

В.М. Лісовий, І.М. Антонян, Ю.Б. Лар'яновська
ЗМІНИ ГОРМОНАЛЬНОГО СТАТУСУ
ТА МОРФОМЕТРИЧНИХ ПОКАЗНИКІВ
ПІД ДІЄЮ КУЛЬТУРИ СТРОМАЛЬНИХ
КЛІТИН ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ
ГІПОГОНАДИЗМІ

Наведені дані щодо вивчення ефективності використання культури стромальних клітин (КСК) для лікування вторинного андрогенного дефіциту у самців щурів. В результаті проведеного експерименту було доведено, що використання КСК в кількості 200 000 клітин при інтратестикулярному введенні в обидва яєчка призводить до покращення гормонального стану тварин, а також до регенерації морфологічних і морфометричних характеристик тестикулярної тканини тварин.

Ключові слова: культура стромальних клітин, вторинний андрогенний дефіцит.

V.N. Lesovoy, I.M. Antonyan, Yu.B. Laryanovskaya
HORMONAL STATE AND MORPHOMETRIC
VALUES CHANGE UNDER THE INFLUENCE
OF STEM CELLS CULTURE IN
THE EXPERIMENTAL HIPOGONADISM

In the article are results of the experiments as for effectiveness stem cells culture (SCC) using for the secondary androgen deficiency treatment at rats males. The result of the experiment had shown, that the quantity of SCC 200 000 in the every testicle had come to the improvement of the hormonal status of animals. This quantity of the SCC had come to the regeneration of the morphological and morphometrical characteristics of the animals testicles tissue.

Key words: stem cells culture, secondary androgen deficiency

Поступила 23.07.12

УДК 576.3/7+616-008.9-089.843-092.4-089.844

Ю.В. Поляченко*, К.М. Запольська*, Р.В. Салютін*#, В.А. Шаблій**

***ДУ «Національний інститут хірургії та трансплантології**

ім. О.О. Шалімова НАМН України», м. Київ

#Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України, м. Київ

****Інститут клітинної терапії, м. Київ**

ТРАНСПЛАНТАЦІЯ АУТОЛОГІЧНИХ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ
МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ
ДЛЯ ЗАХИСТУ АУТОЛОГІЧНОГО ЖИРОВОГО ГРАФТУ
ВІД ТКАНИННОЇ РЕЗОРБЦІЇ

Показано, що збагачення жирового графту аутологічними мезенхімальними мультипотентними стовбуровими клітинами, які виділено з жирової тканини, приводить до активації репаративно-пластичних процесів і, як наслідок, до збільшення маси графту. Зроблено висновок про доцільність використання в клінічній практиці з метою захисту пересаженої жирової тканини від тканинної резорбції, мезенхімальних стовбурових клітин, що виділені з аутологічної жирової тканини.

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

Лікування пацієнтів з контурними деформаціями м'яких тканин обличчя і тіла, які формуються внаслідок травматичних пошкоджень, гнійно-запального процесу підшкірної клітковини, аномалій розвитку, геміатрофії, ліподистрофії тощо, є однією з проблем сучасної реконструктивно-пластичної хірургії [1].

В останнє десятиріччя для корекції дефекту м'яких тканин застосовують метод ліпофілінгу – введення в дефект аутологічного анатомічного матеріалу, а саме жирової тканини, що отримана

при ліпосакції. Позитивний результат тканинного ліпофілінгу пов'язаний, насамперед, з наявністю в ліпоаспіраті мезенхімальних стовбурових клітин [2, 3].

В літературі є дані щодо визначення впливу трансплантації стовбурових клітин, що виділені з жирової тканини, на пересажену жирову тканину з метою її захисту від резорбції, але вони носять поодинокий характер та є суперечливими [4–5].

Метою дослідження було визначення мож-

ливості застосування аутологічних мезенхімальних мультипотентних стовбурових клітин, що виділені з жирової тканини, для захисту жирового графту від тканинної резорбції.

Методи. Експериментальне дослідження проведено в Інституті генетичної та регенеративної медицини НАМН України. При роботі з піддослідними тваринами дотримувалися принципів біоетики, норм біологічної безпеки та вимог щодо захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою.

Гетеротопічну трансплантацію (пересадку фрагмента інгвінальної жирової клітковини під шкіру по обидва боки від хребта, формуючи при цьому ложе для трансплантатів) проводили на самках мишей «дикого типу» ліній FVB з середньою масою тіла ($27 \pm 1,12$) г під загальним знеболенням 2,5%-вим розчином авертину в дозі 400 мг/кг. Клітинний матеріал отримували шляхом вилучення з інгвінальних ділянок фрагментів підшкірної клітковини. Після механічної обробки підшкірної клітковини й культивційного процесу отримували мультипотентні мезенхімальні стовбурові клітини (ММСК), які в подальшому використовували для збагачення жирового графту. Середній клітинний вміст для збагачення жирового графту ММСК становив $0,5 \cdot 10^6$ клітин з 25 мкл фосфатно-сольового буфера для однієї трансплантації. В контрольні (тканинні) графти для чистоти експерименту було введено фосфатно-сольовий буфер.

На 14-ту та 28-му добу експерименту після евтаназії у тварин вилучали трансплантовані фрагменти. Після вилучення фрагменти жирової клітковини зважували й готували для проведення гістологічних, імуногістохімічних та морфометричних досліджень.

Результати. Отримані дані свідчать, що на 2-й тиждень експерименту маса клітинно-тканинного графту, збагаченого аутологічними ММСК, збільшувалась на 39,4% та становила в середньому ($3,71 \pm 0,1$) г, вірогідно відрізняючись від початкової маси, яка дорівнювала ($2,68 \pm 0,11$) г ($p \leq 0,01$), рис. 1.

Водночас маса тканинного графту зменшувалась на 28,6% від початкового значення [$(2,71 \pm 0,08)$ г] і становила ($1,93 \pm 0,06$) г ($p \leq 0,01$). На 4-й тиждень експерименту спостерігалось подальше збільшення маси клітинно-тканинного графту на 72,3% у порівнянні з початковим рівнем, таким чином, середня маса досягала ($4,58 \pm 0,12$) г ($p \leq 0,01$).

Однак необхідно зазначити, що 16% клітинно-тканинних трансплантатів не мали значної тенденції до збільшення тканинної маси, їх прирост коливався в межах 43,4 – 52,5% від початко-

вого значення.

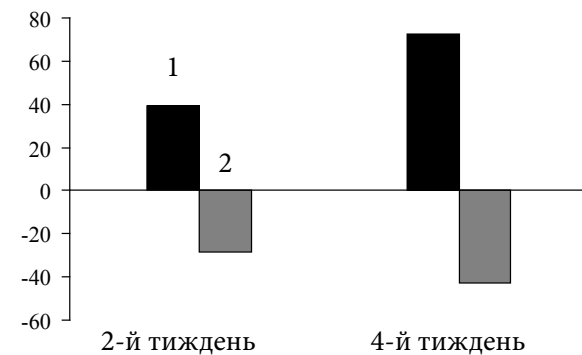


Рис. 1. Динаміка змін клітинно-тканинного (1) та тканинного (2) графту за період експерименту

Щодо маси тканинного трансплантата, то на 4-й тиждень експерименту вона становила ($1,55 \pm 0,08$) г, дефіцит маси складав 42,8% від початкового значення ($p \leq 0,01$).

Зміна маси графтів пояснюється позитивним впливом збагачення жирової тканини аутологічними ММСК, які активують проліферативно-пластичні процеси, що приводять до збільшення тканинної маси. Водночас у тканинному графті відбуваються процеси тканинної резорбції, що і призводить до втрати трансплантатом своєї маси.

Морфологічна структура трансплантованої жирової клітковини, в яку було введено аутологічні ММСК, протягом експерименту фактично не змінювалась. Через 2 та 4 тижні після гетеротопічної трансплантації клітинно-тканинні графти збільшувались в розмірі та масі, причому дуже легко піддавалися дисекції та мали звичайний жовтуватий колір без візуальних дефектів.

Вилучення тканинних графтів супроводжувалося технічними труднощами через формування фіброзної капсули навколо трансплантата.

При дисекції вилучених графтів було відмічено, що тканинні трансплантати були більш в'ялими й крихкими на відміну від клітинно-тканинних трансплантатів, які мали щільно-еластичну консистенцію та добре розділялися.

Гістологічне дослідження, що проведено на 2-й та 4-й тиждень експерименту, свідчило про незначні ознаки запалення та формування кістозних каверн і вакуолей в клітинно-тканинних трансплантатах.

Проявів перивезикального набряку виявлено не було, лише в поодиноких зразках спостерігалися невеликі і локалізовані ділянки запалення (рис. 2).

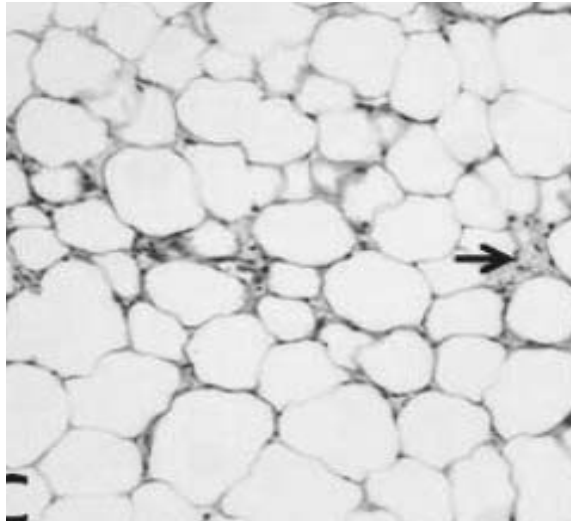


Рис. 2. Мікроструктура клітинно-тканинного графту на 4-й тиждень експерименту. Жирова тканина з ділянкою запалення (стрілка).
Забарвлення гематоксилін-еозином, x 100

В біоптатах, що склалися з клітинного і тканинного компонентів, адипоцити розподілялися рівномірно, без утворення конгломератів і вакуолей. В незначній кількості біоптатів, що склалися з клітинного та тканинного компонентів (12%), на 4-й тиждень експерименту фіксували ознаки незначно вираженого фіброзу жирової тканини.

В тканинному графті вже на 2-й тиждень експерименту були зафіксовані ознаки некрозу жирової тканини з наступним її фіброзуванням (рис. 3), а на 4-й тиждень спостерігали некроз жирової тканини і ацидофільні гранулоцити.

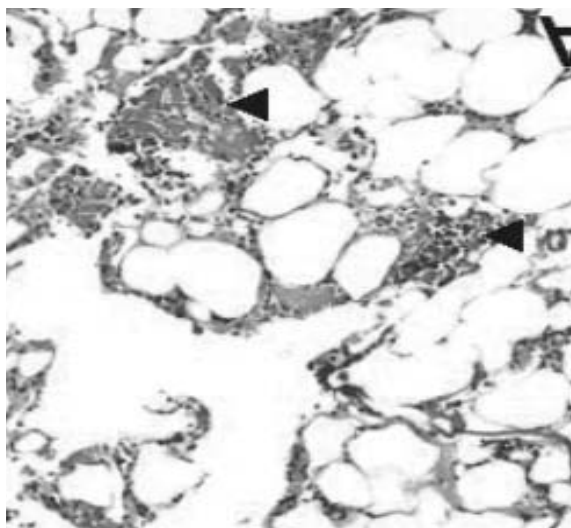


Рис. 3. Мікроструктура тканинного графту на 2-й тиждень експерименту. Жирова тканина з ділянками некрозу і фіброзу (стрілки).
Забарвлення гематоксилін-еозином, x 100

Морфологічний аналіз біоптатів тканинних і клітинно-тканинних графтів свідчив про значні коливання кількості адипоцитів у жировій тканині в залежності від типу графту.

В біоптатах клітинно-тканинних графтів протягом усього терміну дослідження спостерігали за поступовим збільшенням кількості адипоцитів.

На 2-й тиждень після трансплантації адипоцити в біоптатах займали 67,4% від загальної площі біоптата. Водночас кількість адипоцитів у тканинних графтах зменшувалася, вони займали 46,2% від загальної площі трансплантата.

На 4-й тиждень експерименту кількість адипоцитів у трансплантатах, збагачених аутологічними ММСК, збільшувалася, вони займали 78,6% від загальної площі досліджуваних тканин.

Кількість адипоцитів у тканинному графті мала тенденцію до поступового зменшення, що свідчило про інтенсифікацію процесів некрозу клітин, заміщення їх сполучною тканиною і що підтверджується результатами гістологічного дослідження.

Результати імуногістохімічного дослідження свідчили про наявність ММСК в трансплантованій жировій тканині через 2 та 4 тижні. Необхідно зазначити, що кількість ММСК зростала на 4-й тиждень експерименту, що вказує на відсутність ознак їх відторгнення та проліферацію. Крім того, більшість ММСК знаходилися в стінках судин дрібного й середнього калібру, що вказує на їх ендотеліальне диференціювання.

Імуногістохімічний аналіз також показав наявність ММСК в контра-латерально розміщених трансплантатах жирової клітковини, в які вводили фосфатно-сольовий буфер, що свідчить про розселення клітин через системний кровотік.

Отже, можна припустити, що гетеротопічна трансплантація фрагментів жирової тканини разом з аутологічними ММСК приводить до інтенсифікації процесу проліферації жирової тканини, а в подальшому до збільшення маси графту.

Незначні ознаки запалення та ділянки фіброзу є типовою реакцією тканини на введення клітинного трансплантата і саму гетеротопічну трансплантацію.

Зменшення маси тканинного графту внаслідок некрозу адипоцитів, тканинної резорбції та процесу фіброзування є типовою реакцією пересаженого жирового трансплантата, що є головною проблемою при виконанні операцій з ліпофілінгу.

Висновки

В жировому графті фіксуються процеси тканинної резорбції у вигляді запального процесу, лізису адипоцитів, фібриноїдного некрозу, каль-

цифікації та фіброзування, що є проявом тканинної резорбції.

Збагачення жирових графтів аутологічними мультипотентними мезенхімальними стовбуровими клітинами приводить до активації проліферативно-регенераторних процесів і, як наслідок, до збільшення маси графту.

Введені в жировий графт мультипотентні мезенхімальні стовбурові клітини здатні до активної проліферації, міграції та мають потенціал до ендотеліального диференціювання.

Показано, що збагачення жирової тканини, яка призначена для ліпофілінгу, аутологічними мультипотентними мезенхімальними стовбуровими клітинами є перспективним методом запобігання тканинної резорбції і може бути застосовано в клінічній практиці.

Список літератури

1. Урмузин Д.К. Опыт коррекции деформации голени методом липофилинга в сочетании с расслоением мягких тканей АPTOS Wire. / Д.К. Урмузин, А.М. Куимов // *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии.* – 2009. – № 3. – С. 37–44.
2. Характеристика мирового рынка клеточных технологий / В.Л. Зорин, В.Р. Черкасов, А.И. Зо-

рина, Р.В. Давыдов // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* – 2010. – Т. V, № 3. – С. 96–115.

3. Fat Injection: from filling to regeneration. Ed. by S. R. Coleman, R. F. Mazzola. 2009. – 800 p.
4. Павлюк-Павлюченко Л. Я. Отдаленные результаты липофилинга (аутогенной трансплантации жировой ткани) с целью контурной пластики молочных желез / Л. Я. Павлюк-Павлюченко, А. А. Шахов // *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии.* – 2001. – № 2. – С. 21–41.
5. Gomillion C. T. Stem cells and adipose tissue engineering / C. T. Gomillion, K. J. Burg // *Biomaterials.* – 2006. – Dec. – Vol. 27 (36). – P. 6052–6063. Epub. 2006 Sept. 14. Review.
6. Experimental study of the effect of adipose stromal vascular fraction cells on the survival rate of fat transplantation / B. C. Fu, J. H. Gao, F. Lu, J. Li // *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi.* – 2010. – Vol. 26 (4). – P. 289–294.
7. Infusion of mesenchymal stem cells and rapamycin synergize to attenuate alloimmune responses and promote cardiac allograft tolerance / W. Ge, J. Jiang, M. L. Baroja [et al.] // *Am. J. Transplant.* – 2009. Aug. – Vol. 9 (8). – P. 1760–1772.

УДК 615.361.018.5.013.8.014.41:616.921.5:57.08

*Ю.В. Поляченко, Е.М. Запольская,
Р.В. Салютин, В.А. Шаблий*

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ДЛЯ ЗАЩИТЫ АУТОЛОГИЧНОГО ЖИРОВОГО ГРАФТА ОТ ТКАНЕВОЙ РЕЗОРБЦИИ

Показано, что обогащение жирового графта аутологичными мезенхимальными мультипотентными стволовыми клетками, выделенными из жировой ткани, способствует активации репаративно-пластических процессов и, как следствие, увеличению массы графта. Сделан вывод о целесообразности использования в клинической практике с целью защиты пересаженной жировой ткани от тканевой резорбции мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из жировой ткани.

Ключевые слова: трансплантация, стволовые клетки, жировая ткань, тканевая резорбция.

*Yu. V. Polyachenko, K. M. Zapolska,
R. V. Salyutin, V. A. Shabliy*

TRANSPLANTATION OF AUTOLOGOUS MULTIPOTENT MESENCHYMAL STEM CELLS, ISOLATED FROM ADIPOSE TISSUE, TO PROTECT THE AUTOLOGOUS FAT GRAFT AGAINST TISSUE RESORPTION

It is shown that enrichment of autologous fat graft by multipotent mesenchymal stem cells, isolated from adipose tissue, leads to activation of reparative processes and consequently to increase the mass of graft. Seems appropriate to use in clinical practice mesenchymal stem cells, derived from autologous fat, with a view to protect the transplanted adipose fat graft from tissue resorption.

Key words: transplantation, stem cells, adipose tissue, tissue resorption.

Поступила 14.12.12