

ОСОБЛИВОСТІ ГЕТЕРОТОПІЧНОЇ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ЖИРОВОГО ГРАФТА, ЗБАГАЧЕНОГО АЛОГЕННИМИ КРІОКОНСЕРВОВАНИМИ СТОВБУРОВИМИ КЛІТИНАМИ ЖИРОВОГО ЛІПОАСПІРАТУ

О. Ю. Усенко, Р. В. Салютін, К. М. Запольська, С. С. Паляниця, Л. А. Панченко

Координаційний центр трансплантації органів, тканин та клітин МОЗ України,
Національний інститут хірургії та трансплантології імені О. О. Шалімова НАМН України, м. Київ

PECULIARITIES OF HETEROTOPIC TRANSPLANTATION OF ADIPOSE GRAFT, ENRICHED BY ALLOGENIC CRYOCONSERVED STEM CELLS FROM ADIPOSE LIPOASPIRATE

O. Yu. Usenko, R. V. Salyutin, K. M. Zapolska, S. S. Palyanytsya, L. A. Panchenko

В останнє десятиріччя під час корекції об'ємно—контурної деформації/дефектів м'яких тканин активно застосовують пересадження аутологічної жирової клітковини — ліпофілінг [1, 2]. Метод має переваги у порівнянні з іншими методами корекції, основаними на використанні синтетичних та біологічних філерів.

Проте, відзначають і недоліки клінічного використання ліпофілінгу, насамперед, здатність до резорбції пересаженої тканини та її заміщення фіброзною тканиною, що потребує проведення етапного ліпофілінгу з короткими міжтрансплантаційними інтервалами [3].

Впровадження в клінічну практику клітинних технологій зумовило необхідність наукового пошуку щодо перспектив використання клітинно—тканинних графтів, що складаються з жирової тканини та клітинного трансплантата, для заповнення дефектів м'яких тканин [4].

Результати первинних досліджень та клінічних експериментів досить суперечливі, потрібні додаткові дослідження та експериментальне обґрунтування.

У фахових наукових виданнях немає інформації про дослідження клітинно—тканинного графта, що складається з ліпоаспірату та донорського клітинного матеріалу (ММСК, виділені з алогенної жирової клітковини).

Реферат

Вивчені можливості використання донорського кріоконсервованого клітинного матеріалу (мезенхімальних стовбурових клітин, виділених з жирової тканини) для захисту трансплантованого жирового графта від тканинної резорбції. Збагачення жирового графта кріоконсервованими алогенними мезенхімальними мультипотентними стовбуровими клітинами (ММСК), виділеними з жирової тканини, зумовлювало активацію деструктивно—запальних процесів у жировому графті, погіршенню виживання адипоцитів, у подальшому — дефіцит маси трансплантата. Використання в клінічній практиці донорських кріоконсервованих стовбурових клітин з метою захисту пересаженої жирової тканини від тканинної резорбції вважаємо недоцільним.

Ключові слова: трансплантація; стовбурові клітини; жирова тканина; тканинна резорбція.

Abstract

Possibilities of application of the donor cryoconserved cellular material (mesenchymal stem cells, obtained from adipose tissue) for defense of transplanted adipose graft from the tissue resorption were studied. The adipose graft enrichment, using cryoconserved allogenic mesenchymal multipotent stem cells, obtained from adipose tissue, caused activation of destructive—inflammatory processes in adipose graft, the adipocytes survival worsening, and in further — the transplant mass deficiency. We suggest inexpedient to apply in clinical practice the donor cryoconserved stem cells for defense of transplanted adipose tissue from the tissue resorption.

Key words: transplantation; stem cells; adipose tissue; the tissue resorption.

Мета дослідження: вивчення можливостей використання донорського кріоконсервованого клітинного матеріалу (ММСК, виділених з жирової тканини) для захисту трансплантованого жирового графта від тканинної резорбції.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експеримент проведений на базі Інституту генетичної та регенеративної медицини НАМН України з дотриманням принципів біоетики, норм біологічної безпеки та вимог щодо захисту хребетних тварин,

яких використовують з експериментальною або/та іншою науковою метою. Використані самки мишей "дикого типу" ліній FVB та FVB—Cg—Tg(GFPU)5Nagy/J (трансгенні лінії, які несуть ген зеленого флуоресцентного білка медуз — GFP), маса тіла у середньому ($27 \pm 1,12$) г.

Алогенну жирову тканину для отримання донорського клітинного матеріалу вилучали (після евтаназії тварини) з пахвинних ділянок мишей.

Шляхом етапної механічної обробки підшкірного прошарку та культивування отримували культуру

ММСК, які консервували у рідкому азоті при температурі -196°C .

Тваринам здійснювали гетеротопічну трансплантацію (шляхом пересадження фрагменту пахвинної жирової клітковини під шкіру по обидва боки від хребта), двох графтів — тканинного та контралатерально — тканинно—клітинного, до складу якого входили донорські кріоконсервовані ММСК. Кінцеву концентрацію для трансплантації кріоконсервованих клітин готували з розрахунку $0,5 \times 10^6$ клітин для однієї ін'єкції (трансплантації).

На 14—ту та 28—му добу експерименту після евтаназії у тварин вилучали трансплантовані графти, які досліджували з використанням гістологічних, імуногістохімічних та морфометричних методів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На 2—му тижні після пересадження клітинно—тканинного графта його маса збільшилась на 27,9% ($p < 0,01$) у порівнянні з початковою. Через 4 тиж маса графта зменшилась на 29,8% від початкової ($p < 0,05$).

Аналогічні зміни спостерігали і в групі тварин, яким трансплантували тканинний графт, маса якого дещо збільшувалася до 2—го тижня експерименту, до 4—го тижня — зменшувалася. При цьому, його маса була меншою, ніж маса клітинно—тканинного графта ($p < 0,05$).

Тимчасове збільшення маси клітинно—тканинного графта можна пояснити впливом ДМСО (кріоконсервуючого розчину), який в залишковій концентрації вводили з ММСК, оскільки при введенні лише ДМСО в тканинний графт також спостерігали тимчасове збільшення його маси.

Відповідна різниця маси трансплантованих графтів на 4—му тижні експерименту, а саме, менш виражений дефіцит маси клітинно—тканинного графта, зумовлена негативним впливом трансплантованих клітин та ДМСО з більш активним накопиченням та поступовою втратою позаклітинної запальної рідини в графті, збагаченому кріоконсервованими ММСК. Зміни маси трансплантованих графтів корелювали з

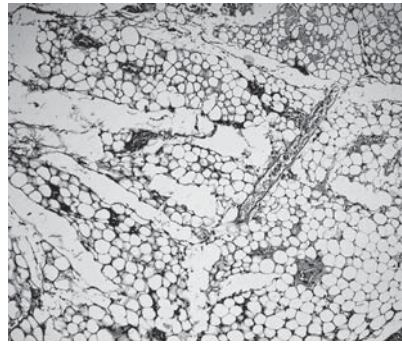


Рис. 1.
Мікрофото.
Фіброз і гіаліноз стінок судин,
фібриноїдний некроз.
Стаз та сладж еритроцитів.
Забарвлення гематоксилином та
еозином.
36. $\times 100$.

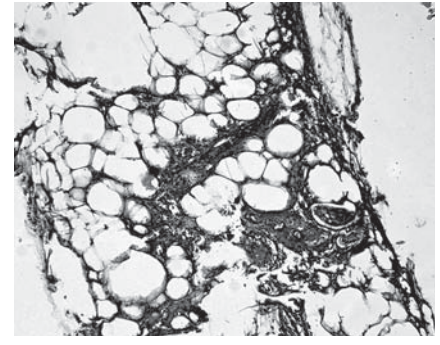


Рис. 2.
Мікрофото.
Фібриноїдний некроз, утворення
кальцифікатів.
Забарвлення гематоксилином та
еозином.
36. $\times 100$.

змінами їх морфологічних характеристик.

На 2—му тижні експерименту клітинно—тканинні графти були темно—жовтого забарвлення, набряклі, по лінії розрізу фіксували надмірну кількість позаклітинної рідини у вигляді рясної "краплі роси".

Аналогічні морфологічні зміни відзначали і у тканинних графтах.

Висічення досліджуваних графтів, як тканинних, так і збагачених клітинним матеріалом, на 2—му тижні експерименту не становило технічних труднощів через інфільтрацію навколишніх тканин.

На 4—му тижні експерименту графти зменшувалися, зморщувалися та набували сіро—жовтого забарвлення.

У зв'язку з формуванням фіброзної капсули навколо трансплантатів їх висічення було утруднене (графти, особливо тканинні, важко було розсікати).

За даними гістологічного дослідження, на 2—му тижні експерименту в тканинних та клітинно—тканинних графтах відзначали сладж еритроцитів, лімфоцитарно—макрофагальну інфільтрацію та перивезикальний набряк (рис. 1).

Зазначені зміни були найбільш виражені в клітинно—тканинних графтах, лізис адипоцитів та фіброзування жирової тканини — у тканинних трансплантатах.

На 4—му тижні експерименту в тканинних графтах виявляли виражений фібриноїдний некроз жирової тканини, утворення сполучнотканинних тяжів та кальцифікатів (рис. 2).

У клітинно—тканинних трансплантатах виявляли макрофагальну інфільтрацію, перивезикальний набряк, початкові ознаки фіброзування жирової тканини, що передувало некрозу та лізису адипоцитів і свідчило про триваючі дегенеративно—дистрофічні й запальні процеси в трансплантатах.

За даними морфометричного аналізу, в тканинно—клітинному графті спостерігали тенденцію до поширення некрозу адипоцитів: площа адипоцитів 26,7% загальної площі гістологічного препарату — на 2—му тижні експерименту та 9,8% — на 4—му тижні після трансплантації ($p < 0,01$).

Некроз адипоцитів також виявляли і в тканинному графті, проте, він був менш вираженим, ніж у тканинно—клітинному графті (15,2% — на 4—му тижні після трансплантації, $p < 0,01$).

Результати імуногістохімічного дослідження свідчили про наявність трансплантованих ММСК в пересаджених графтах на 2—му та 4—му тижні експерименту.

Слід зауважити, що кількість ММСК в трансплантатах на 4—му тижні експерименту збільшувалась,

більшість клітин містились у стінках дрібних судин та середнього діаметра, а також у перивазальному просторі, що свідчило про можливість їх ендотеліального диференціювання.

Трансплантовані ММСК виявляли також у контралатеральному (тканинному) графті, тобто, встановлено, що трансплантовані клітини здатні до мігрування.

Таким чином, збагачення жирового графта алогенними кріоконсервованими ММСК зумовлювало

деструктивно—дегенеративні зміни та асептичне запалення. Тимчасове короткотривале збільшення маси тканини є наслідком запального впливу трансплантованих клітин, що супроводжувалося перивезикальним набряком, та супутньою дією ДМСО, якому притаманні гідрофільні властивості.

ВИСНОВКИ

1. Збагачення жирової тканини алогенними кріоконсервованими ММСК зумовлює дегенеративно—

дистрофічні та запальні зміни у пересадженому графті та, як наслідок, некроз і лізис адипоцитів з подальшим фіброзуванням.

2. Результати проведеного дослідження свідчать про недоцільність використання донорських кріоконсервованих ММСК для запобігання тканинної резорбції жирового трансплантата, оскільки при їх застосуванні у клінічній практиці можливе виникнення значних негативних побічних реакцій.

ЛІТЕРАТУРА

1. Опыт применения аутолипофиллинга при инволюционных изменениях лица и других дефектах кожи / О. С. Панова, И. А. Петров, Ю. А. Бритун, А. Л. Пирузян // *Анналы пласт., реконстр. и эстет. хирургии.* — 2002. — № 4. — С. 45 — 47.
2. Coleman S. Long-term survival of fat transplants: Controlled demonstrations / S. Coleman // *Aesth. Plast. Surg.* — 1995. — Vol. 19. — P. 421 — 425.
3. Hoerl H. W. Autologous fat volume retention evaluation by magnetic resonance imaging / H. W. Hoerl, A. M. Feller // *Private Pract. Plast. Surg. (Munich).* — 2001. — Vol. 4. — P. 41 — 53.
4. Locke M. Human adipose—derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery / M. Locke, J. Windsor, P. R. Dunbar // *Aust. N. Z. J. Surg.* — 2009. — Vol. 79. — P. 235 — 244.

