УДК 576.3/.7+616-008.847.9-008.9-089.843-092.4-092.9+616-003.93-089.844

Р.В. Салютін[1,2], С.С. Паляниця[1], К.М. Запольська[2], Л.А. Панченко[1], В.А. Шаблій[1]

ЗАСТОСУВАННЯ АЛОГЕННИХ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН, ЩО ВИДІЛЕНІ З ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ, ТА ЇХ ВПЛИВ НА ПРОЦЕСИ РЕЗОРБЦІЇ ПЕРЕСАДЖЕНОГО ЖИРОВОГО ГРАФТУ

[1]Координаційний центр трансплантації органів, тканин та клітин
[2]ДУ «Національний інститут хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова НАМН України»

Резюме. Метою проведеного дослідження було визначення можливості диференціювання за адипогенним напрямком клітин, що виділені з жирової тканини та їх впливу на процеси резорбції пересадженого жирового графту, за умов алогенної трансплантації.

Результати дослідження засвідчили, що поєднана трансплантація жирового графту та мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин, що виділені з алогенної жирової тканини, призводить до активації деструктивно-запальних процесів у жировому графті, погіршенню виживання адипоцитів та в подальшому до значного дефіциту маси трансплантата.

Ключові слова: трансплантація, стовбурові клітини, жирова тканина.

Вступ. У науковій літературі широко обговорюється можливість використання мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК), що виділені з жирової тканини для захисту трансплантата від тканинної резорбції [4, 5].

Метод автологічної трансплантації жирової тканини, а саме ліпофілінг є поширеним методом корекції контурних естетичних та косметичних дефектів поверхневих м'яких тканин [2, 3].

Незважаючи на переваги застосування зазначеної методи, існують і недоліки, які пов'язані насамперед із розсмоктуванням трансплантованої тканини та подальшим фіброзуванням [1].

Залишається невивченим питання впливу трансплантації алогенних ММСК на процеси приживлення та функціонування автологічної жирової тканини, в разі якщо автологічний клітинний матеріал використати для виділення та культивування до необхідної, дієвої клітинної маси неможливо або існує потреба швидкого отримання клітинного трансплантата.

Мета роботи. Дослідити можливість диференціювання за адипогенним напрямком клітин, що виділені з жирової тканини, та їх вплив на процеси резорбції пересадженого жирового графту, за умов алогенної трансплантації.

Матеріл і методи. Як лабораторні тварини, на яких було проведено експериментальне дослідження, використані самки мишей ліній FVB ("дикий тип") та FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J (трансгенні по гену зеленого флуоресцентного білка - GFP) з масою тіла 25-30 г, які утримувались у стандартних умовах віварію.

Експеримент на тваринах проводили з дотриманням всіх вимог біоетики та норм біологічної безпеки.

Алогенні ММСК отримували шляхом клітинного культивування з жирової клітковини трансгенних по гену GFP мишей, що вилучалась з інгвінальних ділянок після евтаназії.

Адипогенне диференціювання проводили шляхом висівання клітин у 6-лунковий планшет у концентрації 5 х 10^3/см^2. Через 24 години робоче живильне середовище замінювали на диферинціювальне живильне середовище, що складалося з DMEM-LG, 10 % FBS, 1 % антибіотика (Ceftriaxonum), 50 мкМ індометацину, 1 мкМ дексаметазону, 0,5 мМ IBMX. Заміну дифернціювального живильного середовища проводили кожні 72 години, протягом 28 діб.

Упродовж цього періоду спостерігали за зміною активності проліферації клітин, їх морфології, відзначали часові інтервали змін характеристик культури. Зафіксований моношар клітин забарвлювали за допомогою Oil Red O та гематоксилін-еозину.

Гетеротопічну трансплантацію фрагментів підшкірної жирової тканини у лабораторних мишей лінії FVB («дикого типу») проводили шляхом пересадки фрагмента (графту) інгвінальної жирової клітковини під шкіру по обидва боки від хребта, формуючи при цьому ложе для автотрансплантатів.

Тваринам з одного боку пересаджували клітинно-тканинний трансплантат, що складався з автологічного жирового графту та алогенного клітинного матеріалу (з розрахунку $0{,}5 \cdot 10^6$ клітин), а з іншого, контрлатерального боку пересаджували автологічний матеріал, в який уводили аналогічний за об'ємом фізіологічний розчин.

Через 14 та 28 діб від початку експерименту тварини підлягали евтаназії шляхом цервікальної дислокації з попередньою наркотизацією в парах ефіру.

Виділені шляхом секції трансплантати жирової тканини зважували, промивали в 1 мл 0,9 % розчину NaCl та фіксували для подальших досліджень у 4 % розчині параформальдегіду на фосфатно-сольовому буфері (pH 7,4) протягом 24 годин.

Подальші дослідження передбачали гістологічні, імуногістохімічні, морфометричні та статистичні методи.

Результати дослідження та їх обговорення. Результати дослідження культури клітин, що виділені з жирової тканини, свідчили про те, що в клітинній культурі домінували клітини розміром до 80 мкм, що містили значну кількість вакуолей та гранул.

© Р.В. Салютін , С.С. Паляниця, К.М. Запольська, Л.А. Панченко, В.А. Шаблій, 2016

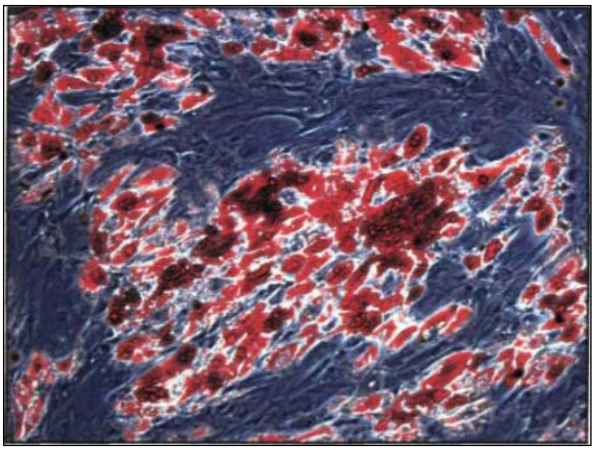

Рис. 1. Адипогенне диференціювання клітин, що виділені з жирової тканини, 28-ма доба експерименту (зб.х 200)

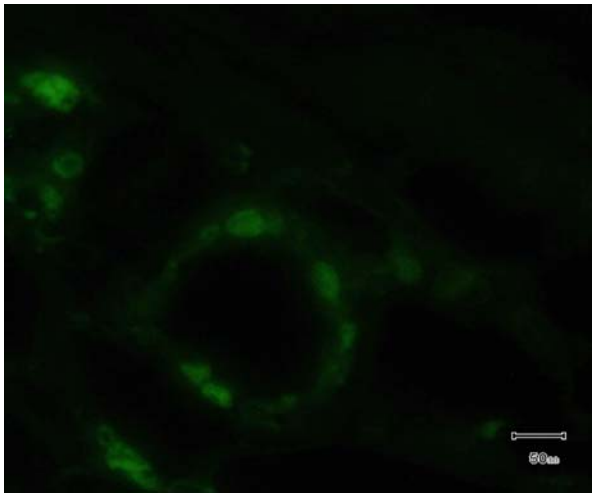

Рис. 3. Гістопрепарат контрлатерального гетеротопічно трансплантованого фрагмента жирової тканини через 4 тиж. після трансплантації. Флуоресцентна мікроскопія; зелений колір – донорські ММСК

Саме ці клітини характеризувалися фібробластоподібною структурою, високою адгезивністю, колонієутворенням та здатні проліферувати в культурі більш ніж 72 рази.

З метою визначення можливості диференціювання клітин в адипогенному напрямку останні були піддані направленій індукції.

Культивування клітин, в ангіогенному живильному середовищі, призводило до утворення в клітинах ліпідних вакуолей, які мали тенденцію до злиття та утворення єдиного жирового включення, формуючи таким чином «кільце-печатку», яка є характерною для зрілих адипоцитів.

Клітинне ядро зміщується до периферії, а цитоплазма являє собою лише вузький обідок, а сама клітина набувала кулястої форми.

Окрім того, у клітинах накопичувались нейтральні жири, а самі клітини утворювали кластери адипоцитів. Подібні морфологічні перетворення клітин свідчать про набування останніми характеристик жирової тканини – адипоцитів, що підтверджувалося забарвленням Oil Red O та гематоксиліном (рис. 1).

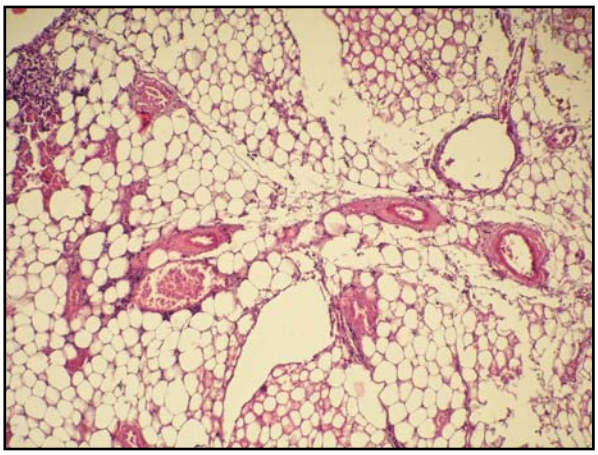

Рис. 2. Фрагмент жирової тканини збагаченої ММСК, 4-й тиждень експерименту. Ділянка фібриноїдного некрозу, гіаліноз стінок судин (зб.х100)

Морфометричний аналіз свідчив, що 75 % клітин у культурі диференціювалися в адипогенному напрямку.

Отримані результати експерименту in vitro дозволили перейти до другої частини дослідження, а саме до визначення можливості використання алогенних ММСК жирової тканини для захисту пересадженого жирового графту від тканинної резорбції.

Через два тижні після гетеротопічної автологічної трансплантації фрагментів жирової тканини разом ММСК спостерігався достовірно (p=0,05) нижчий дефіцит маси клітинно-тканинного трансплантата, порівняно з жировим графтом, в який не трансплантували ММСК.

На 4-й тиждень після трансплантації спостерігалася протилежна тенденція: дефіцит маси тканинно-клітинного та тканинного графтів становив 55,0±22,1 % і 33,6±21,2 % (p=0,05) відповідно.

Результати поведеного на 2-й тиждень експерименту гістологічного дослідження фрагментів трансплантованих графтів як клітинно-тканинних, так і з уведеним фізіологічного розчину, свідчили про наявність ділянок лізису адипоцитів, набряку периваскулярного простору та лімфоцитарно-макрофагальної інфільтрації.

На 4-й тиждень експерименту при гістологічному досліджені в біоптатах виявляли ділянки фібриноїдного некрозу, кальцифікації, сладж еритроцитів та гіалінозу судинної стінки (рис.2).

Необхідно зауважити, що некротичні ділянки та прояви інфільтраційного набряку жирової тканини були більш вираженими в клітинно-тканинних графтах, ніж у графтах, в які вводили фізіологічний розчин.

Морфометричний аналіз показав, що при уведені в жирову тканину ММСК спостерігається тенденція до підвищення інтенсивності некрозу адипоцитів, порівняно з жировою тканиною, в яку вводили фізіологічний розчин.

Необхідно відзначити інтенсифікацію некрозу адипоцитів (майже в 3 рази) у жирових граф-

тах, починаючи з 2-го до 4-го тижня після експериментальної гетеротопічної трансплантації.

Виходячи з вищевказаного, можна припустити, що гетеротопічна трансплантація фрагментів жирової тканини разом із ММСК призводить до інтенсифікації запального процесу, некрозу адипоцитів порівняно з результатами дослідження фрагментів жирової тканини тварин групи порівняння, що, у свою чергу, веде до прискорення розвитку деструктивних процесів у трансплантатах.

Тому і фіксується вище наведена динаміка зміни маси трансплантованих графтів.

У клітинно-тканинному графті вже до другого тижня експерименту розвиваються дегенеративно-дистрофічні процеси, що зумовлюють накопичення позаклітинної, запальної рідини та помилково-позитивну стабілізацію маси трансплантованого графту.

У тканинному графті процеси тканинної резорбції починаються більш активно, без інфільтративно-запального періоду, що зумовлює поступову та стабільну втрату маси трансплантованого графту.

На 4-й тиждень після трансплантації процеси тканинної резорбції поступово стабілізуються, а в тканинно-клітинному активно продовжується у зв'язку з деструкцією адипоцитів та втратою позаклітинної рідини.

Окрім того, можна припустити, що на антигени ММСК формується імунна відповідь або продукти секреції чи розпаду цих клітин стимулюють макрофагально-лімфоцитарну інфільтрацію.

На 2-й та 4-й тиждень після гетеротопічної трансплантації клітинно-тканинного графту при проведенні імуногістохімічного дослідження встановлено наявність у досліджуваному біоптаті трансплантованих мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин.

Необхідно відзначити зростання ($p \leq 0.05$) кількості виявлених ММСК на 4-й тиждень експерименту, причому виявлені стовбурові клітин переважно розташовувались у стінках дрібних судин, що дозволяє припустити ендотеліальний напрямок клітинного диференціювання та вказує на відсутність відторгнення клітинного матеріалу.

Цікавим є факт того, що алогенні ММСК, трансплановані спільно з жировим графтом, були здатні до міграції.

При проведенні імуногістохімічного дослідження контрлатерального гетеротопічно трансплантованого жирового графту, в який введено фізіологічний розчин, виявлені донорські стовбурові клітини (рис.3).

Окрім того, клітини, що мігрували, локалізувались переважно в стінках судин дрібного та середнього калібру.

Отже, результати проведеного дослідження свідчать про те, що клітини, виділені з жирової тканини, здатні за умов in vitro до диференціації в адипогенному, а за умов in vivo – в ендотеліальному напрямку, що відкриває значні перспективи їх використання в регенераторно-відновній медицині.

Однак трансплантація алогенних ММСК задля захисту жирового графту від тканинної резорбції не досягає поставленої мети. Уведення до жирового графту алогенних ММСК призводить до посилення процесів запалення, некрозу адипоцитів, та як наслідок посилення тканинної резорбції та дефіциту маси трансплантата.

Отримані результати вимагають подальших експериментальних досліджень та вказують про необхідність проведення досліджень перебігу репаративних процесів у пересадженому клітинно-тканиному графті, що має тільки автологічне походження.

Висновки

1. Клітини, що виділені з жирової тканини, здатні до диференціювання в адипогенному напрямку, за умов культивування в індукційному середовищі.

2. Поєднана трансплантація жирового графту та мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин, що виділені з алогенної жирової тканини, призводить до активації деструктивно - запальних процесів у жировому графті, погіршенню виживання адипоцитів та в подальшому до значного дефіциту маси трансплантата.

3. Результати експериментальних досліджень вказують на недоцільність використання в клінічній практиці клітинно-тканинного графту, що складається з алогенного донорського матеріалу та автологічної жирової тканини.

Література

1. Влияние различных режимов обработки аспирированной жировой ткани на ее морфологическую структуру / В.И. Малаховская, З.Ю. Висаитова [и др.] // Анналы пласт., реконструктив. и эстет. хирургии. – 2009. – № 2. – С. 10-16.
2. Кудзаев У. Эстетическая коррекция нижних конечностей / У. Кудзаев // Анналы пласт., реконструктив. и эстет. хирургии. – 2002. – № 4. – С. 56-58.
3. Опыт применения аутолипофилинга при инволюционных изменениях лица и других дефектах кожи / О.С. Панова, И.А. Петров [и др.] //Анналы пласт., реконструктив. и эстет. хирургии. – 2002. – № 4. – С. 45-47.
4. Effects of Expanded Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells on the Viability of Cryopreserved Fat Grafts in the Nude Mouse / M.S. Ko, JY. Jung, IS. Shin [et al.] // Int. J. Med. Sci. – 2011. – Vol. 8 (3). – P. 231-238.

ПРИМЕНЕНИЕ АЛЛОГЕННЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, КОТОРЫЕ ВЫДЕЛЕНЫ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ПРОЦЕССЫ РЕЗОРБЦИИ ПЕРЕСАЖЕННОГО ЖИРОВОГО ГРАФТА

Р.В. Салютин [1,2], С.С. Паляница[1], К.М. Запольская[2], Л.А. Панченко[1], В.А. Шаблий [1]

Резюме. Целью проведенного исследования было определение возможности дифференцирования в адипогенном направлении клеток, что выделены из жировой ткани и их влияние на процессы резорбции пересаженного жирового графта, в условиях аллогенной трансплантации.

Результаты исследования свидетельствовали о том что сочетанная трансплантация жирового графта и мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток, которые выделены из аллогенной жировой ткани, приводит к активации деструктивно-воспалительных процессов в жировом графте, ухудшению виживания адипоцитов, а в дальнейшем – к значительному дефициту массы трансплантата.

Ключевые слова: трансплантация, стволовые клетки, жировая ткань.

APPLICATION OF ALLOGENIC MULTIPOTENT MESECHYMAL STEM CELLS WHICH ARE ABSTRACTED FROM FATTY FABRIC AND THEIR INFLUENCE ON THE PROCESSES OF RESORPTION OF THE TRANSPLANTED FAT

R.V. Saliutin[1,2], S.S. Palianytsia[1], K.M. Zapolska[2], L.A. Panchenko[1], V.A. Shablii[1]

Abstract. The purpose of the research was to define the possibility of differentiation in adipogenic direction between the cells which had been separated from body fat and their influence on resorption processes of the transplanted fat, in the conditions of allogenic transplantation.

The research results showed that the combined transplantation of fat graft and multipotent mesenchymal stem cells which had been separated from allogenic body fat leads to activation of destructive and inflammatory processes in fat graft, decrease in survival of adipocytes and, subsequently, to a huge deficit of transplant weight.

Key words: transplantation, stem cells, adipose tissue.

[1]Coordinating Center of transplantation for organs, tissue and cells
[2]GU "A.A. Shalimov National institute of surgery and transplantology of NAMN of Ukraine"

Рецензент – проф. І.С. Давиденко Buk. Med. Herald. – 2016. – Vol. 20, № 3 (79). – P. 161-164

Надійшла до редакції 07.07.2016 року

© Р.В. Салютін , С.С. Паляниця, К.М. Запольська, Л.А. Панченко, В.А. Шаблій, 2016