

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ



УДК 576.3./7+616—008.847.9—008.9—089.843—092.4—092.9

ТРАНСПЛАНТАЦІЯ ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ, ЗБАГАЧЕНОЇ АЛОГЕННИМИ МЕЗЕНХІМАЛЬНИМИ МУЛЬТИПОТЕНТНИМИ СТОВБУРОВИМИ КЛІТИНАМИ, В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТУ

Ю. В. Поляченко, К. М. Запольська, О. В. Кучук, В. М. Кирик, О. М. Цупіков, П. П. Клименко, Р. В. Салютін, Г. М. Онищенко, В. А. Шаблій

Національний інститут хірургії та трансплантології імені О.О. Шалімова НАМН України, м. Київ, 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

TRANSPLANTATION OF ADIPOSE TISSUE, ENRICHED BY ALLOGENIC MESSAGES ENCHYMAL MULTIPOTENT STEM CELLS IN EXPERIMENTAL CONDITIONS

Yu. V. Polyachenko, K. M. Zapoblska, O. V. Kuchuk, V. M. Kirik, O. M. Tsupikov, P. P. Klímenko, R. V. Salyutin, G. M. Onishchenko, V. A. Shablii

РЕФЕРАТ

Проведене експериментальне дослідження з метою вивчення впливу трансплантації нативних алогенних мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин на процеси приживлення та функціонування гетеротопічно трансплантованої аутологічної жирової тканини. В клітинно-тканинному графті, де як клітинний компонент використані нативні алогенні мезенхімальні стовбурові клітини, відзначали погіршення показників виживання адипоцитів та активацію деструктивних і запальних процесів.

Ключові слова: трансплантація; стовбурові клітини; жирова тканина.

SUMMARY

There was conducted experimental investigation with objective to study up the influence of transplantation of a native allogenic multipotent mesenchymal stem cells on the processes of implantation and functioning of heterotopically transplanted autologous adipose tissue. In a cellular-tissue graft, in which native allogenic mesenchymal stem cells were applied as a cellular component, there was observed a worsening of the adipocytes survival indices as well as activation of destructive and inflammatory processes.

Key words: transplantation; stem cells; adipose tissue.

В останні роки в естетичній і пластичній хірургії з метою корекції та заповнення дефектів м'яких тканин широко застосовують методи ауто-трансплантації жирової тканини, отриманої під час ліпосакції – ліпофілінг [1, 2].

Ці методи мають значні переваги у порівнянні з використанням синтетичних наповнювачів, особливо щодо віддалених клінічних результатів [3].

Проте, незважаючи на переваги клінічного використання методу ліпофілінгу, існують і недоліки, зокрема, необхідність виконання повторних втручань, що, насамперед, пов'язане з лізисом введеного аутоліпоаспірату та фіброзуванням підшкірного прошарку. Крім того, механічне або хімічне оброблення аутоліпоаспірату негативно впливає на тривалість та естетичність клінічного результату.

В зарубіжній та вітчизняній науковій літературі є публікації, в яких обговорюється доцільність застосування як "наповнювача" контурних дефектів комбінованих тканинно-клітинних трансплантатів, в яких основні складові отримані з аутологічної жирової тканини, пов'язуючи перспективність застосування клітинно-тканинного ліпофілінгу з додатковим введенням в жирову тканину значної кількості мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) жирової клітковини, що мають значний біологічний потенціал, здатні до диференціювання

та потенціювання викидання власних факторів росту та інших біологічно активних речовин [4, 5].

Проте, не вивчене питання щодо впливу трансплантації алогенних ММСК на процеси приживлення та функціонування аутологічної жирової тканини.

Мета роботи: вивчення впливу трансплантації нативних алогенних ММСК на процеси приживлення та функціонування аутологічної жирової тканини в умовах експерименту.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліди проведені на самках мишей ліній FVB ("дикий тип") та FVB-Cg-Tg(GFP)5Nagy/J (трансгенні за геном зеленого флуоресцентного білка – GFP) з масою тіла 25–30 г, яких утримували у стандартних умовах виварію. Всі роботи з дослідними тваринами проводили з дотриманням усіх принципів біоетики та норм біологічної безпеки.

Алогенні ММСК отримували шляхом культивування з жирової клітковини трансгенних за геном GFP мишей, яку вилучали з пахвинних ділянок після евтаназії. Отриману культуру характеризували за фенотипом (з використанням моноклональних антитіл до мембранних антигенів миші, мічених флуорохромами) та потенціалом до спрямованого диференціювання за стандартними методиками з використанням проточного цитофлуориметра–сортера BD FACSAria (Becton Dickinson, США) та програми BD FACS Diva 6.1.

Під час експерименту дослідні тварини розподілені на дві групи. До першої групи включені тварини, яким здійснено гетеротопічне пересадження фрагменту жирової клітковини без введення ММСК (вводили фосфатно–сольовий буфер – ФСБ); до другої групи – тварини, яким виконано гетеротопічну трансплантацію клітинно–тканинного трансплантату і введення ММСК, в контралатеральний трансплантований фрагмент вводили ФСБ.

Гетеротопічну трансплантацію фрагментів підшкірної жирової тканини у лабораторних мишей лінії FVB ("дикого типу") проводили шляхом пересадження фрагменту пахвинної жирової клітковини під шкіру по обидва боки від хребта, формуючи ложе для аутоотрансплантатів.

При комбінованій тканинно–клітинній трансплантації в фрагмент аутологічної жирової тканини (клітковини) вводили клітинний трансплантат з розрахунку $0,5 \times 10^6$ клітин у 25 мкл ФСБ в одній ін'єкції.

Через 14 і 28 діб експерименту здійснювали евтаназію тварин шляхом цервікальної дислокації з попередньою наркотизацією ефіром.

Виділені трансплантати жирової тканини зважували, промивали в 1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду, фіксували для подальших досліджень у 4% розчині параформальдегіду на ФСБ (рН 7,4) протягом 24 год.

Проводили гістологічні, імуногістохімічні, морфометричні та статистичні дослідження.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що морфологія та імунофенотип клітин, виділених з жирової клітковини, були ідентичні таким ММСК кісткового мозку. Стромальні клітини жирової тканини в культурі клітин *in vitro* позитивні за поверхневими маркерами CD44, CD73, CD90, Sca-1 та негативні за маркерами CD38, CD45, CD34, CD31 та CD117.

Для підтвердження мультипотентних властивостей виділених ММСК проведено спрямоване диференціювання культур в остеогенному та хондрогенному напрямках.

Під час культивування стромальних клітин, виділених з жирової клітковини, в середовищі з індукторами остеогенезу на 3–тю добу індукції підвищувалася активність лужної фосфатази (маркер остеобластів).

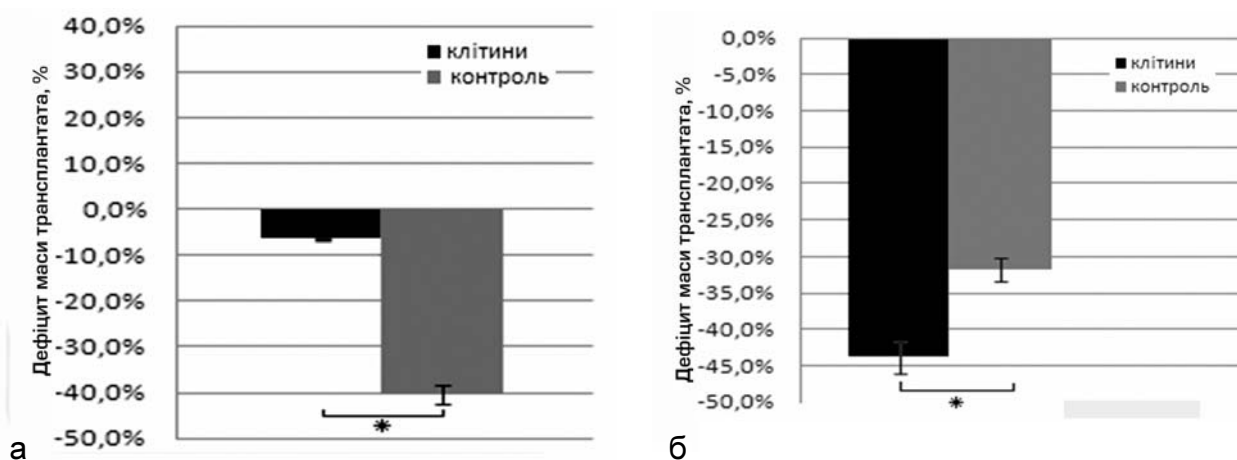


Рис. 1. Дефіцит маси трансплантатів жирової тканини через 2 (а) та 4 (б) тиж після трансплантації.

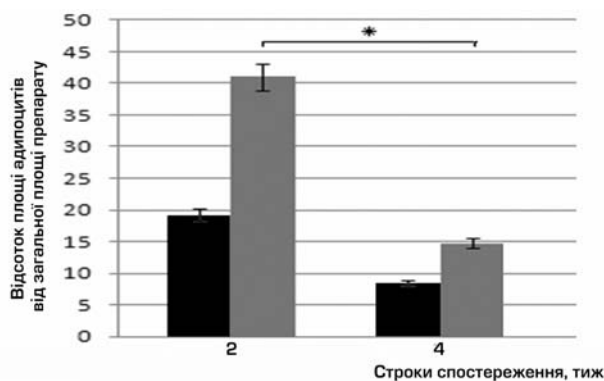


Рис. 2. Морфометричний аналіз гістологічних препаратів трансплантатів жирової тканини через 2 і 4 тиж після трансплантації.

Накопичення кальцифікованого матриксу в культурі клітин за умови остеогенної індукції не спостерігали.

Проте, під час проведення комбінованого диференціювання, а саме: спочатку — у хондрогенному напрямку, потім — в остеогенному (за методом Вон Косса) виявлені великі ділянки відкладення солей кальцію в позаклітинному матриксі.

Тривалість перебування клітин під впливом хондрогенного середовища та умови культивування були аналогічні таким клітин за остеогенного диференціювання.

Оскільки в отриманих стромальних клітинах позитивні маркери CD44, CD73, CD90, Sca-1, негативні — CD38, CD45, CD34, CD31, CD117 та за умови культивування в середовищі з індукторами остеогенезу, хондрогенезу та адипогенезу вони диференціюються в цих напрямках, можна стверджувати, що ця культура клітин відповідає характеристикам ММСК.

Встановлено, що через 2 тиж після аутологічної трансплантації фрагментів жирової тканини разом з ММСК, отриманими з жирової тканини від сиблінгової лінії мишей, які несуть ген GFP, спостерігали достовірно менший дефіцит маси трансплантата, ніж у контролі.

Так, у тварин, яким здійснювали трансплантацію жирової тканини разом з ММСК, дефіцит маси трансплантата був достовірно меншим, ніж у контрольній групі — відповідно ($22,3 \pm 14,0$) та ($45,6 \pm 21,2$)% ($n=3$, $P=0,05$) (рис. 1).

На 4-му тижні після трансплантації спостерігали протилежну тенденцію: дефіцит маси трансплантата в основній та контрольній групах становив відповідно — ($55,0 \pm 22,1$) і ($33,6 \pm 21,2$)% ($n=4$, $P=0,05$).

Подібні результати отриманні іншими дослідниками при трансплантації імунодефіцитним мишам суспензії жирової клітковини людини, збагаченої ММСК [6].

За даними гістологічного аналізу фрагментів жирової тканини у тварин як першої, так і другої груп че-

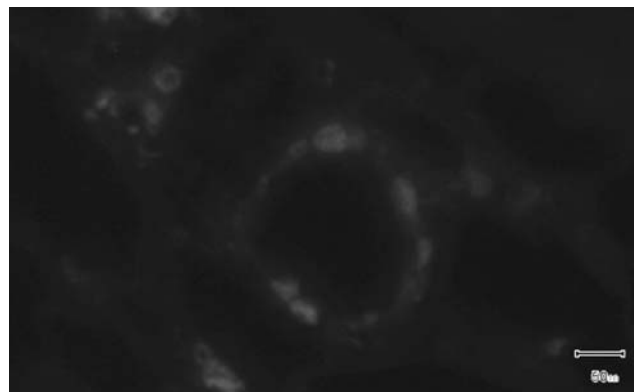


Рис. 3. Мікрофото. Збагачений ММСК трансплантат жирової клітковини через 4 тиж після трансплантації. Флуоресцентна мікроскопія; зелене забарвлення - донорські ММСК.

рез 2 тиж після трансплантації виявлені ділянки лізису адипоцитів, набряк периваскулярного простору, фібриноїдний некроз, лімфоцитарно-макрофагальна інфільтрація та кальцифікація. Також відзначали стаз, тромбоз, сладж еритроцитів, гіаліноз стінок судин.

За даними морфометричного аналізу, при введенні ММСК від сиблінгової лінії тварин спостерігали тенденцію до збільшення вираженості некрозу адипоцитів, набряку та інфільтрації трансплантатів у порівнянні з відповідними контролями на 2-му і 4-му тижні після трансплантації (рис. 2).

Також відзначали зменшення вмісту адипоцитів в трансплантатах як в контрольній (майже у 3 рази), так і основній (майже у 2 рази) групах з 2-го до 4-го тижня після трансплантації.

Більш виражений некроз адипоцитів та набряк тканини через 4 тиж в контрольній групі, можливо, є причиною достовірно меншого дефіциту маси трансплантатів у порівнянні з таким в основній групі.

Отже, можна припустити, що трансплантація фрагментів жирової тканини разом з ММСК зумовлює збільшення вираженості запального процесу у порівнянні з такою у контрольних зразках, що, в свою чергу, спричиняє прискорення формування деструктивних процесів у трансплантатах.

Під час імуногістохімічного аналізу встановлено присутність ММСК на 2-му та 4-му тижні після трансплантації (рис. 3).

Кількість ММСК збільшувалася на 4-му тижні після трансплантації, що свідчило про відсутність ознак відторгнення та їх можливу проліферацію.

Також більшість ММСК містилися в стінках дрібних судин, що дозволяє припустити їх ендотеліальне диференціювання. Встановлено, що ММСК здатні до міграції в контралатерально розташований трансплантат жирової клітковини, в який вводили ФСБ, та можуть вбудовуватись у стінки судин.

Отже, після трансплантації фрагментів жирової тканини спостерігали ознаки запального процесу в

трансплантатах, що супроводжувалося лізисом адипоцитів, кальцифікацією, гіалінозом судин та фіброзом тканини. Введення аlogenних ММСК, отриманих з жирової тканини мишей, зумовлювало збільшення вираженості деструктивних процесів у трансплантаті.

Виходячи з цього, можна припустити формування імунної відповіді на антигени ММСК або стимуляцію макрофагально—лімфоцитарної інфільтрації продуктами секреції чи розпаду цих клітин.

Отримані результати свідчать про доцільність проведення подальших експериментальних досліджень та необхідність порівняльних досліджень впливу аутологічних ММСК на перебіг репаративно—деструктивних процесів при трансплантації аутологічної жирової тканини.

ВИСНОВКИ

1. Введення нативних аlogenних ММСК в жирову тканину сприяє збільшенню вираженості деструктивних і запальних процесів в трансплантатах жирової клітковини.

2. В трансплантованому клітинно—тканиному комплексі, де як клітинний компонент використані

алогенні ММСК, відзначене погіршення показників виживання адипоцитів.

3. ММСК здатні до приживлення та диференціювання в ендотеліальному напрямку та можуть переміщуватись кровотоком у віддалені від зони трансплантації частини тіла тварин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Павлюк—Павлюченко Л. Я. Отдаленные результаты липофиллинга (ауто трансплантации жировой ткани) с целью контурной пластики молочных желез / Л. Я. Павлюк—Павлюченко, А. А. Шахов // *Анналы пласт., реконстр. и эстет. хирургии.* — 2001. — № 2. — С. 21 — 41.
2. Кудзаев У. Эстетическая коррекция нижних конечностей / У. Кудзаев // *Там же.* — 2002. — № 4. — С. 56 — 58.
3. Coleman S. Long-term survival of fat transplants: Controlled demonstrations / S. Coleman // *Aesth. Plast. Surg.* — 1995. — Vol. 19. — P. 421 — 425
4. Gomillion C. T. Stem cells and adipose tissue engineering / C. T. Gomillion, K. J. Burg // *Biomaterials.* — 2006. — Vol. 27, N 36. — P. 6052 — 6063.
5. Wickham M. Q. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee / M. Q. Wickham, G. R. Erickson, J. M. Gimble // *Clin. Orthop.* — 2003. — Vol. 78. — P. 196 — 204.
6. Effects of expanded human adipose tissue—derived mesenchymal stem cells on the viability of cryopreserved fat grafts in the nude mouse / M. S. Ko, J. Y. Jung, I. S. Shin [et al.] // *Int. J. Med. Sci.* — 2011. — Vol. 8, N 3. — P. 231 — 238.

