© Коллектив авторов, 2010
УДК 611.018:616-089.843:599.323.4

О.С. Озерская[1], *Л.И. Хожай*[2] и *А.О. Данилов*[3]

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФИБРОБЛАСТОВ КРЫС ПОСЛЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И АЛЛОТРАНСПЛАНТАЦИИ В ДЕРМУ

[1] Кафедра и клиника кожных и венерических болезней (нач. — проф. А.В. Самцов), Российская военно-медицинская академия им. С.М. Кирова; [2] лаборатория онтогенеза нервной системы (зав. — чл.-кор. РАМН проф. В.А. Отеллин), Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН; [3] отделение трансплантации костного мозга и биотерапии (зав. — проф. В.М. Моисеенко), Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург;
e-mail: ozerskyspb@gmail.com, astarta0505@mail.ru

В модельных экспериментах на 10 крысах линии Вистар изучали морфофункциональные характеристики фибробластов (выделенных из кожи крысят на 2–4-е сутки после рождения) и оценивали их жизнеспособность в начальные сроки после аллотрансплантации в дерму реципиента. Результаты исследования показали, что полученная для трансплантации суспензия клеток после длительного культивирования в синтетических средах представлена в основном популяцией зрелых фибробластов. Через 3 сут после трансплантации фибробласты остаются жизнеспособными и сохраняют свои морфологические характеристики. Это внешнее соответствие фибробластам суспензии сочетается со способностью этих клеток к пролиферации, о чем свидетельствует положительная иммуноцитохимическая реакция на ядерный антиген пролиферирующих клеток. В дальнейшем (через 5 сут) часть пересаженных фибробластов также сохраняют свою жизнеспособность и обнаруживают гетероморфность, обусловленную, видимо, их постепенной дифференцировкой в фиброциты. В центральной части трансплантата отмечена гибель части пересаженных клеток, вызванная нарушением трофики в зоне их скопления.

Ключевые слова: фибробласты, дерма, аллотрансплантация, жизнеспособность.

Интерес к трансплантации фибробластов для терапевтических целей существует уже давно и связан с возможностью реконструировать и восстанавливать с их помощью ткани после повреждений, сопровождающих травмы, резекции, врожденные дефекты. В клинической практике достаточно эффективно применяются как аутогенные, так и аллогенные фибробласты для лечения ожогов, трофических язв, гипертрофических и келоидных рубцов [1, 5, 6, 8]. Фибробласт является основной клеткой, синтезирующей как межклеточное вещество дермы — коллаген, фибронектин, гликозаминогликаны, протеогликаны, так и различные факторы роста, что обеспечивает структурно-метаболические параметры, поддерживающие гомеостаз ткани. Использование фибробластов в лечебных целях привлекает к себе внимание еще и в связи с относительной быстротой и дешевизной выращивания клеточного материала, особенно аллогенного, так как не требует применения дорогостоящих питательных сред и стимуляторов роста, что снижает себестоимость получения суспензий культивированных клеток. Фибробласты в культуре легко подвергаются пассированию, при этом они, как полагают, имеют низкую экспрессию поверхностных антигенов гистосовместимости [3, 5, 7], что открывает возможность для использования трансплантатов аллогенных клеток и создания клеточных банков. В настоящее время разработано много методов получения и культивирования фибробластов, однако жизнеспособность клеток в суспензии определяется с помощью подсчета количества прикрепившихся к субстрату клеток и их способности к формированию колоний после краткосрочной инкубации. Более того, несмотря на довольно большое количество клинических наблюдений, демонстрирующих положительные результаты после использования аллогенных фибробластов, их морфофункциональные характеристики, дающие представление об их жизнеспособности и пролиферативной активности после трансплантации реципиенту, изучены крайне мало.

Целью данной работы явилось исследование в модельных экспериментах морфофункциональных характеристик аллогенных фибробластов и оценка их жизнеспособности в начальные сроки после трансплантации в дерму реципиента.

Материал и методы. Для получения суспензии фибробласты выделяли из кожи крысят Вистар на 2–4-е сутки после рождения. Кожу промывали в растворе Хенкса, содержащем 200 ЕД/мл гентамицина, разрезали на кусочки площадью 0,2–0,5 см^2 и инкубировали в 0,5% растворе диспазы на фосфатном буфере (pH 7,4) при температуре 37 °С. Затем образцы переносили в буферный раствор Дульбекко (pH 7,4) и отделяли эпидермис от дермы. Дерму инкубировали в 0,125% растворе трипсина. Полученную суспензию

клеток центрифугировали, отфильтровывали и высевали в чашки Петри. Культивирование осуществляли в течение 6 сут в среде FAD (Биолот, Россия), состоящей из смеси сред DMEM и F12 в соотношении 3:1, с добавлением 10% сыворотки крови крупного рогатого скота, 5 мкг/мл инсулина (Sigma, США), 0,5 мкг/мл гидрокортизона гемисукцината (Sigma, США), 10 мкг/мл эпидермального фактора роста (ЭФР). Затем клетки снимали с подложки раствором трипсина (0,25%). Перед трансплантацией определяли состав клеток и их состояние в полученной суспензии. Клетки помещали на предметное стекло, фиксировали смесью ацетона и 96° этилового спирта (1:1), окрашивали гематоксилином Майера и исследовали под световым микроскопом.

Готовую клеточную суспензию использовали в течение 2–3 ч после получения. Аллогенные фибробласты вводили в дерму кожи (боковой области спины) наркотизированных взрослых крыс-самцов (n=10) (для наркоза использовали тиопентал-натрия в дозе 30 мг/кг массы тела) в объеме 0,4 мл на одну папулу, при этом концентрация составляла 1,5 млн клеток в 1 мл. Полученную внутрикожную папулу обводили желтым кадмием или крепким раствором $KMnO_4$. Через 3 (n=5) и 5 (n=5) сут после трансплантации аллогенных фибробластов у наркотизированных крыс из обведенных красителем очагов для исследования вырезали кусочек кожи размером 0,8 см^2. Все эксперименты проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ № 755 от 12.03.1977 г. МЗ СССР). Материал фиксировали в жидкости Буэна, обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации и заливали в парафин. Готовили поперечные срезы кожи толщиной 5 мкм на санном микротоме (Рейхерт, Германия) и окрашивали гематоксилином – эозином. Для оценки пролиферативной активности трансплантированных фибробластов иммуноцитохимически выявляли ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA) с помощью моноклональных антител (клон PC10 – DAKO, Дания), вторичных биотинилированных антител из набора LSAB2/HRP-Rat. Выявление продукта реакции проводили при помощи хромогена DAB+ (диаминобензидин) (DAKO, Дания). Приготовленные препараты исследовали при помощи светового микроскопа DME (Leica, Германия). Изображения были получены с помощью цифровой видеокамеры EC-3 (Leica, Германия).

Результаты исследования. Полученная после культивирования суспензия клеток непосредственно перед трансплантацией была представлена одним типом клеток, подавляющее большинство которых имели крупные светлые ядра овальной или круглой формы с одним или двумя ядрышками и цитоплазму, в которой были различимы зоны эндо- и эктоплазмы. Последняя, как правило, включала многочисленные вакуоли и имела длинные отростки, что позволило отнести данные клетки к зрелым фибробластам (рис. 1, а, см. вклейку на стр. 14). Кроме того, иногда встречались делящиеся клетки и молодые фибробласты меньшего размера и не имеющие отчетливо выраженных отростков (см. рис. 1, б, стр. 14).

Через 3 сут после введения суспензии клеток было обнаружено, что трансплантат не имел резко очерченных границ. По его краям пересаженные фибробласты были диффузно рассеяны между коллагеновыми волокнами и фиброцитами реципиента. Основная часть пересаженных фибробластов имели крупные светлые ядра округлой формы с одним или двумя ядрышками, большой объем цитоплазмы и отростки (рис. 2, а, стр. 14). Такие клетки в месте введения встречались в значительном количестве (15–17 клеток в поле зрения, об. 20, ок. 10). В центральной части трансплантата, где находилось значительное скопление пересаженных фибробластов, встречались клетки с признаками хроматолиза разной степени выраженности. В окружающей дерме преобладали фиброциты реципиента, имеющие вытянутую, веретенообразную форму, и макрофаги, которые присутствовали также в самом трансплантате. Вокруг сосудов дермы встречались единичные тучные клетки.

Результаты иммуноцитохимического выявления PCNA показали, что через 3 сут после трансплантации значительное количество пересаженных фибробластов иммуноположительны. Окрашенные ядра значительно превосходили по размерам неокрашенные ядра макрофагов и фиброцитов реципиента (см. рис. 2, б, стр. 14). Следовательно, через 3 сут после трансплантации подавляющее число аллогенных фибробластов крыс, подвергавшихся продолжительному культивированию в синтетических средах, PCNA-иммунореактивны, что может свидетельствовать об их способности к делению.

Через 5 сут после трансплантации в месте пересадки обнаруживались клетки со светлыми овальными ядрами и большим объемом цитоплазмы, которые мы определяли как зрелые фибробласты (см. рис. 2, г, стр. 14), однако, их количество было значительно меньше, чем в предыдущий срок исследования (8–10 клеток в поле зрения). При этом увеличивалось число клеток, имеющих более темные ядра и удлиненную форму клеточного тела с отростками (см. рис. 2, г, стр. 14) — предположительно фиброцитов, но отличающихся от фиброцитов реципиента более крупными размерами. В центральной части суспензионного трансплантата встречались клетки с признаками хроматолиза (см. рис. 2, в, стр. 14). В трансплантате и вокруг него присутствовали макрофаги, а по его периферии встречались тучные клетки.

Обсуждение полученных данных. Результаты исследования свидетельствуют о том, что основная часть зрелых фибробластов крысы, полученных после длительного культивирования в синтетических средах и пересаженных в дерму кожи реципиента, через 3 сут после трансплантации остаются жизнеспособными и в основ-

ном сохраняют свои морфологические характеристики. Это внешнее соответствие фибробластам суспензии сочетается со способностью этих клеток к пролиферации, о чем свидетельствует положительная иммуноцитохимическая реакция ядер на PCNA. В дальнейшем (через 5 сут) часть этих клеток также сохраняют свою жизнеспособность, при этом обнаруживается некоторая гетероморфность трансплантированных фибробластов, обусловленная, видимо, постепенной дифференцировкой некоторых из них в фиброциты. Отмеченная гибель части пересаженных клеток в центральной области суспензионного трансплантата, вероятно, вызвана нарушением трофики клеток в зоне значительного их скопления. Жизнеспособность пересаженных аллогенных фибробластов дает основание предположить, что только в начальные сроки после трансплантации они могут осуществлять синтез составляющих межклеточного вещества, а также различных ростовых и трансформирующих факторов, стимулирующих пролиферацию и дифференцировку собственных клеток, направленных на восстановление как эпидермального, так и дермального компонентов кожи реципиента [1, 2, 4]. Тем не менее, измененная система сложных межклеточных взаимоотношений и микроокружения при трансплантации, играющих ведущую роль в поддержании гомеостаза ткани, обусловливает необходимость дальнейших комплексных исследований судьбы пересаженных клеток, определения соотношения тканевых компонентов, выявления коллагенообразования, ориентации коллагеновых волокон, их плотности расположения, степени зрелости, которые явятся основой для дальнейшей разработки и более успешного применения методов клеточной терапии.

Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-00700.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федоров В.Д., Саркисов Д.С., Алексеев А.А. и др. Пластическое восстановление кожных покровов с использованием культивированных аллофибробластов. Анналы хирургии, 1995, т. 4, с. 16–20.
2. Chen J.D., Kim J.P., Zhang K. et al. Epidermal growth factor (EGT) promotes human keratinocyte locomotion on collagen by increasing the alpha-2 integrin subunit. Exp. Cell Res., 1993, v. 209, № 2, p. 216–223.
3. Halfter W., Liverani D., Vigny M. and Monard D. Deposition of extracellular matrix along the pathways of migrating fibroblasts. Cell Tissue Res., 1990, v. 262, № 3, p. 467–481.
4. Kane C.J., Hebda P.A., Mansbridge J.N. and Hanawalt P.C. Direct evidence for spatial and temporal regulation of transforming growth factor beta-1 expression during cutaneous wound healing. J. Cell Physiol., 1991. v. 148, № 1, p. 157–173.
5. Nanchahal J. and Davies D. Cultured composite skin grafts for burns. J. Anat., 1991, v. 176, p. 181–195.
6. Nanchahal J., Dover R. and Otto W.R. Allogeneic skin substitutes applied to burns patients. Burns, 2002, v. 28, № 3, p. 254–257.
7. Otto W.R., Nanchahal J., Lu O.L. et al. Survival of allogeneic cells in cultured organotipic skin grafts. Plast. Reconstr. Surg., 1995, v. 96, № 1, p. 166–176.
8. Sclafani A.P., McCormick S.A. and Cocker R. Biophysical and microscopic analysis of homologous dermal and fascial materials for facial aesthetic and reconstructive uses. Arch. Facial Plast. Surg., 2002, v. 4, № 3, p. 164–171.

Поступила в редакцию 30.03.10

MORPHO-FUNCTIONAL CHARACTERISTIC OF RAT FIBROBLASTS AFTER CULTURE AND ALLOTRANSPLANTATION INTO THE DERMIS

O.S. Ozerskaya, L.I. Khozhai and A.O. Danilov

In model experiments performed on Wistar rats, morphofunctional characteristics of fibroblasts (obtained from the skin of rat pups 2–4 days after their birth) were studied and their viability was estimated shortly after their allotransplantation into the recipient dermis. The results of the research have shown that the suspension of cells received for transplantation after a long-term culture in synthetic media was represented, mainly, by a population of mature fibroblasts. 3 days after transplantation fibroblasts remained viable and preserved their morphological characteristics. This external similarity to the fibroblasts in suspension was associated with the capacity of these cells to proliferate, as indicated by positive immunocytochemical reaction demonstrating proliferating cell nuclear antigen. Later (after 5 days) some part of the grafted fibroblasts also retained their viability and demonstrated heteromorphism, which was caused, probably, by their gradual differentiation into the fibrocytes. In the central portion of the transplant, the destruction of a part of the grafted cells was noted, that was caused by the disturbance of their trophism in the zone of cell crowding.

Key words: *fibroblasts, dermis, allotransplantation, viability*

Department and Clinic of Skin and Venereal Diseases, Russian Military Medical Academy; Laboratory of Nervous System Ontogenesis, RAS I.P. Pavlov Institute of Physiology; Department of Bone Marrow Transplantation and Biotherapy, N.N. Petrov Scientific Research Institute of Oncology, St. Petersburg