

ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНОВ И СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ НА ИНТЕГРАЦИЮ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЯХ ДВУХКОМПОНЕНТНОГО КОМПОЗИТНОГО СЕТЧАТОГО ИМПЛАНТАТА

В. Г. Дубинина, С. Г. Четвериков, О. В. Лукьянчук, Л. Г. Роша, В. В. Сажиевко,
М. А. Лысенко, А. С. Михайлов, М. С. Четвериков

Одесский национальный медицинский университет,
Центр реконструктивной и восстановительной медицины, Университетская клиника, г.Одесса

IMPACT OF CYTOKINES AND STROMAL CELLS OF ADIPOSE TISSUE ON INTEGRATION OF A TWO-COMPONENT COMPOSITE NET IMPLANT INTO BIOLOGICAL TISSUES

V. G. Dubinina, S. G. Chetverikov, O. V. Lukyanchuk, L. G. Rosha, V. V. Sazhiyenko,
M. A. Lysenko, A. S. Mikhaylov, M. S. Chetverikov

Применение сетчатых имплантатов на основе частично биodeградирующих синтетических материалов широко распространено в герниологии. Однако, как при использовании любого синтетического материала, интегрированного в биологические ткани, возникают неспецифические воспалительные реакции по типу "реакции на инородное тело" в виде длительной экссудации и избыточного перипротезного фиброза [1]. Для оптимизации процессов репарации тканей применяют продукты на основе плазмы, богатой тромбоцитами (Platelet Rich Plasma), которые содержат 3 ключевых фактора роста: трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), тромбоцитарный фактор роста AB (PDGF-AB) и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), а также матричные белки (фибронектин, витронектин и тромбоспондин) [2, 3]. Формой плазмы, богатой тромбоцитами, пролонгированного действия является ОТрФ, применение которого способствует высвобождению в окружающие ткани регенеративных цитокинов в ткани в течение 7 сут после его введения [4]. Также широко применяют жировую ткань как источник мультипотентных стромальных стволовых клеток, которые обладают высоким терапевтическим потенциалом [5]. Эффект сочетанного применения собственного клеточного материала (жировая

Реферат

В эксперименте на 36 половозрелых самцах крыс линии Вистар изучены морфологические изменения биологических тканей, окружающих композитный сетчатый имплантат с крупными порами "Ultrapro", а также его сочетание с жировым трансплантатом и обогащенным тромбоцитами фибрином (ОТрФ). При применении такой конструкции отмечены процессы образования и организации соединительной ткани, неоангиогенеза, а также рост новой жировой ткани. Вследствие локального увеличения концентрации высокоактивных биологических субстанций и регенеративных цитокинов при сочетании сетчатого имплантата с жировым трансплантатом, имеющим в составе мультипотентные стволовые клетки, повышается пролиферативная активность всех клеточных элементов, окружающих сетчатый имплантат, что способствует его оптимальной интеграции в окружающие ткани.

Ключевые слова: двухкомпонентный композитный сетчатый имплантат; обогащенный тромбоцитами фибрин; жировой трансплантат; цитокины; мультипотентные стволовые клетки; эксперимент.

Abstract

Morphological changes in biological tissues, surrounding the composite net-like implant, owing large pores "Ultrapro", and also its combination with adipose transplant, fibrin, enriched with thrombocytes, were studied in experiment on 36 adult male rats of a Wistar line. While application of such construction the processes of creation and organization of connective tissue, neoangiogenesis as well as development of a new adipose tissue are improved. As a consequence of increase of concentration of highly active biological substances and regenerative cytokines in combination of the net implant with adipose transplant, containing multipotent stem cells, proliferative activity of all cellular elements, surrounding the net implant, is raising, what predispose its optimal integration into surrounding tissues.

Key words: two-component composite net implant; fibrin, improved by thrombocytes; adipose transplant; cytokines; multipotent stem cells; experiment.

ткань) и тканевых факторов роста (продукты на основе плазмы, богатой тромбоцитами) может оказать положительное влияние на интеграцию синтетических материалов в окружающих биологических тканях [6].

Цель работы: изучить морфологические изменения в биологических тканях, окружающих композитный сетчатый имплантат, а также в тканях при его сочетанном приме-

нении с жировым трансплантатом и ОТрФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили в условиях острого и хронического эксперимента на 36 половозрелых самцах крыс линии Вистар массой тела 160 — 180 г с соблюдением основных правил патофизиологического эксперимента, в биологической

клинике Университета. Жировую ткань изымали у здоровых пациентов по методике Coleman во время липосакции, обрабатывали по ранее описанной методике [7]. Для получения ОТрФ забирали кровь из левого желудочка крысы, из нее с помощью системы для концентрации клеток SmartPREP 2 [4] получали богатую тромбоцитами плазму и аутологичный тромбин. Богатую тромбоцитами плазму смешивали в шприце с ранее обработанной жировой тканью в соотношении 1 : 9. Шприц с полученным ранее аутологичным тромбином и шприц, содержащий богатую тромбоцитами плазму и жировую ткань, соединяли с V-образным спейсером производства Harvest Technologies Corp. (США). Крысам подкожно в 4 разных сегмента спины имплантировали: 2 мл

суспензии жировой ткани (I сегмент), фрагмент композитного синтетического имплантата (КСИ) размерами 10 × 10 мм (II сегмент), фрагмент КСИ размерами 10 × 10 мм в сочетании с 2 мл жировой ткани (III сегмент); фрагмент КСИ размерами 10 × 10 мм, заключенный в оболочку, содержащую 2 мл ОТрФ и жировой ткани (IV сегмент). Продолжительность наблюдения 90 сут. Животных выводили из эксперимента через 30, 60 и 90 сут после введения трансплантатов. Со спины животных выделяли участок ткани, включавший трансплантат и подлежащие ткани, готовили срезы по стандартной методике. По мере приготовления срезов проводили их патоморфологическое исследование. Морфометрический анализ выделенных тканей проводили с по-

мощью микроскопа Leica DM 750 (Германия). Использовали морфометрическую сетку и линейку (в соответствии с рекомендациями Г. Г. Автандилова, 1990; 2002). Определяли средние значения площади фиброза и роста сосудистого русла.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По данным морфологического исследования, в первый месяц наиболее выраженную инфильтрацию лимфоцитами и плазмацитами наблюдали в зоне имплантации КСИ в сочетании с жировой тканью и ОТрФ. Однако через 2 мес выраженность этой острой иммунной тканевой реакции была одинаковой во всех зонах пластики. Через 3 мес количество клеток иммунного ответа на введенные вещества значительно различалось. Как следствие появления многочисленных фибробластов в местах имплантации протеза возникали поля фиброза. При изолированной имплантации суспензии жировой ткани наблюдали значительный лизис липоцитов. На 30-е сутки эксперимента отмечена незначительно выраженная инфильтрация лейкоцитами, некроз некоторых липоцитов (рис. 1а). На 60-е сутки среди крупных липоцитов уменьшалась лейкоцитарная инфильтрация; увеличивалась доля липоцитов в общей площади образца (рис. 1б). На 90-е сутки наблюдали образование кисты в зоне погибших липоцитов с инфильтрацией лимфоцитами, перицитами, склероз, формирование олеогранулемы (рис. 1в).

При имплантации КСИ выявлена массивная фибротизация ткани, окружающей протез. На 30-е сутки отмечено появление соединительной ткани вокруг КСИ, увеличение количества мелких и средних сосудов (рис. 1г). На 60-е сутки наблюдали единичные лимфоциты, перициты в строме, увеличение количества коллагеновых волокон вокруг КСИ (рис. 1д). На 90-е сутки отмечены выраженный склероз и тонкая полоска коллагеновых волокон вокруг КСИ, сохранение крупноклеточной инфильтрации в строме (рис. 1е).

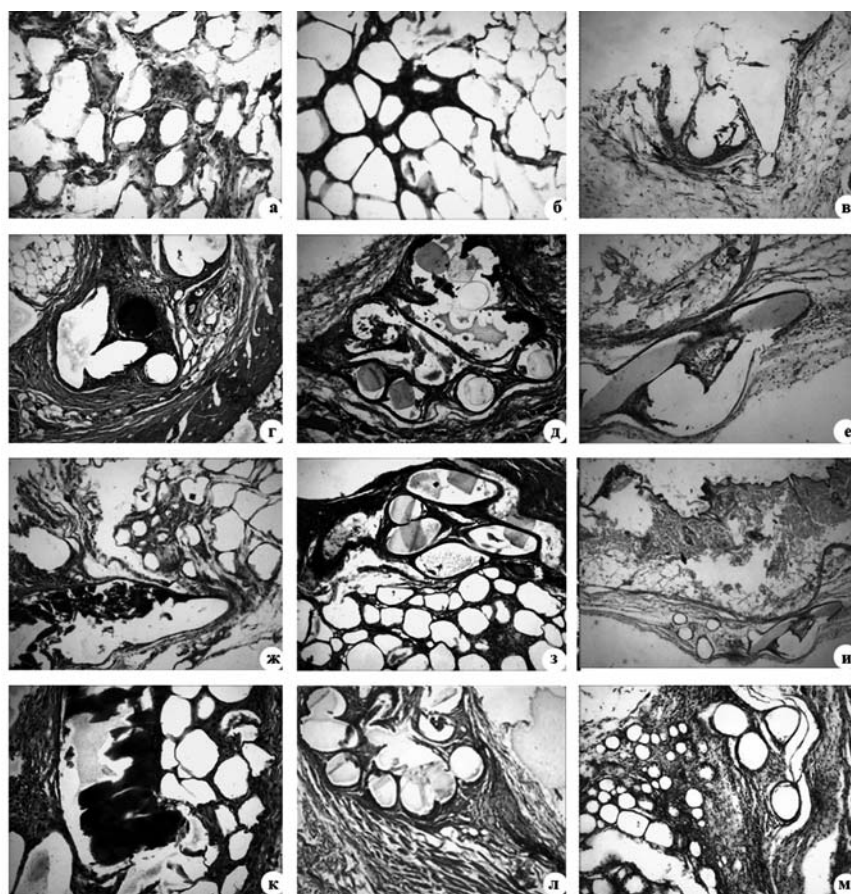


Рис. 1.
Серия микрофото имплантированной жировой ткани (а, б, в), КСИ (г, д, е), КСИ с жировой тканью (ж, з, и), КСИ с жировой тканью и ОТрФ (к, л, м) на 30, 60 и 90-е сутки с момента имплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. ×100.

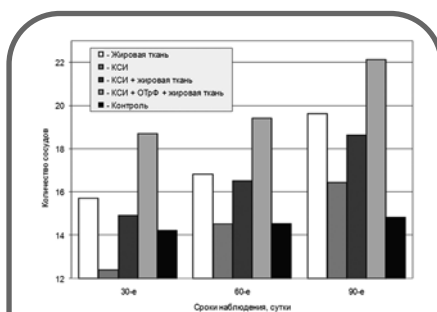


Рис. 2.
Морфометрический анализ интенсивности локального неоангиогенеза. Среднее количество сосудов микроциркуляторного русла вокруг трансплантата в поле диаметром 1 мм.

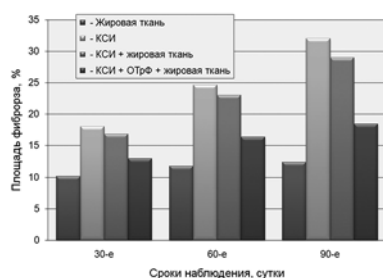


Рис. 3.
Морфометрический анализ образования соединительной ткани.

При имплантации КСИ с жировой тканью на 30—е сутки обнаружено очаговое преждевременное появление соединительной ткани, увеличение количества капилляров, сочетание крупных лимфоцитов и мелких мультилокулярных клеток (рис. 1ж). На 60—е сутки сохранялась лимфоцитарная инфильтрация вокруг КСИ, отмечено утолщение коллагеновых волокон и увеличение их количества, появление скоплений мелких лейкоцитов (рис. 1з).

Эти процессы продолжались до 90—х суток (рис. 1 и). При комбинированной имплантации КСИ с ОТрФ и жировой тканью на 30 — 60—е сутки отмечено увеличение количества коллагеновых волокон, преимущественно тонких и средних, диффузная умеренно выраженная инфильтрация лимфоцитами, перипротезной зоны, перипротезной зоны, перипротезной зоны, перипротезной зоны, перипротезной зоны (рис. 1к, 1л). На 90—е сутки сохранялась выраженная инфильтрация лимфоцитами, перипротезной зоны, перипротезной зоны, перипротезной зоны, перипротезной зоны (рис. 1м).

Подсчитана средняя площадь участков фиброза в каждой группе. Полученные результаты свидетельствуют, что при сочетании комбинированного сетчатого имплантата с ОТрФ и жировой тканью соединительная ткань занимает меньшую площадь (рис. 2).

Важным фактором интеграции синтетического имплантата в окружающие ткани, помимо отсутствия избыточного фиброза, является степень васкуляризации сформированного комплекса протез — соединительная ткань. При анализе данных о васкуляризации тканей вокруг протеза (подсчитано по 10 полей зрения диаметром 1 мм) среднее значение определяли в каждой группе на всех трех этапах эксперимента. При имплантации КСИ в сочетании с ОТрФ и жировой тканью, начиная с первого месяца, заметно увеличение количества сосудов в очаге эксперимента, значительно более выраженное к 3—му месяцу (рис. 3). Очевидно, введение ОТрФ стимулирует неоангиогенез вследствие пролонгированного действия регенеративных цитокинов.

Таким образом, при изолированном использовании суспензии жировой ткани степень фибротизации перипротезной зоны уменьшается незначительно, усиливается неоангиогенез в этой области. Это обусловлено слабой интеграцией липоцитов в образовавшийся комплекс "комбинированный синтетический имплантат — соединительная ткань", их значительным лизисом и резорбцией. При сочетанном применении КСИ, суспензии жировой ткани и ОТрФ в зоне имплантации протеза оказываются и мультипотентные стволовые клетки, способные к активной дифференцировке в различные клеточные структуры соединительной ткани, и активные цитокины, стимулирующие этот процесс. Вследствие этого интеграция имплантата происходит быстрее благодаря более качественной васкуляризации зоны вокруг нитей протеза, меньшей ишемизации тканей. Следствием этого является менее выраженное в отдаленном периоде после имплантации (2 — 3 мес) хроническое воспаление, меньшая степень гиперфиброза. Все это создает условия для формирования на КСИ тонкой, эластичной, хорошо кровоснабжаемой соединительной ткани, по своим свойствам максимально приближенной к естественному неповрежденному апоневрозу человека.

Таким образом, применение конструкции на основе ОТрФ и жировой ткани положительно влияет на интеграцию в биологических тканях двухкомпонентного КСИ вследствие уменьшения перипротезного фиброза и улучшения периферической реваскуляризации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Порівняльна характеристика тканинної реакції на імплантацію поліпропіленових та композитних алотрансплантатів / С. Г. Четверіков, В. Ю. Вододюк, О. В. Сивоконюк [та ін.] // Актуальні проблеми сучасної медицини. — 2009. — Т. 9, вип. 1. — С. 399 — 401.
2. Application of platelet—rich plasma to fat grafting during plastic surgical procedures: Clinical and in vitro evaluation / V. Cervelli, P. Gentile, M.G. Scioli [et al.] // Tissue Eng. Part C Methods. — 2009. — N 15. — P. 625 — 634.
3. Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence—based answer comparing a pure platelet—rich plasma (P—PRP) gel and a leukocyte— and platelet—rich fibrin (L—PRF) / D. M. Dohan Ehrenfest, T. Bielecki, R. Jimbo [et al.] // Curr. Pharm. Biotechnol. — 2012. — Vol. 13, N 7. — P. 1145 — 1152.
4. Система для концентрування клітин SmartPRP 2 виробництва Harvest Technologies Corp. (USA). Свідоцтво про державну реєстрацію №10179/2011 згідно з наказом МОЗ України від 08.02.11 № 69.
5. Liao H. T. Application of platelet—rich plasma and platelet—rich fibrin in fat grafting: Basic science and literature review / H. T. Liao, K. Marra, P. J. Rubin // Tissue Eng. Part B Rev. — 2013. — N 4. — P. 311 — 314.
6. Особенности неоангиогенеза при применении обогащенной тромбоцитами плазмы / В. Н. Запорожан, Е. Л. Холодкова, В. А. Цепколенко [и др.] // Хірургія України. — 2011. — № 3. — С. 41 — 46.
7. Пат. на корисну модель 66402 Україна, МПК А61В17/00. Спосіб обробки жирової тканини для подальшого використання її як аутоотрансплантату / В. Г. Дубініна, В. В. Сажієнко, О. В. Лук'янчук, С. Г. Четверіков (Україна); заявник і патентовласник Одес. нац. мед. ун—т. — № u201114126; заявл. 30.11.11; опубл. 26.12.11. Бюл. № 24.