



УДК 576.3./7+616-008.847.9-089.843-092.4-092.9+616-003.93-089.844

К. М. Запольська

## ТРАНСПЛАНТАЦІЯ ЖИРОВОГО ГРАФТУ, ЗБАГАЧЕНОГО ДОНОРСЬКИМИ КРІОКОНСЕРВОВАНИМИ МЕЗЕНХІМАЛЬНИМИ СЛОВБУРОВИМИ КЛІТИНАМИ ЖИРОВОЇ КЛІТКОВИНИ, ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТУ *IN VIVO*

ДУ «Національний інститут хірургії та трансплантології ім. О. О. Шалімова  
НАМН України», Київ, Україна

УДК 576.3./7+616-008.847.9-089.843-092.4-092.9+616-003.93-089.844

Е. М. Запольская

### ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ЖИРОВОГО ГРАФТА, ОБОГАЩЕННОГО ДОНОРСКИМИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫМИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТЕЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ ЖИРОВОЙ КЛЕТЧАТКИ, В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА *IN VIVO*

ГУ «Національний інститут хірургії та трансплантології ім. А. А. Шалімова НАМН України», Київ, Україна

Проведено експериментальне дослідження з метою визначення можливості використання донорського криоконсервованого клітинного матеріалу (мультипотентних мезенхімальних ствових кліток, виділених із жирової ткани) для захисту трансплантованого жирового графта від тканинної резорбції.

Результати дослідження свідчать про те, що обогачення жирового графта криоконсервованими аллогенними мезенхімальними мультипотентними ствовими клітками, виділеними із жирової ткани, сприяє активації деструктивно-воспалительних процесів в жировому графті, погіршенню виживаємості адипоцитів і в подальшому дефіциту маси трансплантата.

Нецелесообразно использование донорских криоконсервованных ствовых клеток в клинической практике с целью защиты пересаженной жировой ткани от тканевой резорбции.

**Ключевые слова:** трансплантация, ствовые клетки, жировая ткань, тканевая резорбция.

UDC 576.3./7+616-008.847.9-089.843-092.4-092.9+616-003.93-089.844

К. М. Zapolska

### TRANSPLANTATION OF FAT GRAFT FORTIFIED WITH DONOR CRYOPRESERVED MESENCHYMAL STEM CELLS OF ADIPOSE TISSUE IN TERMS OF EXPERIMENT *IN VIVO*

О. О. Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology, National Academy of Medical Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine

The purpose of the performed research was to define the possibilities of using donor cryopreserved cell material (mesenchymal stem cells which had been separated from adipose tissue) for protection of the transplanted fat graft from tissue absorption.

The results of the research showed that fortification of fat graft with cryopreserved allogenic mesenchymal multipotent stem cells that had been separated from adipose tissue leads to activation of destructive and inflammatory process in fat graft, deterioration of adipocyte survival and as a result to shortage of transplant weight.

It appears impractical to use donor cryopreserved stem cells in clinical practice with the purpose of protection of the transplanted adipose tissue from tissue absorption.

**Key words:** transplantation, stem cells, adipose tissue, tissue absorption.

Одним із методів корекції об'ємно-контурних деформацій м'яких тканин є трансплантація аутологічної жирової клітковини — ліпофілінг [1; 2]. Даний метод корекції має цілу низку переваг порівняно з синтетичними та біологічними філерами.

Однак існують і недоліки цього методу, насамперед, це схильність до розсмоктування автоклітковини та її заміщення фіброзною тканиною, що потребує проведення етапного ліпофілінгу з короткими міжтрансплантаційними інтервалами [3].



У науковій літературі обговорюються перспективи використання клітинно-тканинних графтів, що складаються з жирової тканини та клітинного матеріалу для заповнення дефектів м'яких тканин [4].

Однак результати первинних досліджень і клінічних експериментів досить суперечливі, що потребує додаткових досліджень та експериментальних обґрунтувань.

Крім того, у фахових виданнях відсутні посилення на можливість використання донорського клітинного матеріалу для створення клітинно-тканинного графту, призначеного для заповнення дефектів м'яких тканин і захищеного від резорбції жирової тканини донорськими мезенхімальними клітинами.

**Мета** дослідження — визначення можливостей використання донорського кріоконсервованого клітинного матеріалу (мезенхімальних стовбурових клітин, виділених із жирової тканини) для захисту трансплантованого жирового графту від тканинної резорбції.

### Матеріали та методи дослідження

Дослідження були проведені в умовах віварію ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України». В експерименті використовувалися самки мишей «дикого типу» ліній FVB і FVB-Cg-Tg(GFP)5Nagy/J (трансгенні за GFP) із середньою масою тіла ( $27,00 \pm 1,12$ ) г.

Під час проведення експериментів над піддослідними тваринами дотримувалися принципів біоетики, норм біологічної безпеки та вимог щодо захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною або/та іншою науковою метою.

Донорський клітинний матеріал отримували шляхом вилучення (після евтаназії) з інгвінальних ділянок мишей ліній FVB-Cg-Tg(GFP)5Nagy/J (трансгенна лінія мишей, яка несе ген зеленого флуоресцентного білка медуз) фрагментів підшкірної клітковини.

Після механічної обробки підшкірної клітковини та культивативного процесу отримували мультипотентні мезенхімальні стовбурові клітини (ММСК), які в подальшому піддавали кріоконсервуванню в рідкому азоті при температурі  $-196$  °С.

Кінцеву концентрацію для трансплантації кріоконсервованих стовбурових клітин готували з розрахунку  $0,5 \cdot 10^6$  клітин для однієї ін'єкції (трансплантації).

Піддослідним тваринам проводили гетеротопічну трансплантацію шляхом пересаджування фрагментів інгвінальної жирової клітковини (графтів) під шкіру по обидва боки від хребта, формуючи при цьому ложе для трансплантатів.

З одного боку трансплантували тканинно-клітинний графт, до складу якого входили донорські кріоконсервовані ММСК, а з другого контралатерального боку трансплантували тканинний графт, у товщу якого вводили для «чисто-

ти» експерименту диметилсульфоксид (ДМСО) в об'ємі, що дорівнює частці, яка залишається після відмивання кріоконсервованих клітин (0,2 мл).

На 14-ту і 28-му добу після початку експерименту, після евтаназії, у тварин вилучали трансплантовані фрагменти. Після вилучення фрагменти жирової клітковини зважували та готували для проведення подальших гістологічних, імуногістохімічних і морфометричних досліджень. Гістологічні та морфометричні дослідження виконували за стандартними методами [5].

Для виявлення донорських клітин у трансплантаті (імуногістохімічне дослідження) використовували моноклональні антитіла проти GFP (Molecular Probes Inc., США) в розведенні 1 : 750. Візуалізацію первинних антитіл проводили за допомогою вторинних антитіл, кон'югованих з Alexa Fluor 488 у розведенні 1 : 1000 (Molecular Probes Inc., США).

Предметні скельця покривали бальзамом для люмінесцентної мікроскопії Vectashield Mount Medium (Vector, США) і досліджували на мікроскопі Olympus IX71 (Olympus, Японія) за допомогою прикладного програмного забезпечення.

Отримані дані підлягали статистичній обробці з використанням критерію Стьюдента.

### Результати дослідження та їх обговорення

Результати експерименту свідчили про те, що на 2-й тиждень після трансплантації клітинно-тканинного графту, збагаченого кріоконсервованими донорськими ММСК, його маса збільшувалася порівняно з контролем (середнім початковим значенням) на 25,8 % — з ( $2,74 \pm 0,07$ ) до ( $3,43 \pm 0,10$ ) г ( $p < 0,01$ ).

Тимчасове збільшення маси графту з кріоконсервованими клітинами пояснюється тим фактом, що кріоконсервовані клітини вводили у розчині, який містив ДМСО, введення якого призводить до асептичного запалення та нагромадження в тканинах позаклітинної рідини.

Це припущення ґрунтується на тому факті, що введення лише ДМСО в жирову тканину призводило до збільшення маси тканинного графту на 2-й тиждень після гетеротопічної трансплантації.

До 2-го тижня експерименту фіксували збільшення середньої маси трансплантованого тканинного графту, його маса збільшувалася на 11,4 % ( $p \leq 0,05$ ), порівняно з початковою, та становила ( $3,07 \pm 0,06$ ) г.

На 4-й тиждень експерименту маса трансплантованих клітинно-тканинного та тканинного графтів прогресивно зменшувалася, особливо це стосувалося маси жирового графту, який не було збагачено донорськими кріоконсервованими клітинами.

Маса клітинно-тканинного графту на 4-й тиждень після трансплантації становила ( $2,31 \pm 0,06$ ) г, що на 15,8 % менше, ніж початкова маса ( $p \leq 0,05$ ), і на 67,1 % менше, ніж маса



трансплантата на 2-й тиждень експерименту ( $p \leq 0,01$ ).

Поступово зменшувалася маса тканинного трансплантата. На 4-й тиждень після трансплантації маса графту зменшувалася порівняно з початковим значенням на 24,2 % і становила  $(2,09 \pm 0,05)$  г ( $p \leq 0,05$ ).

Порівняно з масою трансплантата на 2-й тиждень експерименту, тканинний графт втрачав 68,1 %.

Деяко збільшена маса клітинно-тканинного графту на 4-й тиждень експерименту та більш поступова тенденція до зменшення його маси насамперед пояснюються активнішим нагромадженням позаклітинної рідини за рахунок негативного впливу алогенних клітин (імунодетермінований запальний процес) і залишкової дії ДМСО.

Коливання маси трансплантованих графтів корелювали зі зміною їх морфологічних характеристик.

Клітинно-тканинні графти на 2-й тиждень експерименту візуально були темно-жовтого кольору, набряклими, при розрізі графту виділялася позаклітинна рідина у вигляді рясної «краплі роси».

Аналогічною морфологічною картиною на 2-й тиждень після гетеротопічної трансплантації характеризувалися тканинні графти.

Необхідно зазначити, що дисекція трансплантованих клітинно-тканинних і тканинних графтів на 2-й тиждень експерименту не становила технічних труднощів у зв'язку з інфільтрацією тканин навколо графтів.

На 4-й тиждень експерименту трансплантовані графти втрачали масу, що фіксувалося навіть візуально, та змінювали морфологічну характеристику, а саме зморщувалися та набували сіро-жовтого забарвлення.

Дисекція як клітинно-тканинного, так і тканинного графтів була утруднена через формування фіброзної капсули навколо трансплантатів, а самі графти тяжко піддавалися розтину, особливо тканинні.

При гістологічному дослідженні на 2-й тиждень експерименту в тканинних графтах спостерігали складж еритроцитів, лімфоцитарно-макрофагальну інфільтрацію та перивезикальний набряк (рис. 1).

Вищенаведені гістологічні ознаки переважно виявлялися в клітинно-тканинних графтах, у пересаджених тканинних трансплантатах в основному спостерігалися ознаки лізису адипоцитів і фіброзування жирової тканини.

На 4-й тиждень після гетеротопічної трансплантації в тканинних графтах фіксували значні прояви фібриноїдного некрозу жирової тканини, утворення сполучнотканинних тяжів і кальцифікатів (рис. 2).

Водночас на 4-й тиждень експерименту в клітинно-тканинних трансплантатах при гістологічному дослідженні виявляли ознаки макрофагальної інфільтрації, перивезикального

набряку та початкові прояви фіброзування жирової тканини, якій передували некроз і лізис адипоцитів, що свідчило про триваючі дегенеративно-дистрофічні та запальні процеси в трансплантатах.

Морфометричний аналіз підтверджував, що інтенсивність некрозу та лізису адипоцитів була більш вираженою в клітинно-тканинних графтах. На 2-й тиждень експерименту площа адипоцитів становила лише 24,8 % від загальної площі трансплантата.

Водночас середній відсоток площі адипоцитів у тканинному графті дорівнював 45,9 %, фактично в 1,8 разу перевищуючи показник клітинно-тканинного трансплантата ( $p \leq 0,01$ ).

До 4-го тижня експерименту площа адипоцитів у клітинно-тканинних графтах значно зменшувалася — до 9,3 %, що було в 1,7 разу меншим від показника тканинних графтів — 15,8 %.

Активний лізис адипоцитів у клітинно-тканинному графті пов'язуємо з негативним впливом донорських алогенних ММСК.

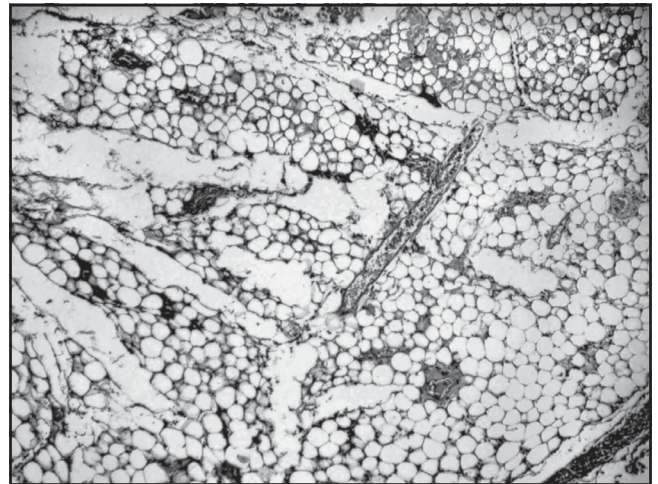


Рис. 1. Стаз і складж еритроцитів. Фіброз і гіаліноз стінок судин та фібриноїдний некроз. Забарвлення гематоксилін-еозином. Мікрофото.  $\times 100$

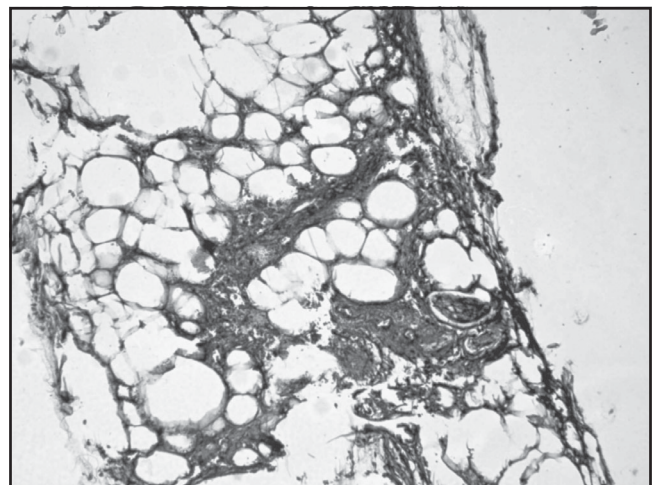


Рис. 2. Фібриноїдний некроз, утворення кальцифікатів. Забарвлення гематоксилін-еозином. Мікрофото.  $\times 100$

Результати імуногістохімічного дослідження свідчили про наявність трансплантованих ММСК у пересаджених графтах на 2-й і 4-й тижні експерименту.

Необхідно зауважити, що кількість ММСК у трансплантатах на 4-й тиждень експерименту збільшувалася, причому більшість клітин містилась у стінках судин дрібного та середнього калібру і перивазальному просторі, що вказує на можливість їх ендотеліального диференціювання.

Цікавим є факт візуалізації трансплантованих ММСК у контралатеральному (тканинному) графті, тобто було встановлено, що трансплантовані клітини здатні до мігрування. Аналіз результатів проведеного експериментального дослідження свідчив про те, що збагачення жирового графту кріоконсервованими ММСК призводить до розвитку у жировому графті деструктивно-дегенеративних процесів і асептичного запалення.

Короткотривале збільшення маси трансплантованих графтів пояснюється дією ДМСО, а у разі з клітинно-тканинним графтом — і запальною дією трансплантованих алогенних клітин.

### Висновки

1. Збагачення донорськими алогенними кріоконсервованими ММСК жирової тканини призводить до активації дегенеративно-дистрофічних і запальних процесів у пересадженому графті та як наслідок — до некрозу і лізису адипоцитів із подальшим фіброзуванням.

2. Тимчасове збільшення маси трансплантованих графтів пояснюється, насамперед, дією ДМСО, який входить до складу розчину з ММСК, а його дія у разі з клітинно-тканинним графтом посилюється запальною дією донорських клітин.

3. Результати проведеного дослідження свідчать про те, що використання донорських кріо-

консервованих ММСК з метою запобігання тканинній резорбції жирового трансплантата є недоцільним, у разі застосування в клінічній практиці може призвести до 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 пластической, реконструктивной и пластической хирургии.* – 2002. – № 4. – С. 45–47.

2. Coleman S. Long-term survival of fat transplants: Controlled demonstrations / S. Coleman // *Aesthetic 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 Practice Plastic Surgery (Munich, Germany).* – 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. Rod Dunbar // *ANZ J Surg.* – 2009. – Vol. 79. – P. 235–244.

5. Саркисов Д. С. Микроскопическая техника / Д. С. Саркисов, Ю. Л. Перов. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.

### REFERENCES

1. Panova O.S., Petrov I.A., Britun Yu.A., Piruzyan A.L. Experience of application of eutolipolifting experience with involution changes of the face and other defects of the skin. *Annaly rekonstruktivnoi i plasticheskoi khirurgii* 2002; 4: 45-47

2. Coleman S. Long-term survival of fat transplants: Controlled demonstrations. *Aesthetic Plast. Surg* 1995; 19: 421-425.

3. Hoerl H.W., Feller A.M. Autologous fat volume retention evaluation by magnetic resonance imaging. *Private Practice Plastic Surgery*, Munich, Germany. 2001; 4: 41-53.

4. Locke M., Windsor J., Dunbar P.R. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ J Surg* 2009; 79: 235-244.

5. Sarkisov D.S., Perov Yu.L. Microscopic technics. *Meditsyna* 1996, 544 p.

Надійшла 27.12.2012

УДК 577.151.63:612.128

В. В. Конопельнюк, В. В. Войтенко, О. М. Савчук, Л. І. Остапченко

## ВМІСТ СЕРОТОНІНУ ТА ТРИПТОФАНУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

УДК 577.151.63:612.128

В. В. Конопельнюк, В. В. Войтенко, А. Н. Савчук, Л. И. Остапченко  
СОДЕРЖАНИЕ СЕРОТОНИНА И ТРИПТОФАНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

Исследовано содержание серотонина и триптофана в сыворотке крови крыс в условиях экспериментальной модели хронической алкогольной интоксикации. При развитии алкогольной интоксикации установлено значительное увеличение содержания серотонина и триптофана. Такие результаты указывают на вовлечение серотонинергической системы в процесс формирования данной патологии. Несмотря на это, перспективными являются более углубленные исследования функционирования данной системы в условиях развития хронической алкогольной интоксикации.

**Ключевые слова:** серотонин, триптофан, серотонинергическая система, хроническая алкогольная интоксикация.

