

Криоконсервированные клетки хориона – перспективный объект для биотехнологии

Cryopreservation of Chorion Cells as Prospective Object for Biotechnology

Показана возможность применения криоконсервированных клеток хориона для восстановления участков повреждённого суставного хряща и в терапии ожогов.

Ключевые слова: клеточная терапия, клетки хориона, ожоги, патология суставов.

Показана можливість застосування криоконсервованих клітин хоріона для відновлення ділянок ушкодженого хряща та терапії опіків.

Ключові слова: клітинна терапія, клітини хоріона, опіки, патологія суглобів.

The possibility of cryopreserved chorion cell application for damaged cartilage restoration and burn therapy was demonstrated in experimental investigation.

Key-words: cell therapy, chorion cells, burns, joint pathology.

Развитие клеточной биологии открывает новые перспективы в реконструктивной ортопедии [4], комбустииологии [1] и других областях медицины, связанных с репарацией тканей и органов. Несмотря на достижения и новые разработки консервативных и оперативных методов в ортопедии, вопрос восстановления поврежденного суставного хряща далек от решения. Ожоги были и остаются серьезной медицинской и социальной проблемой, требующей поиска новых эффективных подходов к ее решению.

В данном исследовании изложены данные, касающиеся использования клеток хориона ранних сроков гестации для терапии дефекта суставного хряща и ожогов 3 степени. Представленные результаты являются разделом проводящихся доклинических исследований препарата криоконсервированных клеток хориона (ККХ).

Материалы и методы

Суспензию клеток хориона получали и криоконсервировали по методикам [2, 3].

Исследования суставов выполнены на 24 самках крыс линии Вистар массой 180–200 г. В опыте моделировали дефект суставного хряща без повреждения субхондрального слоя кости. Дефект наносили в дистальном ненагружаемом суставном отделе бедренной кости диаметром 2 мм. На 3-и сутки в полость сустава вводили суспензию ККХ в количестве 10^5 . Контроль: аналогичный дефект с введением 100 мкл физиологического раствора.

Ожоги 3 степени моделировали на самках лабораторных крыс линии Вистар массой 150–180 г одного возраста, которых содержали в одинаковых условиях. Опытная группа получала клеточную терапию с применением ККХ человека в количестве $10^5/\text{см}^2$ на поверхность ожоговой раны на вторые сутки после нанесения ожога. Эффективность лечения оценивали с учетом изменений размера и характеристик ожоговой поверхности, а также показателей количества лейкоцитов в крови (на 3, 10 и 20 сутки). Контрольную группу составляли животные без лечения.

Крыс выводили из эксперимента на 21 сутки. Манипуляции проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными I Национальным конгрессом по биоэтике (20.09.04, г. Киев) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (г. Страсбург, 1985).

Для длительного наблюдения за клетками трансплантата *in vivo* использовали флюоресцентный зонд РКН-26 (Sigma). Детекцию меченых клеток проводили на криостатных срезах толщиной 5 мкм с помощью микроскопа Olympus.

Результаты и обсуждение

Для моделирования экспериментальной патологии сустава была выбрана описанная выше модель, поскольку механические повреждения являются наиболее распространенными причинами

патологий хряща коленного сустава. При этом хрящевая ткань, постоянно подвергающаяся травматизации, раздражению продуктами лизиса, изменению химического состава синовиальной жидкости в условиях нарушенного тканевого обмена, обладает сниженными регенераторными способностями, что обуславливает развитие остеоартроза. Наблюдения показали, что контрольные животные в течение первых 8 дней с момента нанесения дефекта не опирались на оперированную лапу. У животных опытной группы уже через 5 суток наблюдения было отмечено улучшение моторики движения.

У животных контрольной группы через 20 суток после повреждения суставного хряща выявлено увеличенное количество синовиальной жидкости. Дефект суставного хряща был частично наполнен тканью желтого цвета. Микроскопически дефект суставного хряща был заполнен гранулярной соединительной тканью с признаками формирования синовиального пласта с ворсинками на его поверхности. Поверхность регенерата неровная, матрикс дезорганизован, особенно в поверхностной и средней зонах, что проявляется в его расслоении. Клеточный состав регенерата представлен преимущественно веретенообразными клетками, в которых наблюдаются признаки дистрофии и некроза. Количество клеток неоднородное в разных отделах; более плотно они располагаются в глубокой зоне и местами в поверхностной. В участках невредимого материнского хряща местами наблюдается отслоение ткани регенерата.

В опытной группе патологических изменений со стороны капсулы и синовиальной оболочки не выявлено. Микроскопически дефект суставного хряща был полностью заполнен гиалиноподобной хрящевой тканью с ровной, однородной поверхностью. Местами поверхностная зона регенерата приобретала признаки фиброзной ткани. Клеточный состав регенерата представлен клетками, которые морфологически приближаются к клеткам гиалинового хряща. Количество клеток увеличено, неоднородно в разных отделах, более плотно они располагались в глубокой зоне и местами на поверхности. В участках невредимого материнского хряща местами наблюдалось отслоение ткани регенерата.

У животных, которым были трансплантированы меченые клетки, через 21 сутки после нанесения дефекта в криостатных срезах обнаруживали клетки с донорской меткой. Меченые клетки, которые флюоресцировали в красной зоне спектра, были расположены непосредственно над зоной дефекта равномерным компактным конгломератом. В некоторых случаях наблюдали диффузное расположение трансплантированных клеток в участках поврежденной хрящевой ткани.

Изучение ранозаживляющей активности ККХ на модели ожоговых ран крыс показало, что на 3-и сутки после нанесения ожога площадь раны в контрольной группе составляла $7,2 \pm 0,6$ см². Площадь ожоговой поверхности животных, которых лечили ККХ, была значительно меньше и составляла $5,6 \pm 0,3$ см². При этом не отмечалось гнойного и сукровичного отделяемого из ран в отличие от ожогов животных контрольной группы. На 10-е сутки площадь ожогов в контрольной группе животных уменьшалась незначительно и равнялась $6,3 \pm 0,5$ см². Площади ожоговой поверхности, на которые наносили ККХ, была в 5 раз меньше контроля и в среднем составляла $0,8 \pm 0,1$ см². Раны были чистые без струпа. На 20-е сутки площадь ожоговой поверхности контрольных животных уменьшилась до $1,4 \pm 0,3$ см², что почти в 5 раз меньше в сравнении с соответствующими показателями на 10 сутки. У животных, которые подвергались терапии, раны практически отсутствовали. На месте ожога была молодая кожа с почти полной эпителизацией. Площади ожоговой поверхности животных, которых подвергали лечению, были в 7 раз меньше площади ожога контрольных животных.

Содержание количества лейкоцитов в крови – один из показателей воспаления. Норма у крыс составляет $15,5-16,5 \times 10^9$ клеток/л. В результате проведенных исследований было установлено, что на 3 сутки после нанесения ожога в крови контрольных животных содержалось $44,6 \pm 2,3 \times 10^9$ клеток/л, что в 2,7 раз превышало норму. В группе, где проводилось лечение ККХ, эти показатели составляли $21,1 \pm 2,3 \times 10^9$ клеток/л.

На 10 сутки количество лейкоцитов уменьшилось практически в 2 раза относительно контрольных значений, что свидетельствовало об уменьшении воспаления. На 20 сутки лейкоциты в контроле продолжали оставаться выше нормы, тогда как в опытной группе их количество нормализовалось, что указывало на завершение раневого процесса. Гистологические исследования (не представлены) подтвердили полученные результаты.

Выводы

Введение в зону дефекта сустава культуры ККХ приводит к формированию гиалиноподобной хрящевой ткани в отличие от контрольной группы. Показано, что введенные донорские клетки встраиваются в поврежденную архитектуру хряща и оказывают содействие воспроизведению дефекта, что положительно влияет на ход репаративного процесса.

Применение препарата ККХ при экспериментальных термических ожогах 3 степени у крыс привело к хорошему терапевтическому эффекту.

Было выявлено сокращение сроков эпителизации ран, наблюдалась положительная динамика планиметрических показателей и содержания лейкоцитов в крови животных в сравнении с контролем.

Полученные данные позволяют рассматривать ткань хориона как потенциальный источник при создании запасов криоконсервированных клеток для коррекции определенных патологических состояний.

Вероятно, терапевтическая эффективность ККХ как оптимизаторов тканевой регенерации обусловлена как мощным пролиферативным потенциалом, высокой пластичностью и низкой иммуногенностью клеток, так и активизацией процессов синтеза, продуцированием ряда гормонов, а также факторов роста, стимулирующих пролиферацию всех типов клеточных элементов, участвующих в процессе регенерации. Положительные результаты, которые мы получили при терапии с помощью ККХ моделей двух таких социально значимых патологий, как заболевания суставов и ожоги, позволяют рекомендовать к дальнейшей работе предложенный препарат.

Автор искренне благодарит Е.П. Жуликову, Н.А. Волкову и И.А. Засаднюка за оказанную плодотворную помощь.

Литература

1. *Золотовицкая Н.Н., Колсанов А.В., Волова Л.Т., Орлов Е.В.* Экспериментально-клиническое обоснование применения культуры фибробластов в лечении рубцовых дефектов кожи. Инновационные технологии в трансплантации органов, тканей и клеток // Материалы Всерос. конф. Россия, Самара, 18-20 июня 2008.– С.177–180.
2. *Патент №64540А, МПК⁷А61К 35/48, Україна.* Препарат «Ембріогель» для зовнішнього застосування та спосіб його отримання / О.І. Гончарук, С.В. Коцїй, Т.П. Петренко, Г.О. Гапон, О.Б. Ревенко, В.І. Грищенко. Заявл. 24.06.03. Опубл. 16.02.2004. Бюл.№2, С. 4.42.
3. *Патент №58997А, МПК⁷А01N1/02, Україна.* Спосіб криоконсервування гемопоетичних клітин / В.І. Грищенко, В.П. Семиноженко, О.Ю. Петренко, А.І. Тарасов, Ю.О. Петренко, В.П. Грищук, Ю.А. Дьомін. Заявл. 03.12.02. Опубл. 15.08.03. Бюл. №8. С. 4.9.
4. *Vacanti C.A., Vacanti J.P.* Tissue engineering in orthopedic surgery// Orthopedic Clinics of North America.– 2000.– Vol. 31, N3.– P. 351–356.

Поступила 23.07.2008