

## Способность криоконсервированных эмбриональных клеток стимулировать восстановление соединительной ткани после травматического повреждения в эксперименте

Е.Б. РЕВЕНКО, А.Ю. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Усовершенствование способов восстановления травматических повреждений соединительной ткани (ожоги, травматические повреждения хрящевой ткани) остается одной из актуальных социально значимых проблем медицины [1, 2]. Существуют различные способы стимулирования раневого заживления, однако применение лекарственных средств (применение препаратов противовоспалительного действия, витаминов и минералов), новых биомедицинских технологий (трансплантация криоконсервированной ксенокожи, коллагенопластика, применение различных биополимеров), требующих больших материальных затрат, не всегда дают удовлетворительные результаты [3]. Кроме того, большинство этих способов, ускоряя заживление, не влияют непосредственно на структуру образовавшегося после заживления рубца.

Одним из перспективных направлений развития хирургических технологий является изучение и применение эмбриональных стволовых клеток [4]. Особый интерес в настоящее время вызывают клетки эмбрионального происхождения (ЭК), которые обладают способностью к изменениям и дифференцировке в ответ на стимулы окружающей среды в соответствии с заложенной генетической информацией. Одним из преимуществ клеток эмбрионального происхождения является их иммунологическая незрелость, что является немаловажным аргументом для трансплантологии [5]. И, наконец, ЭК содержат и продуцируют большое количество различных ростовых факторов, антиоксидантов, противовоспалительные бактериостатические соединения, пептиды, которые способны влиять на репарацию поврежденных тканей. ЭК мезенхимально-мезодермального происхождения являются фибробластоподобными и вырабатывают специфические компоненты клеточного матрикса – фибронектин, коллаген, протеогликаны, которые являются структурными компонентами соединительной ткани [6].

Таким образом, обладая мощным биологическим потенциалом, ЭК могут воздействовать на

процессы репарации, задействуя ресурсы целого организма.

Целью данной работы явилось сравнительное изучение влияния свежeweделенных и криоконсервированных эмбриональных клеток мезенхимально-мезодермального происхождения на процессы восстановления пораженных участков соединительной ткани на модели глубокого термического ожога кожи и травматического повреждения хряща.

Исходным материалом для сравнительного изучения биологического действия на этих моделях была суспензия ЭК, полученная путем мягкой ферментативной с последующей механической дезагрегацией кожно-мышечной ткани эмбрионов крыс 10-14 дней гестации. Криоконсервирование клеточной суспензии проводили в среде Хенкса под защитой 10% ДМСО и в среде, содержащей 10% ДМСО и 10% эмбриональной сыворотки по 3-х этапной программе. Образцы размораживали непосредственно перед экспериментом на водяной бане при 40°C. Перед введением клеточного материала в область дефектов клетки иммобилизовали путем помещения в случае травматического повреждения в коллагеновую губку, а в случае ожога – в метилцеллюлозный гель.

Работа была выполнена на 54 половозрелых самцах беспородных крыс. 30 животным моделировали глубокую термическую травму; у 24 животных моделировали дефект коленного сустава путем травматического повреждения. В каждой серии эксперимента животные, были разделены на три группы: 1-ю группу составляли животные, которым в область раневого дефекта вводили свежeweделенные эмбриональные клетки; крысам 2-й группы вводили суспензию криоконсервированных эмбриональных клеток; третья группа являлась контрольной (животным в рану вводили в случае ожога – метилцеллюлозный гель, а при травматическом повреждении хряща коленного сустава – коллагеновую губку).

Для оценки морфологических изменений под влиянием клеточной суспензии ЭК использовали гистологические и гистохимические методы.

Результаты полученных данных показали, что при криоконсервировании суспензии эмбриональных клеток в присутствии 10% ДМСО сохранность клеток составляла (52,8±2,6)%. После добавления

Адрес для корреспонденции: Ревенко Е.В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-41-35, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

в среду криоконсервирования, 10% ЭС показатель сохранности клеток достоверно повышался и составлял (68,7±4,4)% (таблица).

При макроскопическом наблюдении процесса заживления ожоговых ран было показано, что после ожога в ранах наблюдалась обильная плазморея по всей поверхности раны, в некоторых наблюдениях отмечалось отделение гнойного экссудата. После введения суспензии свежевыделенных и криоконсервированных ЭК начиная с 3-х суток у животных 1 и 2 групп резко снижалось количество отделяемого экссудата, имела место усиленная эпителизация ран с васкуляризацией раневой поверхности. Следует отметить, что у животных 1-й группы наблюдалось разрастание грануляционной ткани по всей поверхности ожоговой раны вплоть до эпидермиса и уже на 7-е сутки эксперимента на месте ожога в некоторых случаях наблюдалось образование молодого эпителия. В случае применения криоконсервированных ЭК наблюдалось аналогичное протекание процесса заживления, хотя и с некоторым отставанием. К концу эксперимента у животных 1 и 2 групп на месте ран не обнаруживались рубцовые изменения и в большинстве случаев полностью восстанавливался волосяной покров.

Динамику восстановления кожного покрова оценивали по скорости сокращения ожоговой поверхности. После нанесения термического ожога на 2-е сутки эксперимента наблюдалось увеличение раневой поверхности более чем в два раза от исходной величины. После нанесения клеточных суспензий на 3-и сутки эксперимента отмечалась тенденция к различному по скорости заживлению ран. Так, на 3-и сутки эксперимента у 1-й и 2-й групп животных наблюдалось статистически достоверное сокращение площади раны по сравнению с контрольными значениями на 40,9% и 24,3%, соответственно (рис.). Уже к 14-м суткам наблюдений у животных 1-й и 2-й групп в большинстве случаев отмечалось сращение краев раны с образованием тонкого рубца. К 14-м суткам эксперимента у данных групп площадь раневой поверхности сокращалась на 97,7 и 87,1%, соответственно. При этом необходимо отметить, что у контрольной группы животных площадь раны в этот же срок наблюдения оставалась на уровне 76% от первоначальной и к концу эксперимента не наблюдалось восстановление кожного покрова.

Гистологическая оценка экспериментального материала показала, что в контрольной группе на 3-и сутки после ожога в коже животных обнаруживались некротические и дистрофические изменения, характеризующиеся пикнозом ядер в клетках эпидермиса и дермы, гибелью всех слоев эпидермиса, клеток волосяных фолликулов, клеточных

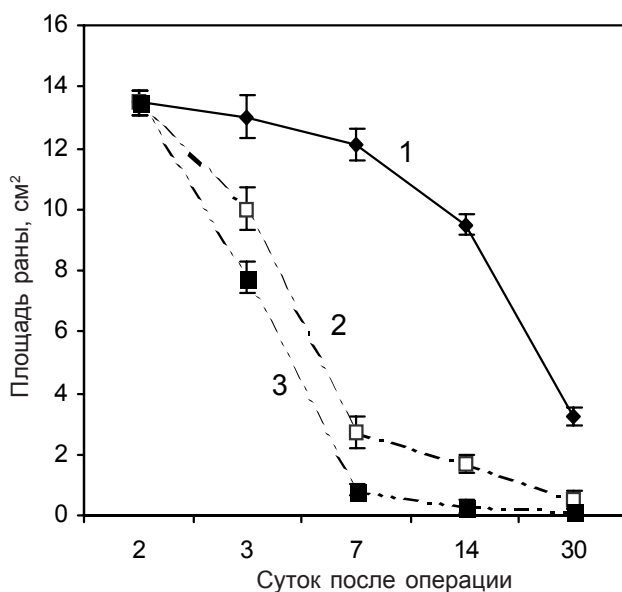
Влияние среды криоконсервирования на сохранность эмбриональных клеток в цикле замораживания-оттаивания

№ серии	Среда замораживания	Сохранность клеток (%) после криоконсервирования
Контроль		4,2±0,4
I	ДМСО 2%	25,5±1,7
	ДМСО 5%	35,8±3,1
	ДМСО 10%	52,8±2,6
II	ДМСО 2% + 10%ЭС	29,4±2,2
	ДМСО 5% + 10%ЭС	35,6±3,2
	ДМСО 10% + 10%ЭС	68,7±4,4*

**Примечание:** \* – различия, статистически достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с соответствующей концентрацией ДМСО.

элементов сосочкового и сетчатого слоев дермы, а также мышечных волокон собственной мышцы кожи. Обнаруживалась воспалительная реакция, выражающаяся в инфильтрации некротически измененных участков мононуклеарами и макрофагами, и, как следствие этого, слабое развитие грануляционной ткани вплоть до 14-х суток эксперимента.

После обработки ран суспензиями свежевыделенных и криоконсервированных ЭК уже на 7-е сутки в ранах обнаруживалась формирующаяся, а к 14-м суткам – зрелая грануляционная ткань с большим количеством микрососудов и капилляров. Лимфоидная инфильтрация ткани не наблюдалась,



Скорость сокращения площади раневой поверхности после операции: 1 – контроль; 2 – криоконсервированные клетки; 3 – свежевыделенные клетки.

в то же время встречалось большое количество клеток фибробластического ряда, небольшое количество лимфоцитов и нейтрофилов. Уже к 14-м суткам в половине наблюдений обнаруживалось ускорение эпителизации раневого дефекта с начинающейся дифференцировкой эпидермиса на слои и с большим количеством эпителиальных клеток, в цитоплазме которых определялось увеличенное количество гранул кератогиалина, что свидетельствует об активации синтетических процессов. В этот срок наблюдений была выявлена полная эпителизация поверхности ран. При гистохимическом исследовании препаратов определялись слабо ШИК-положительные соединительно-тканые волокна, а содержание связанных с соединительно-ткаными структурами гликозаминогликанов (ГАГ) было существенно выше чем в контроле.

На 14-е сутки эксперимента в контроле область поражения все еще была представлена гнойно-некротической раной, отграниченной широким лейкоцитарным валом от грануляционной ткани, подрастающей снизу под зону некроза. В грануляционной ткани наряду с клетками фибробластоподобного ряда определялось большое количество лимфоцитов и нейтрофилов, свидетельствующих о воспалительной реакции. Продуцируемые фибробластоподобными клетками коллагеновые волокна располагались хаотично. Гистохимически в участках некроза обнаруживалась сильная ШИК-положительная реакция и слабая метахромазия ГАГ.

К концу эксперимента у животных 1-й и 2-й групп при выявлении ГАГ ткань в зоне раневого дефекта давала интенсивную альцианофильную реакцию. Также обнаруживалось незначительное количество ШИК-положительных мукопротеинов. Гистологически обнаруживалась нормализация структуры эпидермиса с образованием сосочкового слоя кожи и ее дериватов. При этом в сетчатом слое дермы этом преобладали параллельно расположенные коллагеновые волокна, чего не было отмечено в контроле.

При использовании свежeweделенных и криоконсервированных ЭК с целью восполнения дефекта в хрящевой ткани так же наблюдался положительный эффект. При гистологическом исследовании в контрольной группе восстановление нарушенной целостности суставного хряща к концу эксперимента не наступило ни в одном из наблюдений. Вблизи раневого дефекта наблюдались участки истончения и поверхностной деструкции хряща, а также дистрофические изменения, которые проявлялись ослаблением базофилии основного вещества, кариопикнозом ядер хондроцитов и снижением, а в некоторых наблюдениях и полным отсутствием, окрашивания ядер хрящевых клеток,

что говорит о деконденсации ядерного хроматина. В большей части наблюдений контрольной группы имело место незаращение костной субхондральной пластинки с наличием некроза костных балок. На участке разрушенного хряща со стороны костномозговых пространств наблюдалось разрастание фиброретикулярной ткани. На границе поврежденного и неповрежденного хряща со стороны субхондральной кости наблюдалось разрастание волокнистой соединительной ткани. В остальных случаях можно было наблюдать в разрастающейся фиброретикулярной ткани небольшие участки молодой незрелой хондроидной ткани, богатой мелкими округлыми недифференцированными клетками и малоразвитым слабобазофильным основным веществом, в котором обнаруживалось высокое содержание ГАГ, что в целом свидетельствует о слабом протекании синтетических процессов. В течение срока наблюдения ни в одном из случаев не происходило смыкание краев раны и формирование хрящевой ткани.

Использование свежeweделенных и криоконсервированных ЭК приводило к частичному восстановлению хряща в виде сращения краев хрящевой раны. При этом в зоне сращения имело место слияние матрикса предсуществующего и новообразованного хряща, а также образование молодого гиалинового хряща, в котором определялись хондроидные клетки различной степени зрелости. Межуточное вещество новообразованного хряща характеризовалось высокой активностью ГАГ. В участках, где сохранялась щель между краями хрящевой раны, по ее краю обнаруживалась узкая зона волокнистой ткани с элементами волокнистого хряща и молодой соединительной ткани с признаками хондроидной дифференцировки.

Кроме того, обращало на себя внимание и восстановление поврежденных костных структур: в подлежащей субхондральной зоне имелась новообразованная кость губчатого строения, а в ряде наблюдений прослеживалась тенденция к формированию костной пластинки. Все вышepечисленное говорит о том, что в месте дефекта наблюдалось интенсивное протекание биосинтетических процессов (увеличение содержания ГАГ), пролиферации и миграции клеточных элементов, а также увеличение площади основного вещества, что характеризовало высокую репарационную способность и разрастание новообразованной хондроидной ткани и костных структур. В целом в большинстве случаев отмечалась органотипическая регенерация гиалинового хряща с образованием участков молодой хондроидной ткани. Необходимо отметить, что при применении криоконсервированных ЭК закрытие дефекта хряща в течение срока наблюдения происходит медленнее и менее

полно, чем в случае использования свежeweделенных клеток: только в одной трети наблюдений установлено полное сращение краев раны и формирование незрелого гиалинового хряща.

### Выводы

1. Ферментативный метод выделения эмбриональных клеток мезенхимально-мезодермального позволяет получить суспензию с высокими показателями сохранности и адгезивной способности.

2. Свежeweделенные ЭК характеризуются высокой чувствительностью к криоконсервированию. Максимальные показатели сохранности клеток (более 50%) удалось получить в присутствии 10% ДМСО в среде криоконсервирования с использованием эмбриональной сыворотки.

3. Нанесение свежeweделенных и криоконсервированных ЭК на поверхность раны при терми-

ческой травме ускоряет заживление раневой поверхности и восстановление структуры кожи, снижает воспалительную реакцию, усиливает пролиферацию фибробластов и увеличивает содержание ГАГ.

4. Введение свежeweделенных и криоконсервированных ЭК в область раны при деструктивном повреждении суставного хряща увеличивает пролиферацию хондробластов, содержание ГАГ, приводит к увеличению площади основного вещества хондронной ткани и органотипической регенерации гиалинового хряща.

5. На двух моделях поражения соединительной ткани показано, что использование свежeweделенных и криоконсервированных ЭК стимулирует биосинтетические процессы в ране. В случае использования криоконсервированных ЭК репаративная регенерация как кожи, так и хондронной ткани происходит медленнее.

### Литература

1. Лобенко О.О., Корж М.О., Дедух Н.В. Остеоартроз. Консервативна терапія / За ред. М.О. Коржа, Н.В. Дедух, І.А. Зупанця.– Харків: Прапор, 1999.– 336 с.
2. Horch R.E., Stark G.B. Comparison of the effect of a collagen dressing and a polyurethane dressing on the healing of split thickness skin graft (STSG) donor sites // Scand.J. Plast. Reconstr. Surg. Hand. Surg.– 1998.– Vol. 32, N4.– P. 407-413.
3. Ефименко Н.А., Шин Ф.Е., Толстых М.П., Тепляшин А.С. Современные тенденции в создании биологически активных материалов для лечения гнойных ран // Воен.-мед. журн.– 2002.– Т. 323, №1.– С. 48-52.
4. Грищенко В.І. Клітинна і тканинна терапія: сучасне і майбутнє // Трансплантологія.– 2000.– Т. 1, №1.– С. 15-17.
5. Сухих Г.Т., Малайцев В.В., Богданова И.М., Дубровина И.В. Мезенхимальные стволовые клетки // Бюл. эксперим. биол. и мед.– 2002.– Т. 133, №2.– С. 124-131.
6. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science.– 1999.– Vol. 284. – P. 143-147.