

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ В СОСТАВЕ СЛОЖНЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЦЕЛОСТНОСТИ КОЖНЫХ ПОКРОВОВ

Киселева Е.П., Гаин Ю.М.

*Белорусская медицинская академия последипломного образования,
г.Минск.*

Тканевая инженерия является одной из наиболее молодых отраслей в медицине, базирующейся на принципах молекулярной биологии и генной инженерии. Целью её является конструирование вне организма функциональных компонентов, которые могут быть использованы для регенерации поврежденных тканей и/или органов (**Ошибка! Неизвестный аргумент ключа.**). Актуальной задачей данного направления является создание и применение биокомпозиционных материалов для восстановления целостности покровных тканей, вселяя огромную надежду в полноценное выздоровление большому числу пациентов с заболеваниями и травмами, сопровождающихся утратой кожных покровов (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**). Успех этого направления часто определяется удачным выбором клеточного материала и адекватного носителя для трансплантируемых в организм реципиента клеток, особенно, когда речь идёт о больших по площади дефектах кожных покровов. Матрица-носитель или матрикс представляет собой синтетический или биологический комплекс для обеспечения механической прочности конструкции с заданными свойствами, трехмерного ориентирования нанесенной на него клеточной культуры (**Ошибка! Неизвестный аргумент ключа.**). В плане клеточного материала большие перспективы мировая научная общественность возлагает на стволовые клетки. По источнику происхождения выделяют эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и тканеспецифические (мезенхимальные) стволовые клетки (МСК). Несмотря на очень высокий дифференцировочный потенциал эмбриональных стволовых клеток, считающихся истинными стволовыми клетками, особенности и сложности их получения и использования (включая морально-этические соображения), всё большее внимание исследователей привлекают МСК. К настоящему времени МСК получены из многих органов и тканей, в частности, костного мозга, жировой ткани, надкостницы и мышц (**Ошибка! Неизвестный аргумент ключа.**). Жировая ткань, как источник стволовых клеток, привлекательна возможностью получения их в большом количестве с минимальной инвазивностью для пациента (**Ошибка! Неизвестный аргумент ключа.**).

Цель работы: Разработать и обосновать технологию восстановления целостности кожных покровов с помощью сложных трансплантатов, состоящих из аутологичных мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани и поддерживающих матриц (амниотической мембраны (АМ) и композита

гидрогеля на основе поливинилового спирта с добавленными природными полисахаридами).

Материалы и методы

Создание модели. Эксперимент проведен на 38 белых беспородных крысах обоего пола массой 200-225 г. Каждое животное размещали в индивидуальной клетке. Условия содержания и кормления всех животных были идентичными. Модель полнослойной плоскостной раны создавали следующим образом: под внутримышечным комбинированным наркозом (фентанил 0,005% + дроперидол 0,01% в соотношении 2:1, 0,5мл на 100 г массы тела животного) в стерильных условиях у лабораторных животных в лопаточной области удаляли шерсть, кожу протирали 70%этанолом, иссекали кожный лоскут до мышечного слоя. Раздавливание краев раны и мышцы производили с использованием зажима Кохера. Площадь повреждения составляла 20,1 (19,3±20,5) см². Для определения площади раневой поверхности её фотографировали с лимитированного расстояния цифровой фотокамерой, на 0-ые, 10-ые и 20-ые сутки изображения переносили на компьютер, калибровали и измеряли площадь раневого поражения с помощью программы ScionImage (NIH, USA).

Гистологически исследовали биоптаты кожи экспериментальных животных на 20-е сутки после трансплантации. После фиксации в течение трёх суток при температуре +4°C в 10%-ном нейтральном растворе формалина фрагменты кожи заливали в парафин по стандартной методике. Использовали серийные парафиновые срезы толщиной 5-7 мкм. Окраска препаратов осуществлялась гематоксилином и эозином. На светооптическом уровне при изучении гистологических препаратов с помощью микроскопа «Zeiss» (увеличение x100 и x200) производили анализ морфологических изменений.

Выделение и культивирование МСК. *Создание трансплантатов.* Для получения аутологичных МСК у лабораторных животных в стерильных условиях производили забор жировой ткани в объеме равном 1-2 мл. Образцы жировой ткани подвергали ферментативной обработке коллагеназой I типа («Sigma», Германия), в результате чего получали клеточную суспензию, из которой путем центрифугирования высаждали фракцию стромальных клеток. Количественный выход клеток определяли при их подсчете в камере Горяева. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в полной питательной среде и засеивали в культуральные чашки диаметром 60 мм в концентрации $3-4 \times 10^5$ ядродержащих клеток на 1 см² поверхности культурального пластика. Оценку жизнеспособности клеток проводили путем окраски красителем трипановым синим. Удаление не прикрепившихся клеток проводили через 24 часа заменой питательной среды. Дальнейшую смену среды производили каждые четвертые сутки. При создании трансплантатов использовали клетки 1-3-го пассажей.

Для более полной характеристики полученных клеток оценивали их пластичность. МСК ЖТ подвергали направленной дифференцировке в адипоцитарном и остеогенном направлениях. Адипогенная дифференцировочная среда состояла из полной питательной среды с добавлением 50 мкг/мл индометацина, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты и 10-7М дексаметазона. На 28-

30-е сутки культивирования культуры клеток окрашивали Oil Red O для выявления липидов. Для индукции дифференцировки в остеогенном направлении конfluence культуры МСК ЖТ культивировали в остеогенной дифференцировочной среде, включающей полную питательную среду, с добавлением 10мМ бета - глицерофосфата, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 10-8М дексаметазона. На 28-30-е сутки культивирования культуры клеток Alizarin Red для выявления минерализованного внеклеточного матрикса.

МСК ЖТ 1-3 пассажей, меченные РКН-26 или КТ по описанной ранее нами методике (6), в концентрации не менее 1×10^5 на см^2 засеивали в культуральные чашки, содержащие плёнку гидрогеля необходимого размера, либо АМ.

Подготовленные трансплантаты переносили на рану животных и фиксировали к краям раны одиночными узловыми швами. Во всех группах на раны накладывали стерильные повязки. Животных размещали в индивидуальных клетках.

Морфологический анализ культур клеток. Культуры исследовали с использованием инвертированного микроскопа Carl Zeiss Axiovert 200 (Германия) с применением методов светлого поля, бокового освещения, фазового и Varel- контрастов, эпифлуоресценции.

Статистическая обработка полученных количественных данных в ходе эксперимента проводилась с использованием статистической программы «STATISTICA 6.0» фирмы StatSoft (США). Оценка статистической значимости различий между сравниваемыми показателями проводилась Mann-Whitney U тестом. Сравнение в группах по индивидуальным параметрам проводилось с помощью χ^2 теста. Различия считали статистически значимыми при степени безошибочного прогноза равной 95% ($p < 0,05$).

Результаты

Морфо-фенотипическая характеристика и оценка дифференцировочного потенциала мезенхимальных стволовых клеток. Полученные в результате культивирования клетки, начиная с первого пассажа, были морфологически идентичными и представляли собой гомогенную культуру характерного веретенного фибробластоподобного вида. Культивирование МСК в адипогенной среде приводило к появлению клеток с крупными вакуолями в цитоплазме. Наличие липидных включений подтверждалось положительной окраской Oil Red O на 30-е сутки культивирования. Полученные клетки были способны дифференцироваться и в остеогенном направлении: так, уже на первой неделе наблюдалось формирование многослойных узлов и формирование депозитов кальция, что на 30-е сутки культивирования достоверно подтверждалась окрашиванием ализариновым красным (Alizarin Red).

Использование флуоресцентных красителей позволило визуализировать МСК ЖТ на гидрогеле и амниотической мембране. Маркировка МСК не влияла на их способность к адгезии и клетки быстро прикреплялись к матрице. Установлено, что при нанесении комплексного трансплантата на рану клетки

мигрировали с трансплантата на раневую поверхность, что было подтверждено микроскопически : после снятия подложки с раневого дефекта лабораторных животных, меченых клеток на ней обнаружено не было.

Согласно листу рандомизации были сформированы три экспериментальные группы: 1-ая (n=11)- с применением сложного трансплантата, состоящего из гидрогеля (ИБОХ) и МСК ЖТ; 2-ая (n=13) - с применением из АМ и МСК ЖТ; 3-ая (n=14)- контрольная группа, где раны заживали в результате спонтанной регенерации. Животных выводили из эксперимента на 10-е, 20-е, сутки путем однократного введения 3%-ного тиопентала натрия (трёхкратная разовая передозировка барбитурата). Все исследования проводили в полном соответствии с современными принципами биоэтики, в том числе, Европейской конвенцией по защите прав позвоночных животных (принятой в г. Страсбурге 18 марта 1986 года) и Всемирной декларацией прав животных («Universal Declaration of Animal Rights», принятой Международной Лигой Прав Животных 23 сентября 1977 года в Лондоне и объявленной 15 октября 1978 года в штабе ЮНЕСКО в г. Париже).

Анализ результатов визуального и планиметрического осмотра ран показал наличие процесса регенерации как в контрольной, так и в опытных группах. Однако темп спонтанного заживления ран был достоверно более низким, что отчетливо видно из данных рисунка 1Б, на котором сравнены площади раневого дефекта, составившие на 10-ые сутки наблюдения 17,5 (16,4÷18,5) в контрольной группе, 5,01 (4,0÷5,4) см² -в контрольной и опытных группах соответственно.

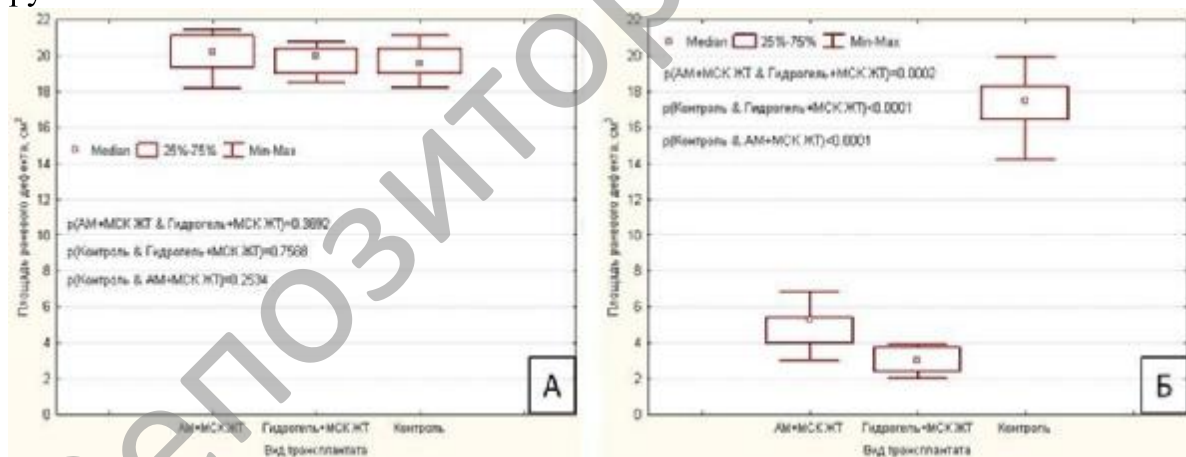


Рис. 1. Медианно-квартильное распределение площади раневого дефекта в группах сравнения (0-ые сутки-(А), 10-ые сутки-(Б)).

Площадь поврежденной поверхности в группах с применением трансплантатов достоверно уменьшалась в размерах по сравнению с контрольной группой, где происходила спонтанная регенерация и, уже к 20-м суткам наблюдения у части животных отмечалось полное закрытие раневого дефекта (Рис. 2).

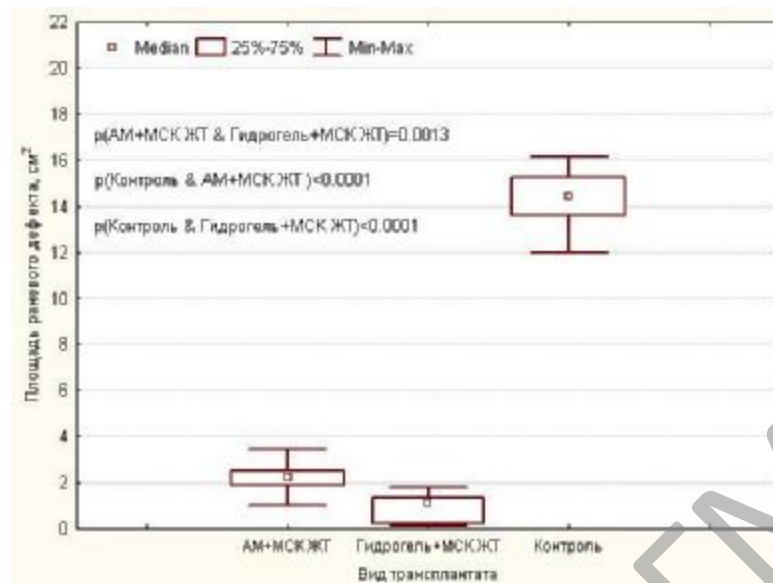


Рис. 2. Медианно-квартильное распределение площади раневого дефекта в группах сравнения на 20-ые сутки.

При сравнительном морфологическом исследовании процесса заживления ран было выявлено, что в группе контроля к 20-ым суткам эпителизация раны еще отсутствовала. Дефект был прикрыт гнойно-некротическими массами, формирующаяся ткань была грануляционно-фиброзного типа с умеренно выраженным отеком и отчетливой воспалительной инфильтрацией. В то время как, в группе с использованием трансплантатов была выявлена достоверно более быстрая регенерация кожного покрова и уже к 20-м суткам определялась практически полная эпителизация раневой поверхности. Эпителизация характеризовалась формированием в подлежащих отделах преимущественно фиброзного рубца с очагами периваскулярного отека, без воспалительной инфильтрации или с минимальной периваскулярной инфильтрацией. Также отмечалось уменьшение количества кровеносных сосудов по сравнению с контрольной группой. Причем, вертикально направленные кровеносные сосуды практически отсутствовали. В основном эпителиальный покров был представлен 4-14 слоями с признаками послойной дифференцировки. Характерным было формирование в субэпителиальных отделах рубца гомогенизированной зоны, в которой определялись полигональные фибробласто-подобные клетки. Данная зона напоминала гистологическую структуру субэпителиальных отделов нормальной кожи крыс.

Выводы:

Показана эффективность применения в качестве поддерживающих матриц для мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани синтетических гидрогелей оптимального состава и амниотической оболочки.

В результате проведенного экспериментального исследования можно утверждать, что применение комплексных трансплантатов, включающих аутологичные мезенхимальные стволовые клетки из жировой ткани и композит гидрогеля на основе поливинилового спирта с добавленными природными

полисахаридами, либо АМ позволяет достоверно ускорить процесс заживления полнослойных ран.

Литература

1. Langer R. Tissue engineering / R. Langer, J. Vacanti // Science. – 1993. – Vol. 260. – P. 920–926.

2. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue /S. Kern [et al.] // Stem Cells. – 2006. – Vol. 24. – P. 1294–1301.

3. Differential expression and regulation of extracellular matrix-associated genes in fetal and neonatal fibroblasts / A. Gosiewska [et al.] // Wound Repair Regen. – 2001. – Vol. 9. – P. 213-222.

4. Anker P.S., Mesenchymal stem cells in human second trimester bone marrow, liver, lung and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differential potential // P.S. Anker [et al.] // Haematologica - 2003.- Vol. 88. P. 845-852.

5. The immunophenotype of human adipose derived cells: temporal changes in stromal- and stem cell-associated markers / J.B. Mitchell [et al.] // Stem Cells - 2006. - Vol. 24. - P. 376-385.

6. Витальная маркировка МСК квантовыми точками на основе селенида кадмия / Е. А. Петрова [и др.] // Лаб. Диагностика. – 2012. - № 2. – С. 106-113.