

К ИЗУЧЕНИЮ СВЕЖЕВЫДЕЛЕННЫХ аутологичных стромальных клеток подкожной жировой клетчатки для регенерации биологических тканей

В.Б.Карпюк

• к.м.н., зав. отделением Южно-Российского центра пластической хирургии, г. Краснодар

М.Д.Перова

• д.м.н., профессор, руководитель Краснодарского Центра пародонтологии и дентальной имплантации, г. Краснодар

М.Г.Шубич

• д.м.н., профессор кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии, Кубанский государственный медицинский университет, г. Краснодар

Резюме. С целью изучения состава и свойств выделяемых нами из жировой ткани и используемых для аутотрансплантации стромальных клеток, выполнено морфологическое и иммунофенотипическое исследование образцов от 10 здоровых взрослых людей. В результате в свежих мазках и в культуре первого пассажа выявлены фибробластоподобные клетки, которые по данным иммунофлуоресцентного окрашивания экспрессируют маркеры мезенхимальных стволовых клеток (CD13, CD44, CD90, CD105) и активно синтезируют фибронектин и коллаген I типа. Незначительное количество клеток экспрессируют CD31, c-kit, десмин и гладкомышечный актин. CD34-позитивных клеток не обнаружено. Таким образом, выделяемые нами из жировой ткани и используемые для аутотрансплантации стромальные клетки обладают фибробластной морфологией, активно синтезируют компоненты внеклеточного матрикса и демонстрируют фенотип мезенхимальных стволовых клеток.

Ключевые слова: стромальные клетки жировой ткани, иммунофенотип, аутотрансплантация, репаративный остеогенез.

Summary. The purpose of our study was to examine composition and properties of used for autogenous transplantation adipose-derived stromal cells. The cellular material from 10 healthy adult people was investigated by direct microscopy and immunofluorescence. The fibroblast-like cells were detected morphologically. By immunofluorescent staining the expression of established mesenchymal stem cells markers (CD13, CD44, CD90, CD105) and actively fibronectin and collagen synthesis were determined. The insignificant quantity of cells expressed CD31, c-kit, desmin and smooth muscle actin. There were not CD34-positive cells. Thus, obtained from an adipose tissue stromal cells exhibit fibroblast-like morphology, actively synthesize extracellular matrix components and show a mesenchymal stem cells phenotype.

Key words: adipose-derived stromal cells, immunophenotype, autotransplantation, reparative osteogenesis.

Известные к настоящему времени методы замещения утраченных тканей в результате травм, последствий хирургического удаления новообразований, хронических дегенеративных процессов практически исчерпали свои возможности. Появляющиеся на рынке новые остеопластические материалы, в основном, остеокондуктивной направленности, не способны вернуть первоначальную структуру и функцию костной ткани [3]. Гистотипичное восстановление структуры особенно актуально при замещении значительных по размерам дефектов, когда необходимо достичь полноценной функции, как в норме.

Современный уровень развития клеточных технологий позволяет качественным образом изменить подход к процессам репаративной регенерации. Уже появились свидетельства использования мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в клинике онкогематологии, ортопедии и травматологии, кардиологии, нейрохирургии, трансплантологии органов и тканей [2, 7-8].

Тканевая инженерия с использованием потенциала подкожной жировой клетчатки пред-

увеличение скорости формирования регенерата на фоне трехкратного усиления неоваскуляризации по сравнению с контролем. Прирост нового зубодесневого прикрепления в полтора раза был выше в тестируемой группе, демонстрируя достоверное увеличение доли молодой кости альвеолы по сравнению с контролем (67% против 34%). Проведенный клинико-гистологический анализ позволил заключить о подавлении иммунопатологических реакций в тканях пародонта без назначения традиционной в этих случаях противовоспалительной, противомикробной терапии или иммунокоррекции. По результатам исследования был сделан вывод о достижении регенерата опорных тканей зуба иного качества, с минимальной степенью ретракции сформированных структур в отдаленном периоде и повышенной резистентностью к повторным антигенным атакам [5-6]. Разработанный нами протокол аутогенной клеточной терапии с применением стромальных клеток подкожной жировой клетчатки в челюстно-лицевой хирургии и пародонтологии защищен патентом РФ «Способ восстановления кости аль-

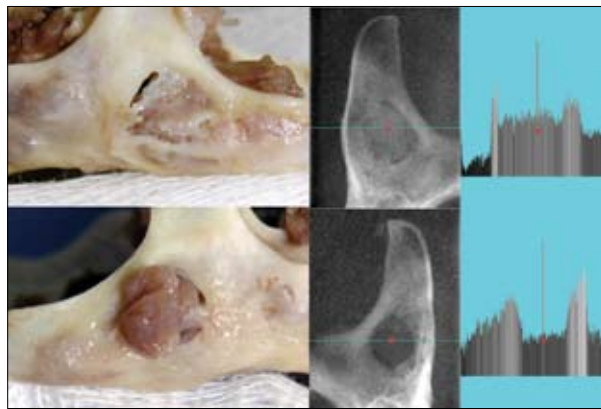


Рис. 1. Макропрепарат нижней челюсти морской свинки через 12 недель после аутотрансплантации СКЖТ. Верхний снимок (опыт): область дефекта, в который были трансплантированы СКЖТ, заполнена костью с выраженным кортикальным слоем; нижний снимок (контроль): бикортикальный дефект кости округлой формы с гладкими краями заполнен рубцовой и мышечной тканями. Справа — верификация сформированных структур по данным рентгенографии; амплитуда гистограмм демонстрирует разную плотность тканей

ставляет большой клинический интерес в части регенерации кости и восстановления других опорных тканей. Возможность эффективного восстановления тканей мезенхимального происхождения путем трансплантации стромальных клеток подкожной жировой клетчатки, с минимальным добавлением костной крошки в качестве индуктора остеогенной дифференцировки, была впервые убедительно продемонстрирована нами в эксперименте на животных [1]. Были изучены эффекты аутотрансплантации свежесыведенных стромальных клеток жировой ткани (СКЖТ) и получены многообещающие результаты полноценного (и в более ранние сроки) замещения больших бикортикальных дефектов челюстей (рис. 1).

В рандомизированном контролируемом исследовании нами проведена клинико-гистологическая оценка результатов клеточной терапии при тяжелом пародонтите, когда потеря околозубных тканей (кость альвеолы, корневой цемент, периодонтальная связка и аппарат мягкотканного прикрепления) составляет от 50% до 80% [4-5]. Так, в ранние сроки заживления было отмечено

веолярного гребня челюсти и тканей пародонта с редуцированным регенераторным потенциалом», RU 2320285C2 (опубл. 27.03.2008 г., бюлл. №9; приоритет 10.05.2006 г.). Иммунологическая, канцерогенная и инфекционная безопасность трансплантата на основе аутологичных свежесыведенных СКЖТ облегчает внедрение способа в рутинную клиническую практику.

В этой связи особую актуальность приобретают работы по выделению клеточного материала, пригодного для клинического применения. Размножение в культуре костномозговых МСК изменяет их характеристики, является дорогим, требующим определенного времени и специальных условий, процессом. Использование подкожной жировой клетчатки в качестве источника полипотентных клеток может предоставить достаточно большое количество клеточного материала и позволяет избежать недостатков культивирования.

Между тем состав и свойства применяемых нами ex tempore клеток для трансплантации требуют дополнительного изучения, что и послужило целью настоящей работы. Результаты иммунофе-



Композиты на все случаи

Пломбировочные материалы от Ивоклар-Вивадент, благодаря простому и эффективному применению и безупречным клиническим результатам, в течение многих лет устанавливают стандарты качества, а широкая палитра продуктов соответствует как самым высоким запросам, так и любому бюджету

Tetric Evo Ceram/Tetric Evo Flow

Нано-оптимизированная пластичная керамика, отвечающая самым высоким запросам эстетических реставраций, представлена в 19 цветах



Tetric N-Ceram/ Tetric N-Flow

Нано-оптимизированный светоотверждаемый композит для высококачественных реставраций представлен в 16 цветах



Tetric Econom Plus/ EcoFlow

Светоотверждаемый гибридный композит из уже ставшего популярным семейства Tetric для экономичных реставраций представлен в 6 цветах



www.ivoclarvivadent.ru

Ivoclar Vivadent Marketing Ltd.
Representative Office Moscow

Россия, 115114, Москва, Дербенёвская наб., 11, корп. В
Тел.: +7 495 913 66 16 (17,18,19) Факс: +7 495 913 66 15

ivoclar
vivadent
passion vision innovation

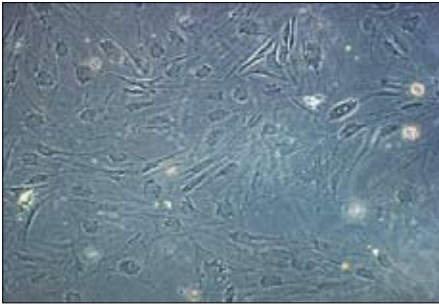


Рис. 2
Фазово-контрастное изображение культуры клеток первого пассажа

Таблица 1. Фенотип выделенных из жировой ткани клеток в культуре первого пассажа по данным иммунофлюоресцентного окрашивания

Антиген	Характеристика	Присутствие позитивных клеток в популяции
CD13	Маркёр мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани	+++
CD31	Маркёр эндотелиальных клеток	+
CD34	Маркёр кроветворных стволовых клеток	-
CD44	Маркёр мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани	+++
CD90	Маркёр мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани	+++
CD105	Маркёр мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани	+++
c-kit (CD117)	Рецептор фактора роста стволовых клеток	+
Десмин	Маркёр клеток сократительного фенотипа	+
Гладкомышечный актин	Маркёр клеток сократительного фенотипа	+
Проколлаген I типа	Компонент внеклеточного матрикса	+++
Фибронектин	Компонент внеклеточного матрикса, один из маркёров клеток с мультилинейным дифференцировочным потенциалом	+++

нотипирования свежевыделенной васкулярно-клеточной фракции, содержащей СКЖТ, приведены лишь в единичных публикациях и значительно различаются спектром выбранных исследователями первичных антител [2, 7-8].


МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Жировую ткань получали путем шприцевой аспирации от 10-ти здоровых пациентов обоего пола, в возрасте от 24 до 49 лет, в ходе косметологической операции липосакции. Выделение стромальных клеток проводили по стандартному протоколу в собственной модификации [10, патент RU 2320285C2]. Свежий липоаспират отмывали от примеси крови и инкубировали в стерильных условиях на водяной бане при 37 °С в течение 30 минут с 0,075% раствором коллагеназы I типа (Collagenase Type I, EURO BIO Biotechnology, France) в фосфатном буфере. Для инактивации фермента использовали сыворотку крови пациента в количестве 10% от общего объема и отделяли клеточную фракцию центрифугированием в течение 10 минут со скоростью вращения 1500 об/мин. Из свежего осадка готовили цитологические мазки с окрашиванием по способу Романовского-Гимзы и проводили световую микроскопию.

Фенотипическое исследование образцов клеток выполнялось в лаборатории ООО «Тенная и клеточная терапия» (г. Москва) по стандартной методике иммунофлюоресцентного окрашивания. После кратковременного культивирования в среде DMEM клетки первого пассажа окрашивали моноклональными антителами к специфическим маркерам. Для этого использовали следующие антитела: CD11b

(abcam #6332), CD13 (Serotec #MCA1270XZ), CD31 (BD, Pharmingen #550389), CD34 (BD, Pharmingen #550390), CD44 (abcam #F10-44-2), CD90 (Calbiochem #CP28), CD105 (Serotec), Pro-collagen I (Takara #PC5-5), Fibronectin (abcam #6328-250), SMA (Sigma #A-7811) и c-kit (BD, Pharmingen #612319). Для визуализации образовавшихся комплексов первых антител с антигенами проводили инкубацию со вторыми антителами, конъюгированными с флуорохромом (Alexa 488). Для выявления ядер клетки докрашивали флуоресцентным красителем DAPI (Dako). Визуализацию окрашивания и анализ изображения проводили на флуоресцентном микроскопе Axiovert 200M (Zeiss, Германия) с использованием объективов x 20 и x 40.

клетки гистогенетического ряда — от стволовой до высокодифференцированной и гибнущей. Как принято считать, основным источником восстановления жировой ткани являются рассредоточенные в строме МСК. Приведенные результаты исследования показывают, что ферментативная диссоциация и последующее центрифугирование позволяют выделить из липоаспирата фибробластоподобные клетки, которые обладают высокой пролиферативной и синтезирующей активностью, способны к самоподдержанию в культуре и экспрессируют установленные маркеры МСК: CD13, CD44, CD90, CD105 [8, 10]. Учитывая наличие небольшого количества клеток, экспрессирующих нехарактерные для МСК маркеры (CD31, Desmin, SMA), не исключается присутствие в изучаемой популяции полустоволовых (камбиальных) клеток-предшественников, в том числе проявляющих фенотипические признаки гладкомышечной и эндотелиальной дифференцировки. Интересным и относительно новым является факт обнаружения в культуре c-kit-позитивных клеток. В литературе имеются сведения об экспрессии этого рецептора со свойствами тирозинкиназы тотипотентными клетками, кроветворными стволовыми клетками, мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга. C-kit активизируется фактором роста стволовых клеток, в результате чего инициируется клеточная пролиферация, дифференцировка и включаются механизмы, регулирующие процессы апоптоза.

Таким образом, из аспирированной жировой ткани взрослого человека ex tempore может быть выделена фракция стромальных клеток с фибробластной морфологией и иммунофенотипом мезенхимальных стволовых клеток. Высокие регенераторные свойства таких клеток подтверждают результаты наших экспериментальных и первых клинических исследований. Механизм индуцируемого ими восстановительного гистогенеза и возможности широкого практического использования требуют дальнейшего изучения. 

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В цитологических мазках полученного из липоаспирата материала при окрашивании по способу Романовского-Гимзы на оксифильном фоне выявляются клетки двух типов: вытянутые веретеновидные с плотным гомогенно окрашенным ядром и скудной цитоплазмой, а также более крупные, округлой формы, с темным гранулированным ядром и гетерогенной цитоплазмой. Присутствуют единичные адипоциты, макрофаги и тучные клетки. Фон мазка — оксифильный гомогенный, встречаются единичные волокна и капилляры.

В процессе культивирования исследуемые клетки быстро размножаются (время удвоения около 68 часов) и представляют собой относительно гомогенную культуру фибробластоподобных клеток (рис. 2). По данным иммунофлюоресцентного анализа все клетки первого пассажа (100%) экспрессируют маркеры CD13, CD44, CD90, CD105; активно синтезируют компоненты внеклеточного матрикса, такие как фибронектин и коллаген I типа. Кроме этого, в образцах встречается небольшое количество клеток, экспрессирующих CD31, CD117 (c-kit), десмин и гладкомышечный актин. CD34-позитивных клеток в культуре не обнаружено. Присутствие в популяции флуоресцирующих клеток с краткой характеристикой тестируемого антигена отражено в табл. 1.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что в течение жизни человека происходят значительные колебания объема подкожной жировой клетчатки. Поэтому, как в обновляющемся типе тканей, здесь должны присутствовать все

ЛИТЕРАТУРА:

- Картюк В.В., Перова М.Д., Козлов В.А., Шубич М.Г., Попкина О.Н., Мельник Е.А. Экспериментальная модель реконструкции кости путем остеогенной трансформации аутоинвазивных свежевыделенных стромальных клеток жировой ткани // *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. - 2007. - №4. - С. 14-18.
- Парфенова Е.В., Цоколаева З.И., Траптуев Д.О., Джонстон Б., Рахмат-Заде Т.М., Калинина Н.И., Талицкий К.А., Ратнер Е.И., Марч К.Л., Ткачук В.А. Поиск новых "инструментов" для терапевтического ангиогенеза // *Молекулярная медицина*. - 2006. - №2. - С. 10-23.
- Перова М.Д. Ткани пародонта: норма, патология, пути восстановления. Москва, Триада, Лтд, 2005, 312 с.
- Перова М.Д., Фомичева А.В., Фомичева Е.А., Картюк В.В. Оценка роста нового зубодесневого прикрепления после аутоинвазивации стромальных клеток, выделенных из жировой ткани // *Пародонтология*. С-Пб., 2006. - №4. - С. 28-31.
- Перова М.Д., Фомичева А.В., Е.А. Картюк В.В. Клинико-гистологические результаты клеточной терапии при тяжелом пародонтите // *Кубанский научный медицинский Вестник*. Краснодар. - 2007. - №1-2 (94-95). - С. 142-146.
- Перова М.Д., Шубич М.Г., Картюк В.В., Фомичева А.В., Мельник Е.А. Возможности стволовых стромальных клеток для регенерации тканей пародонта и их взаимодействие с тканевым микроокружением. // *Морфология*. С-Пб., 2007. - Том 131, №3. - С. 7-15.
- Сергеева Н.С., Свиридова И.К., Кирсанова В.А., Маришутина Н.В., Ахмедова С.А., Махмурова Н.Т., Титова Н.С. Культивирование и характеристика негемопоэтических постнатальных стволовых клеток из жировой ткани человека // *Молекулярная медицина*. - 2006. - №2. - С. 23-29.
- Траптуев Д.О., Парфенова Е.В., Ткачук В.А., Марч К.Л. Стромальные клетки жировой ткани - пластический тип клеток, обладающих высоким терапевтическим потенциалом // *Цитология*. - 2006. - т. 48 - №2. - С. 83-94.
- Minguell J.J., Erices A. and Conget P. Mesenchymal stem cells // *Exp. Biol. and Med.* - 2001 - Vol. 226 - p. 507-520.
- Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.L., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hendrick M.N. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // *Mol Biol Cell*. - 2002. - Vol. 13 - p. 4279-4295.

Эффективная работа с композитами!

Полный доступ с

Optra Gate®

Optra Gate® Junior



Абсолютная сухость полости рта с

Optra Dam



Быстрая полировка до зеркального блеска с

Optra Pol



Превосходный контактный пункт с

Optra Contact®



Простое моделирование с

Optra Sculpt®



Замечательные результаты с инновациями от Optra Line

- Optra Gate
- Optra Gate Junior
- Optra Dam
- Optra Pol
- Optra Contact
- Optra Sculpt

Видео
доступно на:

www.ivoclarvivadent.ru

ivoclar Vivadent Marketing Ltd.
Representative Office Moscow

Москва, 115114, Москва, Дербенёвская наб., 11, корп. В
Тел.: +7 495 913 66 16 (17,18,19) Факс: +7 495 913 66 15

ivoclar
vivadent
passion vision innovation