Study Medical Science
Thesis advisor Tanom Bunaprasert, M.D.

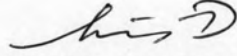
Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

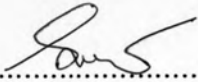

.....Dean of the Faculty of Medicine
(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

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.)

ศิริภคย์ วงศ์กุลศิริ: การศึกษาในสัตว์ทดลองระหว่างผิวหนังมนุษย์ปราศจากเซลล์และผิวหนังมนุษย์ปราศจากผิวหนังกำพวด (IN VIVO STUDY OF HUMAN ACELLULAR DERMIS VERSUS HUMAN DE-EPIMERIZED 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 กำจัดจากเซลล์ และทำแห้งแบบสูญญากาศ (Freeze-dry) ส่วนการเตรียม hDED เตรียมโดยขบวนการฆ่าเชื้อโรค กำจัดผิวหนังชั้นนอก กำจัดไขมัน และทำแห้งแบบสูญญากาศ 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 นำตัวอย่างที่ได้ตรวจสอบทางพยาธิวิทยาด้วยการย้อมสีแบบ H&E และย้อมพิเศษเส้นใยคอลลาเจนด้วยสีสะท้อนแสง (Fluorescence) ผลการทดลองพบว่าการย้อม hADM และ hDED ก่อนการฝังในสัตว์ทดลอง hADM มีโครงสร้างของเส้นใยคอลลาเจนที่หลวมกว่า มีการดูน้ำที่ตึกกว่า และมีความนุ่มมากกว่า hDED พบเซลล์ที่หลงเหลือในผิวหนังทั้งสองกลุ่มจำนวนน้อยมาก ผลการย้อม H&E และสีสะท้อนแสงของตัวอย่างที่ฝังใต้ผิวหนังพบ ว่า hDED มีการสร้างระบบหลอดเลือดใหม่และการเคลื่อนที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เข้าสู่ชั้นเนื้อเป็นจำนวนมากกว่า พบการสร้างเส้นใยคอลลาเจนใหม่ที่ค่อนข้างสมบูรณ์ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 และมีการสร้างคอลลาเจนใหม่มากขึ้นเรื่อยๆ ในตัวอย่างอายุ 2 และ 4 สัปดาห์คอลลาเจนที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นร่างแหตามแบบคอลลาเจนของเก่า ส่วน hADM พบปฏิกิริยาต่อต้านสิ่งแปลกปลอม (foreign body reaction) ของกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นจำนวนมาก พบการสร้างระบบหลอดเลือดและเส้นใยคอลลาเจนใหม่น้อย และมีเส้นใยคอลลาเจนเรียงตัวแบบขนานคล้ายกับการเรียงตัวของโครงสร้างของเส้นใยคอลลาเจนของแผลเป็น จึงสรุปได้ว่า hDED มีปฏิกิริยาต่อต้านสิ่งแปลกปลอมต่ำกว่า สนับสนุนการเคลื่อนที่และการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เข้ามาภายในตัวอย่างดีกว่า hADM นอกจากนี้ยังพบการสร้างเส้นใยคอลลาเจนใหม่แบบร่างแห (reticular network) ภายใน hDED ดังนั้นการที่ hDED มีปฏิกิริยาต่อต้านสิ่งแปลกปลอมน้อยกว่า และมีการสร้างเส้นใยคอลลาเจนแบบร่างแหดีกว่า hADM เป็นเพราะ hDED มีเส้นใยคอลลาเจนเก่าที่คงคุณสมบัติทางชีววิทยาต่อเซลล์ดีกว่าเส้นใยคอลลาเจนเก่าของ hADM ซึ่งน่าจะถูกทำลายจากขบวนการกำจัดจากเซลล์ และจากเซลล์ที่หลงเหลืออยู่ใน hDED มีความสำคัญต่อปฏิกิริยาต่อต้านสิ่งแปลกปลอมน้อยกว่าคุณสมบัติทางชีววิทยาต่อเซลล์ของเส้นใยคอลลาเจนของ hDED และ hADM เป็นอย่างมาก

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

467 47945 30: MAJOR MEDICAL SCIENCE

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

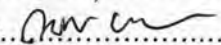
SIRAPAK VONGKULSIRI: *IN VIVO* STUDY OF HUMAN ACELLULAR DERMIS
VERSUS HUMAN DE-EPIMERIZED DERMIS. THESIS ADVISOR: TANOM
BUNAPRASERT, M.D., 66 pp.

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 reticular 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

Academic year 2006

Student's signature..........

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 (<i>in vivo</i> study).....	35
3.5.1 Subcutaneous implantation	35
3.5.2 Collecting specimens	35
3.5.3 Preparation <i>in vivo</i> specimens for H&E staining.....	36
3.5.4 Preparation <i>in vivo</i> specimens for immunohistochemistry	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 immunohistochemistry of hDED and hADM	39
4.2 Animal study (<i>in vivo</i> study).....	42
4.2.1 The 1 st week of <i>in vivo</i> study	42
4.2.2 The 2 nd week of <i>in vivo</i> study	48
4.2.3 The 4 th week of <i>in vivo</i> 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 <i>in vivo</i> specimens at 1 st week	43
4.6	Comparison of center section between hDED and hADM of <i>in vivo</i> specimens H&E staining section at 1 st week.....	44
4.7	H&E staining under light microscope of hDED and hADM of <i>in vivo</i> specimens at 1 st week	45
4.8	Confocal microscopic pictures compared of center section of <i>in vivo</i> specimens between hDED (a) and hADM (b) at 1 st week	46
4.9	Confocal microscopic pictures compared of edge section of <i>in vivo</i> specimens between hDED (a-b) and hADM (c-d) at 1 st week	47
4.10	Gross specimens of hDED and hADM of <i>in vivo</i> specimens at 2 nd week.....	49
4.8	Comparison of center section between hDED and hADM of <i>in vivo</i> specimens H&E staining section at 2 nd week	50
4.9	H&E staining under light microscope of hDED and hADM of <i>in vivo</i> specimens at 2 nd week	51
4.13	Confocal microscopic pictures compared of center section of <i>in vivo</i> specimens between hDED (a) and hADM (b) at 2 nd week.....	52
4.14	Confocal microscopic pictures compared of edge section of <i>in vivo</i> specimens between hDED (a-b) and hADM (c-d) at 2 nd week.....	53
4.15	Gross specimens of hDED and hADM of <i>in vivo</i> specimens at 4 th week	55
4.10	Comparison of center section between hDED and hADM of <i>in vivo</i> specimens H&E staining section at 4 st week	56
4.11	H&E staining under light microscope of hDED and hADM of <i>in vivo</i> specimens at 4 th week	57
4.18	Confocal microscopic pictures compared of center section of <i>in vivo</i> specimens between hDED (a) and hADM (b) at 4 th week.....	58
4.19	Confocal microscopic pictures compared of edge section of <i>in vivo</i> specimens between hDED (a-b) and hADM (c-d) at 4 th week.....	59