

УДК 616-008.847.9-089.843+616-003.93-089.844

Ю.В. Поляченко*, **К.М. Запольська***, **О.В. Кучук[#]**, **В.М. Кирик[#]**, **О.М. Цупиков[#]**,
П.П. Клименко[#], **Р.В. Салютін*[^]**, **Г.М. Онищенко[§]**, **В.А. Шаблій*[^]§**

**ДУ «Національний інститут хірургії та трансплантології
ім. О.О. Шалімова НАМН України», м. Київ*

[#]ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», м. Київ

*[^]Координаційний центр трансплантації органів,
тканин і клітин МОЗ України, м. Київ*

[§]Інститут клітинної терапії, м. Київ

ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ДОНОРСЬКИХ НАТИВНИХ І КРІОКОНСЕРВОВАНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СЛОВБУРОВИХ КЛІТИН НА ПЕРЕБІГ РЕПАРАТИВНО- ДЕСТРУКТИВНИХ ПРОЦЕСІВ У ЖИРОВИХ ТРАНСПЛАНТАТАХ

Проведено експериментальне дослідження з метою визначення перебігу регенеративно-деструктивних процесів у тканинних графтах, збагачених донорськими нативними і кріоконсервованими мезенхімальними мультипотентними словбуровими клітинами, та можливості використання комбінованих ауто/алоклітинно-тканинних графтів у клінічній практиці. Встановлено, що збагачення жирового графту нативними або кріоконсервованими алогенними мезенхімальними мультипотентними словбуровими клітинами, виділеними з жирової тканини, призводить до активації деструктивно-запальних процесів у жировому графті, погіршення виживання адипоцитів і в подальшому до дефіциту маси трансплантата. Вважається недоцільним використання донорських словбурових клітин у клінічній практиці з метою захисту пересащеної жирової тканини від тканинної резорбції.

Ключові слова: трансплантація, словбурові клітини, жирова тканина, тканинна резорбція.

В естетичній та реконструктивно-відновній хірургії широко застосовується метод гетеротопічного переміщення аутологічної жирової тканини з метою корекції вікових або набутих контурних дефектів м'яких тканин обличчя, тулуба і кінцівок [1, 2]. Однак позитивний клінічний ефект аутоліпоттрансплантації є короткочасним, що пов'язано з процесами тканинної резорбції. У зв'язку з цим актуальним є пошук методів захисту трансплантованої тканини від лізису і фіброзування [3].

В літературі є відомості про науково-практичні дослідження з визначення впливу трансплантації словбурових клітин, виділених з жирової тканини, для захисту пересащеної жирової тканини від резорбції, але вони носять поодинокий характер та мають суперечливі результати [4, 5].

Окрім того, проблемним залишається питання можливості збагачення жирового графту донорськими мезенхімальними мультипотентними словбуровими клітинами (ММСК), виділеними з жирової тканини, в разі якщо аутологічний клітинний матеріал використати для виділення та культивування до необхідної, дієвої клітинної маси неможливо (особливості фенотипу, генетично детерміновані хвороби, необхідність швидкого отримання клітинного трансплантата тощо).

Таким чином, наведене зумовило проведення дослідження з метою визначення перебігу регенеративно-деструктивних процесів у тканинних графтах, збагачених донорськими ММСК, та можливості використання комбінованих ауто/алоклітинно-тканинних графтів у клінічній практиці.

© Ю.В. Поляченко, К.М. Запольська, О.В. Кучук та ін., 2012

Матеріал і методи. Експериментальне дослідження проведено в умовах ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України».

Під час експериментів над дослідними тваринами дотримувались принципів біоетики, норм біологічної безпеки та вимог щодо захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та/або іншою науковою метою.

Експериментальну гетеротопічну трансплантацію (пересаджування фрагмента інгвінальної жирової клітковини під шкіру по обидва боки від хребта, формуючи при цьому ложе для трансплантатів) проводили на самках мишей «дикого типу» лінії FVB з середньою масою тіла ($27,00 \pm 1,12$) г під загальним знеболюванням 2,5 % розчином авертину в дозі 400 мг/кг. Донорський клітинний матеріал отримували шляхом вилучення (після евтаназії) з інгвінальних ділянок мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J (трансгенна лінія мишей, яка несе ген зеленого флуоресцентного білка медуз) фрагментів підшкірної клітковини. Після механічної обробки підшкірної клітковини та культивування процесу отримували ММСК, які піддавали кріоконсервуванню в рідкому азоті при температурі -196 °C та використовували в нативному стані. Середній клітинний вміст для збагачення жирового графту ММСК становив $0,5 \cdot 10^6$ клітин з 25 мкл фосфатно-сольового буфера (ФСБ) для однієї трансплантації.

Дослідні тварини були розподілені на дві групи. Першу групу становили тварини, яким було виконано гетеротопічну трансплантацію тканинного (контрольного) та тканинно-клітинного (збагаченого донорськими нативними ММСК) графту, другу — тварини, яким окрім тканинного графту трансплантували тканинно-клітинний, збагачений кріоконсервованими ММСК.

В контрольні графти для чистоти експерименту вводили ФСБ та ФСБ з 10 % ДМСО (використовується для кріоконсервування).

На 14-ту та 28-му доби експерименту після евтаназії у тварин вилучали трансплантовані фрагменти. Після вилучення фрагменти жирової клітковини зважували та готували для проведення гістологічних, імуногістохімічних і морфометричних досліджень.

Результати та їх обговорення. Результати дослідження свідчили, що на 2-й тиждень експерименту середня маса тканинно-клітинного графту, збагаченого нативними ММСК, була достовірно вище, ніж маса контрольного (тканинного) трансплантата. Однак обидва графти втрачали масу в порівнянні з початковими масовими показниками (рис. 1).

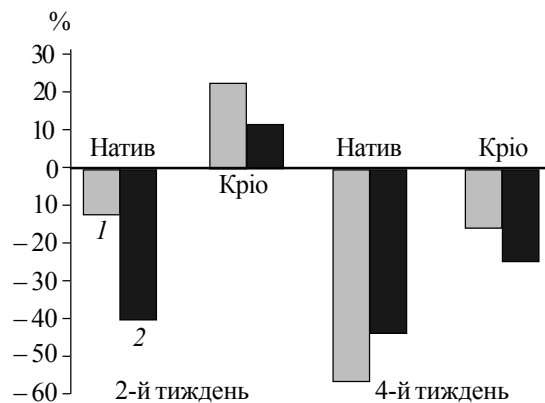


Рис. 1. Динаміка маси фрагментів жирової тканини через 2 і 4 тижні після співтрансплантації з нативними (натив) і кріоконсервованими (кріо) ММСК: 1 — клітинно-тканинний графт; 2 — тканинний графт

Водночас відмічалось збільшення маси трансплантатів, збагачених кріоконсервованими ММСК, на 2-й тиждень експерименту на $(26,4 \pm 14,1)$ % ($p < 0,05$) і дефіцит маси у тварин, яким трансплантували жирову клітковину з нативними ММСК, на $(22,3 \pm 11,6)$ % ($p < 0,05$).

Цікавим фактом є збільшення маси тканинного графту, розміщеного контралатерально, на 11,4 % у порівнянні з початковим значенням.

На 4-й тиждень експерименту у тварин першої групи спостерігався значний дефіцит маси графтів. Тканинний графт втрачав до 46 % маси, а трансплантат, збагачений нативними ММСК, — 56,6 % маси. Загальна маса клітинно-тканинного трансплантата поступалася середній масі тканинного трансплантата лише на 0,29 г (10,6 %) при $p \geq 0,05$.

На 4-й тиждень експерименту маса клітинно-тканинного, збагаченого кріоконсервованими ММСК, і тканинного графтів прогресивно зменшувалась, особливо це стосувалося

лось маси жирового графту, який не було збагачено донорськими кріоконсервованими клітинами. Маса клітинно-тканинного графту на 4-й тиждень після трансплантації становила $(2,31 \pm 0,06)$ г, що на 15,8 % менше, ніж початкова маса ($p \leq 0,05$), та на 67,1 % менше, ніж маса трансплантата на 2-й тиждень експерименту ($p \leq 0,01$).

На 4-й тиждень після трансплантації маса тканинного графту зменшилась у порівнянні з початковим значенням на 24,2 % та становила $(2,09 \pm 0,05)$ г ($p \leq 0,05$). В порівнянні з масою трансплантата на 2-й тиждень експерименту тканинний графт втрачав 68,1 %.

За даними гістологічного аналізу, проведеного на 2-му тижні експерименту, в клітинно-тканинних і тканинних графтах тварин обох груп мають місце ділянки лізису адипоцитів, фібриноїдний некроз та починають утворюватися кальцифікати в зоні фібриноїдного некрозу жирової тканини (рис. 2).

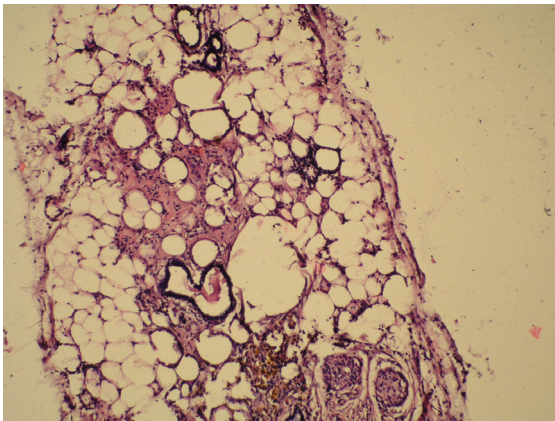


Рис. 2. Гістологічна структура клітинно-тканинного графту, збагаченого нативними ММСК, на 2-му тижні експерименту. Лізис адипоцитів, фібриноїдний некроз жирової тканини, початок утворення кальцифікатів у зоні фібриноїдного некрозу жирової тканини. $\times 200$

Крім того, в біоптатах фіксували ознаки лімфоцитарно-макрофагальної інфільтрації, що була більш вираженою в клітинно-тканинних графтах, і кальцифікацію, яка більш виражена в тканинних трансплантатах, особливо на 4-й тиждень експерименту в усіх трансплантатах жирової тканини через 2 тижні після трансплантації.

В біоптатах, вилучених у тварин обох груп, фіксували стаз, тромбоз, сладж еритроцитів і гіаліноз стінок судин (рис. 3).

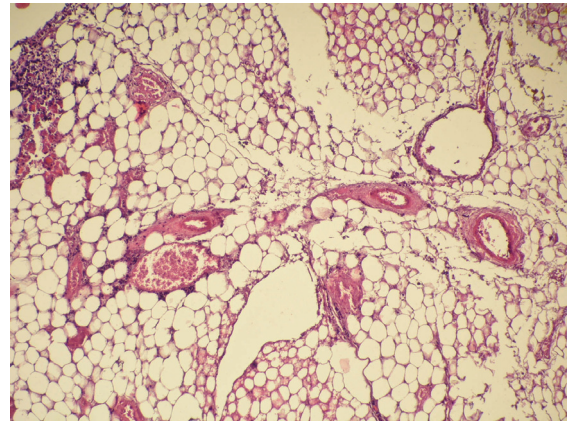


Рис. 3. Фрагмент жирової тканини, збагаченої кріоконсервованими ММСК, 4-й тиждень експерименту. Ділянка фібриноїдного некрозу, гіаліноз стінок судин. Забарвлення гематоксилін-еозином, $\times 100$

При морфометричному аналізі показано, що при введенні як нативних, так і кріоконсервованих ММСК спостерігається тенденція до підвищення інтенсивності некрозу адипоцитів, набряку й інфільтрації графтів порівняно з відповідними контролями 2-го тижня після трансплантації (рис. 4).

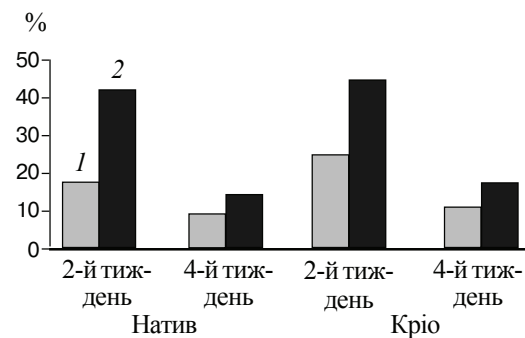


Рис. 4. Відсоток площі адипоцитів від загальної площі гістологічного препарату трансплантованих графтів за даними морфометричного аналізу: 1 — клітинно-тканинний графт; 2 — тканинний графт

Результати імуногістохімічного дослідження свідчили про наявність у трансплантованій жировій тканині через 2 та 4 тижні після трансплантації донорських ММСК, причому їх кількість на 2-му тижні експерименту була нижчою в графтах, які збагачувались кріоконсервованими ММСК, що є свідченням негативного впливу кріоконсервування.

Необхідно зазначити, що кількість донорських ММСК зростала на 4-й тиждень експерименту, що вказує на відсутність ознак

відторгнення та можливу їх проліферацію. Окрім того, більшість ММСК знаходилась у стінках судин дрібного та середнього калібру, що вказує на їх ендотеліальне диференціювання.

Крім того, при імуногістохімічному аналізі показано наявність донорських нативних і кріоконсервованих ММСК в контралатерально розміщених трансплантатах жирової клітковини, в які вводили ФСБ та ФСБ з ДМСО (негативний контроль), що може свідчити про розселення клітин через системний кровотік.

Міграція ММСК може бути причиною схожих процесів набряку, лімфоцитарно-макрофагальної інфільтрації, некрозу адипоцитів і фіброзу як у контрольних, так і в клітинно-тканинних трансплантатах обох груп.

Проаналізувавши отримані результати, ми можемо припустити, що збагачення жирових графтів донорськими нативними ММСК призводить до активації у графті дегенеративно-дистрофічних процесів та різкого зменшення його маси. Саме дегенеративно-дистрофічні процеси і зумовлюють динаміку мас графтів. Розвиток дегенеративно-дистрофічних процесів та асептичного запалення призводить до накопичення позаклітинної запальної рідини та помилково-позитивної стабілізації маси графту на 2-й тиждень експерименту. Відсутність дегенеративно-дистрофічних процесів і асептичного запалення в тканинному графті та зумовленого накопичення позаклітинної рідини забезпечує поступову тканинну резорбцію жирового трансплантата і стабільну втрату графтом маси.

На 4-й тиждень після гетеротопічної трансплантації процеси тканинної резорбції в жировому графті поступово стабілізуються і жирова тканина фіброзується, а маса тканинно-клітинного трансплантата активно зменшується за рахунок як деструкції адипоцитів і зменшення перивезикального набряку, так і втрати позаклітинної рідини.

Таким чином, можна припустити, що збагачення жирових графтів донорськими кріоконсервованими ММСК призводить окрім активації дегенеративно-дистрофічних процесів до значного, але фактично короткочасного збільшення маси графту. Однак збільшення маси графту зумовлено перш за все

гідрофільною дією ДМСО, який застосовували при кріоконсервації клітин та частково в супутній концентрації вводили з кріоконсервованими ММСК. Це припущення ґрунтується на тому факті, що введення ФСБ і ДМСО в жирову тканину призводило до збільшення маси тканинного графту на 2-й тиждень після гетеротопічної трансплантації.

Різниця маси клітинно-тканинного і тканинного графтів на 2-му та 4-му тижнях експерименту пояснюється негативним впливом кріоконсервованих донорських ММСК, що в поєднанні з дією ДМСО призводить до більш активного і тривалого накопичення позаклітинної рідини, яка через перивезикальний набряк та інфільтрацію тканини збільшувала масу графту. Водночас тканинний графт активно втрачав позаклітинну рідину та у зв'язку з відсутністю активних дегенеративно-дистрофічних процесів і асептичного запалення процеси тканинної резорбції в жировому графті поступово стабілізувались, жирова тканина фіброзувалась і графт втрачав масу.

Висновки

1. В жировому графті в післятрансплантаційному періоді відмічаються процеси тканинної резорбції у вигляді запального процесу, лізису адипоцитів, фібриноідного некрозу, кальцифікації та фіброзування.

2. Збагачення жирових графтів нативними або кріоконсервованими мезенхімальними мультипотентними стовбуровими клітинами, які виділені з донорської, аlogenної жирової тканини, не сприяє очікуваному збільшенню маси графту, а навпаки, за рахунок активації дегенеративно-дистрофічних процесів та асептичного запалення призводить до втрати маси трансплантата жирової тканини і загибелі адипоцитів.

3. Донорські мезенхімальні мультипотентні стовбурові клітини здатні до проліферації та міграції в тканині реципієнтної тварини і до ендотеліального диференціювання.

4. Використання донорських нативних і кріоконсервованих мезенхімальних мультипотентних стовбурових клітин з метою запобігання тканинній резорбції жирового трансплантата є недоцільним та в разі впровадження в клінічну практику може призвести до значних негативних побічних реакцій.

Список літератури

1. Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by using VEGF-transfected adipose-derived stem cells / F. Lu, J. Li, J. Gao [et al.] // *Plast. Reconstr. Surg.* — 2009. — V. 124 (5). — P. 1437–1446.
2. Endogenous stem cell therapy enhances fat graft survival / P. Butala, A. Hazen, C. Szpalski [et al.] // *Plast. Reconstr. Surg.* — 2012. — V. 130 (2). — P. 293–306.
3. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells / Kotaro Yoshimura, Katsujiro Sato, Noriyuki Aoi [et al.] // *Aesthetic Plast. Surg.* — 2008. — V. 32 (1). — P. 48–55.
4. Experimental study of the effect of adipose stromal vascular fraction cells on the survival rate of fat transplantation / B. C. Fu, J. H. Gao, F. Lu, J. Li // *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi.* — 2010. — V. 26 (4). — P. 289–294.
5. Infusion of mesenchymal stem cells and rapamycin synergize to attenuate alloimmune responses and promote cardiac allograft tolerance / W. Ge, J. Jiang, M. L. Baroja [et al.] // *Am. J. Transplant.* — 2009. — Aug. — V. 9 (8). — P. 1760–1772.

Ю.В. Поляченко, Е.М. Запольская, О.В. Кучук, В.М. Кирик, О.М. Цупиков, П.П. Клименко, Р.В. Салютин, Г.М. Онищенко, В.А. Шаблій

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ДОНОРСКИХ НАТИВНЫХ И КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ТЕЧЕНИЕ РЕПАРАТИВНО-ДЕСТРУКТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЖИРОВЫХ ТРАНСПЛАНТАТАХ

Проведено экспериментальное исследование в целях определения течения регенеративно-деструктивных процессов в тканевых графтах, обогащенных донорскими нативными и криоконсервированными мезенхимальными мультипотентными стволовыми клетками, и возможности использования комбинированных ауто/аллоклеточно-тканевых графтов в клинической практике. Установлено, что обогащение жирового графта нативными или криоконсервированными аллогенными мезенхимальными мультипотентными стволовыми клетками, выделенными из жировой ткани, приводит к активации деструктивно-воспалительных процессов в жировом графте, ухудшению выживаемости адипоцитов и в дальнейшем к дефициту массы трансплантата. Считается нецелесообразным использование донорских стволовых клеток в клинической практике в целях защиты пересаженной жировой ткани от тканевой резорбции.

Ключевые слова: трансплантация, стволовые клетки, жировая ткань, тканевая резорбция.

Yu. V. Polyachenko, K. M. Zapolska, O. V. Kuchuk, V. M. Kyryk, O. M. Tsypukov, P. P. Klymenko, R. V. Salyutin, G. M. Onyschenko, V. A. Shablii

IMPACT OF TRANSPLANTATION NATIVE AND CRYOPRESERVED DONOR MULTIPOTENT MESENCHYMAL STEM CELLS, ISOLATED FROM ADIPOSE TISSUE, ON THE REPARATIVE-DESTRUCTIVE PROCESS IN THE FAT GRAFTS

The experimental study was designed to determine the course of regenerative and destructive processes in the tissue graft, full of native and cryopreserved donor ADSCs and possibilities of combined auto/allo cellular-tissue grafts in clinical practice. It is determined, that the enrichment of fat graft native or cryopreserved allogenic multipotent mesenchymal stem cells, isolated from adipose tissue, leads to the activation of destructive-inflammatory in fat graft, worsening survival adipocytes and further to the deficit mass graft. It was found impractical to use in clinical practice donor stem cells to protect against tissue resorption the transplanted fat tissue.

Key words: transplantation, stem cells, adipose tissue, tissue resorption.

Поступила 12.04.12