

УДК 616-001.17-08:578.085.023(063)

*Е.В. Маркелова, Т.Г. Григорьева, Е.А. Щегельская, В.В. Клименко**

Харьковская медицинская академия последипломного образования

**Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина*

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА, ФИБРОБЛАСТЫ И АУТОКЕРАТИНОЦИТЫ В ЛЕЧЕНИИ ПОСЛЕОЖОГОВЫХ РАН У КРЫС

Эффективность заживления глубокой ожоговой раны у крыс ($n=54$) изучали с помощью трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга, фибробластов и аутокератиноцитов. Размноженные в культуре клетки вводили в рану путём инъекции или на биодegradируемой фибриновой плёнке. Процесс заживления ран оценивали с помощью планиметрических и гистологических методов. Применение в качестве матрицы фибриновой плёнки увеличивало эффективность заживления ран в два раза в случае фибробластов, а в случае МСК в пять раз по сравнению с контролем. Наиболее эффективным является метод трансплантации МСК костного мозга на фибриновой плёнке в комбинации с инъекциями фибробластов в рану и с инокуляцией аутокератиноцитов в ксенокожу, которой закрывали рану.

Ключевые слова: ожог, мезенхимальные стволовые клетки, фибробласты, кератиноциты, трансплантация, фибриновая плёнка.

Благодаря успешному развитию клеточных биотехнологий в комбустиологии, всё большее применение находят методы ауто-трансплантации размноженных *in vitro* фибробластов, кератиноцитов и мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга. Во многих исследованиях на животных и человеке уже показано положительное влияние этих типов клеток на процесс заживления послеожоговых ран [1–8]. Так, в работе [7] описан десятилетний опыт трансплантации в Украине аллогенных фибробластов кожи в процессе лечения послеожоговых ран у детей. Имеется сообщение об успешном использовании аутологичных фибробластов кожи в лечении глубоких ожогов [5]. Российскими учёными было показано преимущество МСК костного мозга перед эмбриональными фибробластами при лечении ожогов у крыс [3]. Подтверждённая многими исследованиями плюрипотентность МСК делает их наиболее перспективными для использования в регенеративной медицине. Клетки трансплантируют в рану путём инъекций либо на биодegradируемых матрицах на основе коллагена, фибрина, гиалуроновой кислоты. Так, китайские учёные показали, что трансплантация конструкций, созданных на основе колла-

гена I типа, гиалуроновой кислоты и МСК костного мозга свиней, в послеожоговые раны ускоряет процессы васкуляризации и эпителизации раны и приводит к её быстрому и качественному заживлению [8]. В наших доклинических исследованиях на крысах было показано, что трансплантация МСК костного мозга на фибриновой подложке в сочетании с ксенокожей обладает преимуществом перед методом инъекции этих клеток в рану [1, 2]. Однако вопрос о том, какой тип клеток и способ их трансплантации наиболее предпочтителен для быстрого и качественного заживления ран, остаётся спорным.

Целью данной работы являлось сравнительное исследование эффективности применения фибробластов кожи, аутокератиноцитов и МСК костного мозга в лечении глубоких ожогов у крыс.

Материал и методы. Исследование проведено на 54 крысах-самках линии Вистар массой 180–200 г, которым в условиях эфирного наркоза моделировали глубокую ожоговую рану площадью 20 %. После локального удаления шерсти на коже спины животным наносили два симметричных контактных ожога электропаяльником с насадкой диам. 2 см в течение 10 с. Гистоло-

© Е.В. Маркелова, Т.Г. Григорьева, Е.А. Щегельская, В.В. Клименко, 2012

гический анализ подтвердил повреждение всех слоёв кожи в зоне ожога. На 2-е сутки всем животным была сделана первичная некрэктомия. Крысы в зависимости от метода лечения были разделены на шесть групп по девять в каждой: К – без клеточной терапии; О1 – инъекция суспензии фибробластов кожи + покрытие раны ксенокожей; О2 – инъекция суспензии МСК + ксенокожа; О3 – покрытие раны ксенокожей с иммобилизованными аутокератиноцитами; О4 – фибриновая подложка с монослоем фибробластов кожи + ксенокожа; О5 – инъекция фибробластов в рану + фибриновая плёнка с монослоем МСК + инъекция кератиноцитов в ксенокожу. Все виды трансплантаций осуществляли после некрэктомии. В качестве ксенокожи использовали специально обработанную свиную кожу (препарат фирмы «Комбустиолог», г. Тернополь). Опыты были проведены в виварии Харьковской медицинской академии последипломного образования в соответствии с международными требованиями к проведению экспериментов на животных.

Аутокератиноциты выделяли из кожи каждой крысы путём трипсинизации эпидермиса и сразу инъекцировали их в ксенокожу (О3).

Суспензию фибробластов получали после инкубации дермы кожи крысы с коллагеназой II типа (Sigma–Aldrich) в течение двух часов при 37 °С. Полученную клеточную суспензию рассеивали в культуральные флаконы (75 см², РАА, Австрия) и культивировали в среде ДМЕМ с 10 % фетальной бычьей сыворотки в течение двух недель, меняя среду два раза в неделю. После образования клеточного монослоя фибробласты снимали со дна культурального флакона путём последовательной обработки растворами Версена и Трипсина (0,25 %) и осаждали центрифугированием при 430 g в течение 10 минут. Фибриновые подложки диам. 2,5 см, приготовленные из плазмы крови, засеивали полученной первичной культурой фибробластов и культивировали в чашках Петри в течение суток.

Для получения культуры МСК крысы костный мозг вымывали из берцовых костей с помощью раствора Хэнкса (РАА). Полученную суспензию дважды отмывали в этом растворе и осаждали центрифугированием при 430 g в течение 10 минут. Клетки рассеивали по 50 млн на культуральный флакон (75 см², РАА) и культивировали в среде DMEM/F12 (1/1) (РАА) с 10 % феталь-

ной бычьей сыворотки (Sigma–Aldrich) в СО₂-инкубаторе. Через 24 часа культивирования среду с не прикрепившимися к субстрату клетками костного мозга удаляли, добавляли свежую среду и продолжали культивировать оставшиеся прикрепленными фибробластоподобные МСК ещё 14 дней, меняя среду каждые трое суток. Для инъекций в рану использовали клеточную суспензию МСК в растворе Хэнкса. МСК так же, как и фибробласты, рассеивали на круглые тонкие биodeградируемые фибриновые подложки и культивировали их в течение суток. Рану закрывали фибриновой плёнкой так, чтобы клетки непосредственно контактировали с её поверхностью. Все виды трансплантаций осуществляли после некрэктомии.

Жизнеспособность фибробластов и МСК перед трансплантацией оценивали после окрашивания суспензии 0,1% -ным раствором трипанового синего. Для оценки прижизненного состояния клеток в культуре использовали инвертированный микроскоп фирмы ЛОМО. Кроме того, для оценки цитологического состояния клеток использовали метод окрашивания по Гимзе после предварительной фиксации культур этиловым спиртом.

Динамику репаративного процесса в ранах в послеоперационном периоде оценивали планиметрическими и гистологическими методами на 7, 14 и 21-е сутки после моделирования ожога. Фрагменты послеожоговой раны иссекали и фиксировали в 10%-ном растворе формалина, а затем заключали в парафин. Серийные срезы толщиной (40–50)×10⁻⁶ м окрашивали гематоксилином и эозином для изучения общего состояния тканей. Для выявления и дифференцировки соединительнотканых структур препараты окрашивали фукселеном на эластические волокна по Вейгерту и докрашивали пикрофуксином по ван Гизон. Анализ и фотографирование препаратов проводили на микроскопе Olympus BX-41 и Leica (Япония и Германия).

Результаты и их обсуждение. МСК, как и фибробласты кожи, формировали на дне культуральных флаконов гетерогенные колонии фибробластоподобных клеток с овальными ядрами средних размеров и несколькими ядрышками (рис. 1). Через 12–14 суток культивирования из каждого флакона (75 см²) можно было получить 2–3 млн клеток. Жизнеспособность клеток в препарате для инъекции составляла (94±2) %.

МСК и фибробласты после рассева распластывались на фибриновой подложке и через сутки культивирования образовывали поверхностный клеточный слой (рис. 2). В таком виде их трансплантировали на рану животных групп О4 и О5.

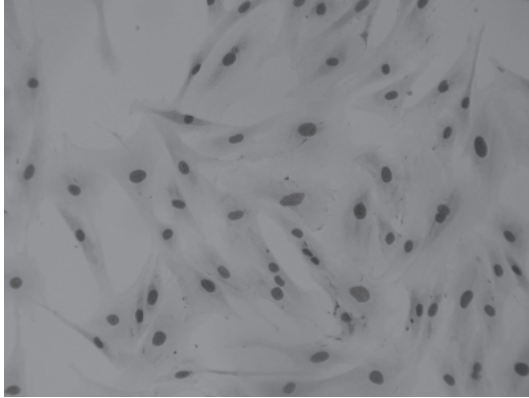


Рис. 1. Культура мезенхимальных стволовых клеток костного мозга крысы, 9-е сутки культивирования. Окраска по Гимзе, $\times 200$

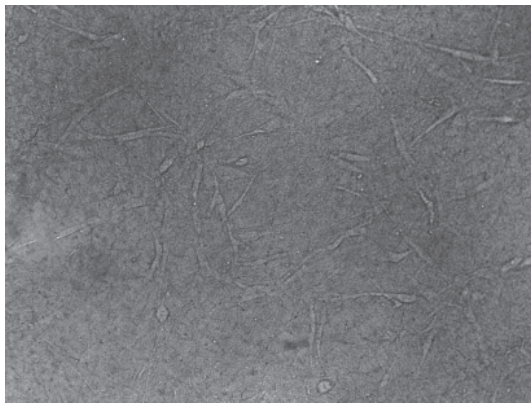


Рис. 2. МСК костного мозга крысы на фибриновой подложке, $\times 200$

Статистически обработанные результаты планиметрической оценки заживления ран животных всех групп представлены на рис. 3. Они свидетельствуют о явном преимуществе применения МСК костного мозга на биodeградируемых фибриновых подложках в комплексе с инъекциями фибробластов и аутокератиноцитов в лечении послеожоговых ран у крыс группы О5. Почти 90 % ран в этой группе к 21-му дню после трансплантации были закрыты регенерировавшей кожей. Как видим, независимые инъекции в рану фибробластов кожи, МСК костного мозга и аутокератиноцитов (О1, О2 и О3) также положительно влияют на скорость заживления послеожоговых ран, интенсифицируя процессы ревазуляризации, грануляции и эпителизации.

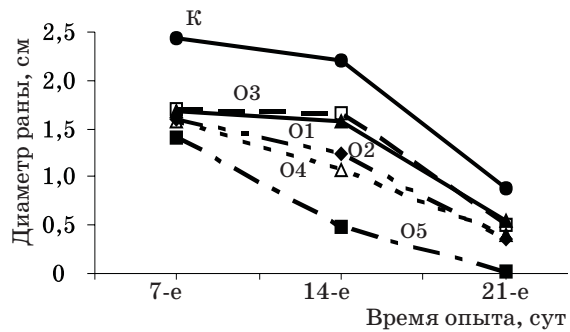


Рис. 3. Уменьшение диаметра послеожоговых ран у крыс в зависимости от типа клеточной трансплантации:

К – без лечения; О1 – инъекции фибробластов; О2 – инъекции кератиноцитов; О3 – инъекции МСК; О4 – фибриновая подложка с фибробластами; О5 – инъекции фибробластов в рану + фибриновая плёнка с МСК + инъекции кератиноцитов в ксенокожу

Использование в качестве носителя клеток биodeградируемой фибриновой подложки позволило увеличить эффективность заживления ран в группах с применением фибробластов в два раза, а с МСК в 5 раз по сравнению с контролем (рис. 3, 14-е сутки). При анализе гистологических препаратов ран наиболее явные различия в их заживлении между разными опытными группами и контролем наблюдались на 14-й день после трансплантации клеток. Несмотря на то, что в контрольной группе благодаря проведению первичной некрэктомии образование грануляционной ткани происходило рано, очаговая пролиферация эпителия в краях раны определялась лишь на 14-е сутки (рис. 4).

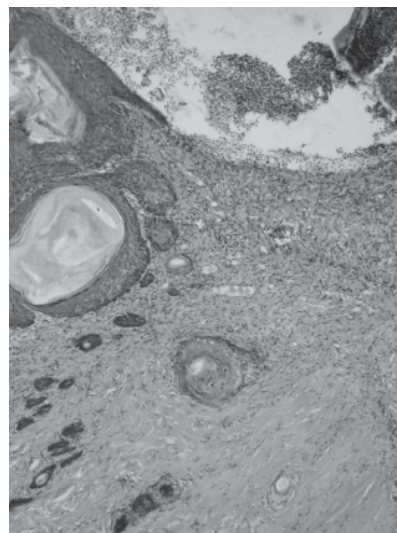


Рис. 4. Края раны со слабо выраженной пролиферацией эпителия у крыс без лечения. 14-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

На 21-й день эксперимента эпителизация раны не наступала или была незначительной.

У животных групп О1 и О2 состояние тканей в ранах на 14-е сутки было сходным – обнаруживалось скопление фибробластов либо МСК в глубоких отделах гиподермы. Эти клетки претерпевали превращения, давая начало соединительнотканым клеткам, цитоплазма которых становилась интенсивно базофильной. Они имели удлинённую форму с 2–3 и более отростками, располагались между пучками старых коллагеновых волокон или вблизи жировых клеток. Вдоль данных клеток отмечалось образование тонких волокнистых структур, которые характеризовались нежной фуксинофилией при окраске по ван Гизон. В краях раны отмечалась слабо выраженная пролиферация многослойного плоского эпителия, эпителизация раны носила очаговый и нестойкий характер (рис. 5).

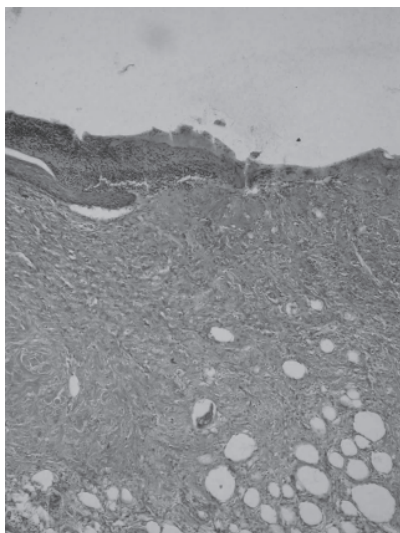


Рис. 5. Края раны со слабо выраженной пролиферацией многослойного плоского эпителия у крыс группы О1 (полная эпителизация раны не наступила). 14-е сутки. Окраска по ван Гизон, $\times 100$

На 21-е сутки дно раны было представлено грануляционной тканью, в глубоких слоях которой определялась фиброзная ткань. На всю толщину дермы и гиподермы распространялся молодой рубец, при этом структура дермы и гиподермы не восстанавливалась. В краях раны отмечалась очаговая пролиферация многослойного плоского эпителия. Полная эпителизация раны не отмечалась ни в одном из наблюдений.

У крыс группы О3 (инъекции кератиноцитов в ксенокожу), несмотря на раннюю краевую и очаговую эпителизацию раны,

которую, по-видимому, стимулировали имплантированные кератиноциты, в глубоких слоях ткани долго сохранялись признаки воспаления и дегенерации.

Хорошая скорость регенерации и качество восстановленной дермы были отмечены после трансплантации в рану фибробластов на фибриновой подложке (группа О4). Уже на 14-е сутки дно раны было представлено грануляционной тканью, расположенной на месте дермы и гиподермы, а в части наблюдений в мышечном слое. В грануляционной ткани были выражены поверхностный узкий лейкоцитарно-некротический слой, слой сосудистых петель, слой вертикальных сосудов, созревающий слой, слой горизонтальных фибробластов и глубокий фиброзный слой. Среди клеточных элементов грануляционной ткани обнаруживались немногочисленные нейтрофильные гранулоциты. Саркоплазма мышечных клеток эозинофильная, восстанавливалась поперечная исчерченность. В части наблюдений в краях раны обнаруживались тяжёлые пролиферирующего многослойного плоского эпителия, без нарастания его на грануляционную ткань. Эпителий был утолщён, без деления на слои, его клетки полиморфны, с гиперхромными ядрами. Эпителизация раны не наступала. На 21-е сутки дно раны было представлено созревающей грануляционной тканью с фуксинофильными волокнистыми структурами, складывающимися в пучки, и немногочисленными фибробластами, а также небольшим количеством сосудов и клеточных элементов макрофагального ряда. Обнаруживались тяжёлые пролиферирующего многослойного плоского эпителия, нарастающего на грануляционную ткань в краях раны (рис. 6).

Наиболее интенсивно происходили процессы грануляции, васкуляризации и эпителизации ран у крыс группы О5, где одновременно с инъекциями фибробластов в рану и кератиноцитов в ксенокожу трансплантировали на рану фибриновую плёнку с монослоем МСК. К 21-му дню 90 % ран были покрыты многослойным эпителием. В регенерированной дерме формировались волосяные фолликулы, как в нормальной коже (рис. 7).

Результаты, полученные у крыс групп О4 и О5, свидетельствуют, что при трансплантации фибробластов или МСК очень важным, по-видимому, является распределение этих клеток в определённом слое раны, чему способствует фибриновая матри-

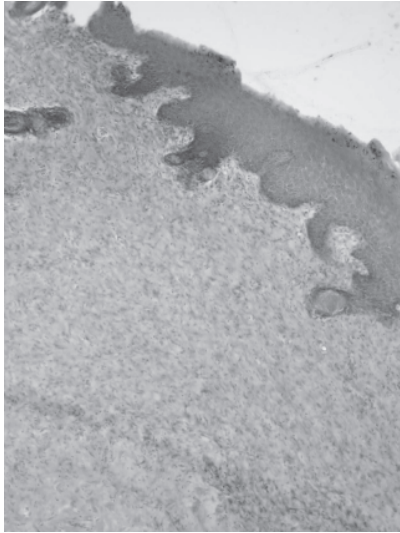


Рис. 6. Проліферируючий многослойний плоский епітелій, наростаючий на грануляційну тканину у крыс групи О4. 21-е сутки. Окраска гематоксилином і еозином, $\times 100$

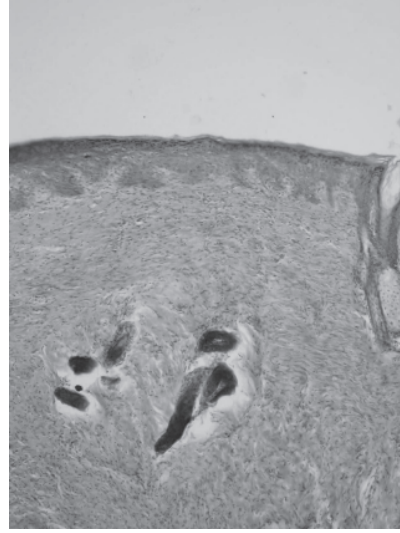


Рис. 7. Участок регенерата, покритий епітелієм, схожий по строєнню на дерму, в якій різні окремі волосяні фолікули у крыс групи О5. 21-е сутки. Окраска гематоксилином і еозином, $\times 100$

ца, удерживающая клетки. Этого невозможно достичь путём инъекций.

Более высокое качество заживления при использовании МСК, по-видимому, можно объяснить не только положением этих клеток в основании фибробластического дифферона, как считают авторы [7], но и их плюрипотентностью, то есть способностью дифференцироваться в разные типы клеток (миоциты, эндотелиоциты, кератиноциты) в соответствующем микроокружении.

Таким образом, для быстрого и качественного восстановления ран после глубоких ожогов можно рекомендовать трансплантацию МСК на биodeградируемой фибриновой матрице в комплексе с инъекциями фибробластов и аутокератиноцитов.

Список литературы

1. Клеточные технологии в лечении термической травмы / Т. Г. Григорьева, Ю. Е. Микулинский, Е. А. Щегельская, Е. В. Маркелова, А. Е. Грязин, Е. И. Новохатный // Скорая медицинская помощь. – 2006. – № 3. – С. 167–168.
2. Применение стромальных стволовых клеток костного мозга при комплексном лечении экспериментальных ожогов у крыс / Т. Г. Григорьева, Е. В. Маркелова, Е. А. Щегельская [и др.] // Эксперим. і клін. медицина. – 2008. – № 1. – С. 15–20.
3. Сравнительная оценка эффективности применения аллогенных эмбриональных фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для терапии глубоких ожоговых ран / В. И. Шумаков, М. Ф. Расулов, М. Е. Крашенинников [и др.] // Вестник трансплантол. и искусств. органов. – 2002. – № 4. – С. 7–11.
4. Теоретические и практические аспекты использования культивированных фибробластов при восстановлении целостности кожных покровов / Д. С. Саркисов, А. А. Алексеев, Е. В. Глущенко [и др.] // Вестник Рос. АМН. – 1996. – № 6. – С. 6–11.
5. Перший досвід застосування культуральних аутофібробластів у потерпілих з глибокими опіками / Е. Я. Фісталь, А. Г. Попандопуло, В. М. Ануфрієва [та ін.] // Трансплантологія. – 2003. – Т. 4, № 1. – С. 193–194.

Выводы

1. Трансплантация фибробластов кожи в виде монослоя на биodeградируемом носителе ускоряет заживление раны в два раза и может эффективно использоваться при лечении обширных ожогов.

2. Инъекции МСК, фибробластов в рану или кератиноцитов в ксенокожу, закрывающую рану, положительно влияют на процесс заживления ран у крыс.

3. Применение комплекса клеток: МСК на фибриновой матрице, фибробластов и кератиноцитов в виде инъекций, обеспечивает наиболее полную реализацию регенераторного потенциала композита с достижением высокой скорости и качества заживления раны.

6. Бозо И. Я. «Фибробласт» – специализированная клетка или функциональное состояние клеток мезенхимного происхождения / И. Я. Бозо, Р. В. Деев, Г. П. Пинаев // Цитология. – 2010. – Т. 52, № 2. – С. 99–109.

7. Будкевич Л. И. 10-летний опыт применения культивированных аллофибробластов человека при лечении детей с глубокими ожогами / Л. И. Будкевич, А. А. Алексеев, Л. В. Шурова // Матер. XX з'їзду хірургів України. – Тернопіль. – 2002. – № 2. – С. 636–639.

8. Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds / Peng Liu, Zhihong Deng, Shufang Han [et al.] // Artificial Organs. – 2008. – Vol. 32, № 12. – P. 925–931.

О.В. Маркелова, Т.Г. Григор'єва, О.А. Щегельська, В.В. Клименко

МЕЗЕНХІМАЛЬНІ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ КІСТКОВОГО МОЗКУ, ФІБРОБЛАСТИ ТА АУТОКЕРАТИНОЦИТИ В ЛІКУВАННІ ПІСЛЯОПІКОВИХ РАН У ЩУРІВ

Ефективність загоєння глибокої опікової рани у щурів (n=54) вивчали шляхом трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) кісткового мозку, фібробластів і аутокератиноцитів. Розмножені в культурі клітини вводили в рану шляхом ін'єкції або на біодеградуєчій фібриновій плівці. Процес загоєння ран оцінювали за допомогою планіметричних і гістологічних методів. Застосування в якості матриці фібринової плівки збільшувало ефективність загоєння ран у два рази у випадку фібробластів, а у випадку МСК у п'ять разів порівняно з контролем. Найбільш ефективним є метод трансплантації МСК кісткового мозку на фібриновій плівці в комбінації з ін'єкціями фібробластів у рану і з інокуляцією аутокератиноцитів у ксеношкіру, якою закривали рану.

Ключові слова: опік, мезенхімальні стовбурові клітини, фібробласти, кератиноцити, трансплантація, фібринова плівка.

E.V. Markelova, T.G. Grigorieva, E.A. Shchegelskaya, V.V. Klymenko

BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS, FIBROBLASTS AND AUTOKERATINOCYTES FOR BURN WOUNDS TREATMENT IN RATS

The effectiveness of deep burn wound healing with use of bone marrow MSCs, fibroblasts and autokeratinocytes transplantation has been studied in rats (n=54). After propagation in culture the cells were introduced into the wound by injection or on biodegradable fibrin film. The process of wound healing was estimated by planimetric and histological methods. With use of fibrin as film matrix wound healing accelerated 2 times in the case of fibroblasts and 5 times in the case of MSCs as compared with controls. The most effective method is shown to be transplantation of the MSCs on fibrin film into the wound accompanied with injections of fibroblasts and with inoculations of autokeratinocytes into the xenoskin that closed the wound.

Key words: burn, mesenchymal stem cells, fibroblasts, keratinocytes, transplantation, fibrin film.

Поступила 19.10.11