

С. И. Третьяк¹, А. В. Жура¹, В. Я. Хрыщанович²,
Ж. А. Ибрагимова¹, Т. С. Колесникова¹, Е. В. Ходосовская¹,
А. М. Неровня¹, Н. В. Ивинская¹

ВЛИЯНИЕ АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ВОСПАЛИТЕЛЬНУЮ РЕАКЦИЮ ПРИ ТРАВМЕ ПАРИЕТАЛЬНОЙ БРЮШИНЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»¹,
ГУО «Белорусская государственная академия последипломного образования»²

В статье приведены результаты экспериментального исследования о влиянии локальной трансплантации аллогенных мезенхимальных стволовых клеток при травме париетальной брюшины. Миграция клеток изучена посредством окраски флуоресцентным красителем РКН26. Было установлено, что местная аппликация с применением носителя в виде геля или в виде пленки позволяет сохранить высокую концентрацию стволовых клеток в зоне повреждения брюшины с незначительной миграцией в селезенку на 7 сутки. Было отмечено моделирование воспалительной реакции посредством уменьшения уровня медиаторов воспаления ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α , TGF- β , как в ранние, так и в поздние сроки. Выявленные особенности позволили обосновать возможность применения локальной клеточной трансплантации аллогенных мезенхимальных стволовых клеток при повреждениях брюшины для купирования воспаления, ускорения репарации и, соответственно, предупреждения спайкообразования.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, перитонеальные спайки, медиаторы воспаления.

**S. I. Tratsyak, A. V. Zhura, V. J. Khryshchanovich,
Zh. A. Ibragimova, T. S. Kolesnikova, E. V. Khodosovskaya,
A. M. Nerovnya, N. V. Ivinskaya**

THE INFLUENCE OF ALLOGENEIC STEM CELLS TO INFLAMMATORY RESPONSE IN PARITEAL PERITONEUM INJURY IN EXPERIMENT

The experimental findings of influence of allogeneic stem cells transplantation in a parietal peritoneum trauma are shown in the issue. Stem cells migration was investigated by PKH-26 red fluorescent cell linker that, as was shown, allows stable and longstanding coloration. It was found that in local application stem cells persist in the injured area with insignificant migration to splenic tissue on 7th day. To prevent the stem cells migration pectin-based scaffolds or alginate hydrogel should be used as a matrix for the cells transplatnation. The level of inflammatory mediators IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , and TGF- β was decreased both in early and late periods after the transplantation. The obtained results make possible usage of local stem cells transplantation in peritoneal injuries to decrease inflammation, improve peritoneal healing and reduce adhesion formation accordingly.

Key words: mesenchymal stem cells, peritoneal adhesions, inflammatory mediators.

Восстановление брюшины после ее повреждения – это сложный многокомпонентный процесс с четкой временной зависимостью, нарушения которого приводит к образованию спаек брюшины и множеству связанных с ними осложнений. В течение нескольких минут в поврежденном участке развивается воспалительный процесс с активацией тканевого коагуляционного каскада и агрегацией тромбоцитов. Происходит усиление кровотока, расширение артериол, повышение проницаемости сосудистой стенки, миграция нейтрофилов и макрофагов, которые синтезируют медиаторы воспаления, такие как ИЛ-1β (интерлейкин), ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО-α (фактор некроза опухоли), TGF-β (трансформирующий фактор роста), что приводит к активации воспалительного каскада и выпадению фибрина [3, 4].

В последующем запускаются процессы фибринолиза, и в случае полного лизиса фибринового сгустка спайки брюшины в области повреждения не образуются [6]. При этом мезотелизация повреждения начинается с множества мелких островков репарации и заканчивается к 3–5 дню. Учитывая множественность очагов репарации мезотелия, заживление небольших и крупных дефектов брюшины происходит за одинаковое время [15]. Репарация может быть замедлена слабым фибринолизом, присутствием некротических тканей, ишемией, оксидативным стрессом (вследствие сосудистого повреждения или ушивания), инфекцией.

Если фибринолиза и репарации в указанные сроки не происходит, в фибриновый матрикс проникают фибробласты, и с 5 суток запускаются процессы ангиогенеза вне независимости от типа и этиологии повреждения брюшины [8]. Стимуляторами ангиогенеза являются факторы роста эндотелия и фибробластов, эпидермальный, тромбоцитарный, трансформирующий (TGF), инсулиноподобный факторы роста, окись азота [3]. При этом исходного восстановления брюшины не происходит, и в этой зоне возникает спаечный процесс.

В последнее время были показаны возможности применения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в репарации различных повреждений [9, 11]. Введение МСК уменьшает процессы фиброобразования в сердце, легких, печени и почках, обладают иммунологической привилегированностью, возможностью самообновления, иммуномодулирующими свойствами. Однако механизмы, позволяющие улучшить репарацию, остаются малоизученными по настоящее время. Некоторые исследователи указывают на преобладание регуляторного действия МСК – ангиогенного, митогенного, цитопротективного, противовоспалительного, противоапоптозного, иммуносупрессивного и антифиброгенного факторов, что позволяет говорить о «клеточной терапии». Вопрос дифференцировки клеток в очаге поражения остается открытым и спорным и в настоящее время [12].

Цель исследования

Определить в эксперименте влияние локальной трансплантации аллогенных мезенхимальных стволовых клеток на течение воспалительного ответа и репарацию при повреждении париетальной брюшины.

Материалы и методы

Приготовление клеточного трансплантата. Для трансплантации использовали аллогенные мезенхимальные стволовые клетки полученные из жировой ткани. Для этого проводили ее забор из подкожной жировой клетчатки крыс под местной анестезией. Культивирование проводили в полной питательной среде Дульбекко в модификации Игла с добавлением фетальной телячьей сыворотки и антибиотика до 3–4 пассажа. Фенотипирование клеток и определение их принадлежности к мезенхимальным стволовым клеткам выполняли при лазерной проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител к CD90 и CD105. В последующем проводили окраску полученной клеточной культуры флуоресцентным красителем PKH-26 (производство Sigma-Aldrich). С целью оценки степени окрашивания клеточной культуры и ее стойкости проводили микроскопию клеточной культуры флуоресцентным микроскопом с длиной световой волны 530–550 нм ежедневно в течение 28 суток.

В качестве носителя для выполнения трансплантации МСК применяли альгинатный гидрогель и пленку на основе пектина. В первом случае культуру окрашенных флуорохромом клеток перемешивали с 7 % альгинатным гидрогелем в количестве 1,5 млн клеток/1 мл гидрогеля. Для изготовления пленочного трансплантата применяли 3 % пектиновый гидрогель с молекулярным весом ~ 89 000, с добавлением глицерина, замораживали, подвергали лиофильной сушке и сшивали раствором хлорида кальция. Предварительно окрашенные МСК в количестве 1,5 млн в 1 мл физиологического раствора наносили на мембрану непосредственно перед трансплантацией.

Трансплантация меченных флуорохромом аллогенных мезенхимальных стволовых клеток в область дефекта брюшины. Для формирования дефекта париетальной брюшины применяли разработанную ранее модель [2]. Под общей анестезией выполняли лапаротомию и формировали дефект париетальной брюшины боковой стенки живота диаметром 2 см. На сформированный дефект наносили приготовленный 1 мл 7 % альгинатного гидрогеля с 1,5 мл окрашенных флуорохромом МСК (группа 1, n = 8) или трансплантата на основе пектиновой пленки с 1,5 мл МСК (группа 2, n = 8).

С целью оценки возможной миграции стволовых клеток животных выводили из эксперимента на 1, 3 и 7 сутки путем введения летальной дозы тиопентала натрия. Далее проводили забор биологических образцов, включавших дефект передней брюшной стенки, участок печени и участок селезенки для приготовления криосрезов без дополнительного окрашивания. Микропрепараты были изучены на флуоресцентном микроскопе Olympus IX-51 (Япония) с длиной световой волны 530–550 нм.

Оценка воспалительной реакции. В следующей серии эксперимента для изучения влияния аллогенных МСК на степень воспалительной реакции и на процессы репарации 42 крысам наносили травму париетальной брюшины по вышеописанной методике. На область сформированного дефекта наносили

1 мл 7 % альгинатного гидрогеля с 2 мл аллогенных МСК (основная группа, $n = 27$) или 1 мл 7 % альгинатного гидрогеля без добавления МСК (группа сравнения, $n = 15$). Забор крови проводили на 6–8 сутки (ранний период) и 14–17 сутки (поздний период) путем декапитации животных. Было проведено определение уровней ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, которые относятся к провоспалительным цитокинам и TGF- β 1, который показывает в том числе выраженность репаративных процессов. Полученные данные представлены медианой, 25 и 75 квартилями – Me(25–75).

Результаты и обсуждение

Устойчивость окраски флуоресцентным красителем. Для определения устойчивости окраски и возможности ее сохранения при пассировании клеток проводили флуоресцентную микроскопию культуры клеток сразу после окраски и в течение 28 дней. Через 3 часа после окраски получено яркое свечение клеток (рис. 1).

С течением времени интенсивность окраски культуры МСК уменьшалась (рис. 2) и на 28 сутки в культуральном флаконе флуоресцировали только единичные клетки (рис. 3).

Таким образом, применение флуоресцентного красителя РКН-26 в культуре мезенхимальных стволовых

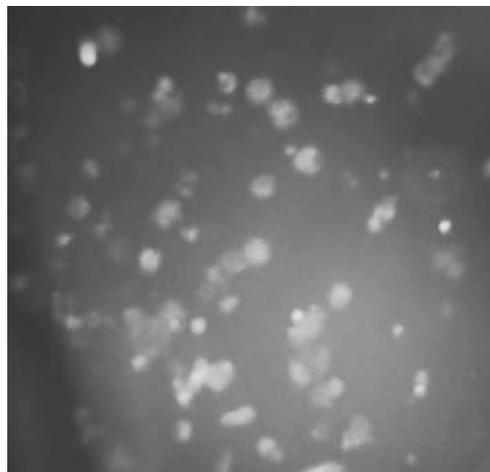


Рисунок 1. Культура МСК, меченных красителем РКН-26, через 3 часа после окраски. Флуоресцентная микроскопия, ув $\times 20$

клеток приводит к устойчивому и достаточно длительному их окрашиванию, что позволяет проводить исследование по меньшей мере в течение 28 суток.

Оценка миграции клеток. После выведения из эксперимента на первые сутки у животных 1-й группы (трансплантат на основе 7 % альгинатного гидрогеля и 1,5 млн МСК) и 2-й группы (трансплантат на основе

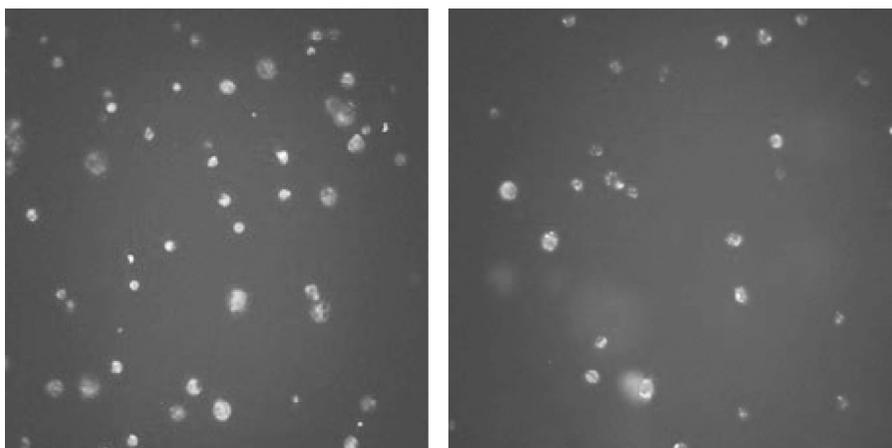


Рисунок 2. Культура МСК, меченных красителем РКН-26, через 24 часа (слева) и 4 суток (справа) после окраски. Флуоресцентная микроскопия, ув $\times 10$

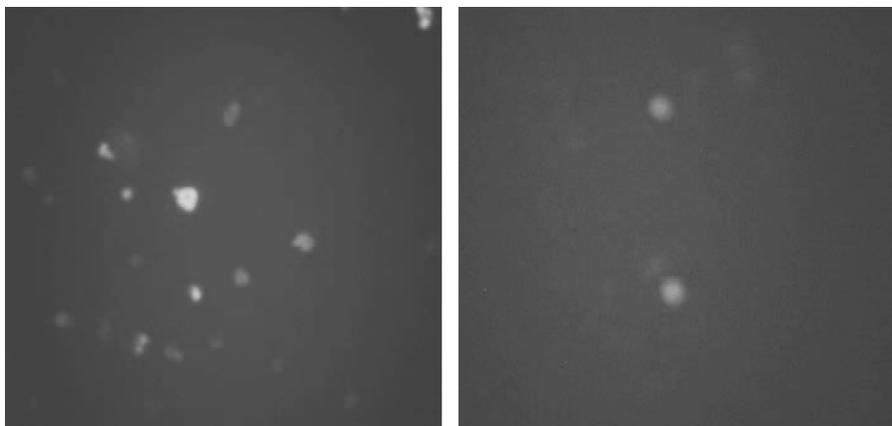


Рисунок 3. Культура МСК, меченных красителем РКН-26, через 7 суток (слева) и 18 суток (справа) после окраски. Флуоресцентная микроскопия, ув $\times 20$

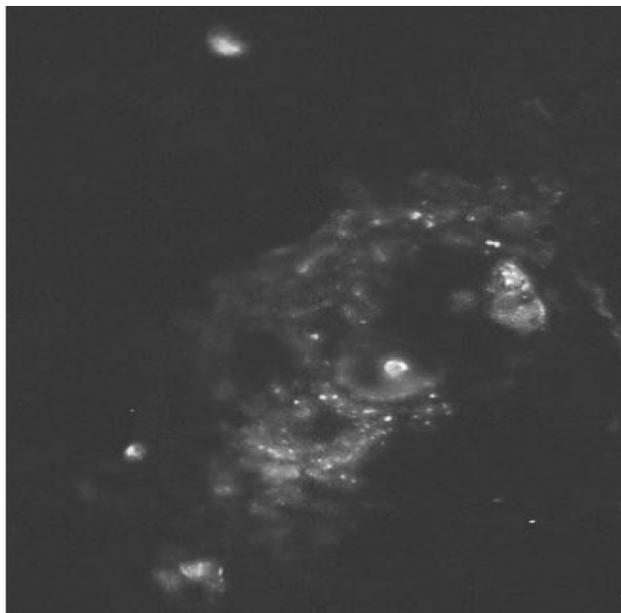


Рисунок 4. Трансплантированные МСК у животного 2-й группы на дефекте брюшины на 1-е сутки после трансплантации. Флуоресцентная микроскопия, ув $\times 20$

пектиновой пленки и 1,5 млн МСК) при флуоресцентной микроскопии были обнаружены скопления окрашенных МСК ЖТ в зоне дефекта париетальной брюшины (рис. 4). Визуальных различий распределения и количества клеток у животных 1-й и 2-й групп выявлено не было.

При исследовании микропрепаратов печени и селезенки в первые сутки следов трансплантированных МСК выявлено не было. При дальнейшем изучении гистологических препаратов установлено, что трансплантированные МСК присутствуют в зоне дефекта брюшной стенки как на 3, так и на 7 сутки. При этом отличий в количестве клеток у животных с трансплантатом на основе геля и пленки выявлено не было (рис. 5).

Было установлено, что на 7 сутки происходит миграция единичных пересаженных мезенхимальных стволовых клеток и появление их в ткани селезенки (рис. 6), возможно вследствие фагоцитоза. При этом сохраняется их высокая концентрация в зоне дефекта брюшной стенки.

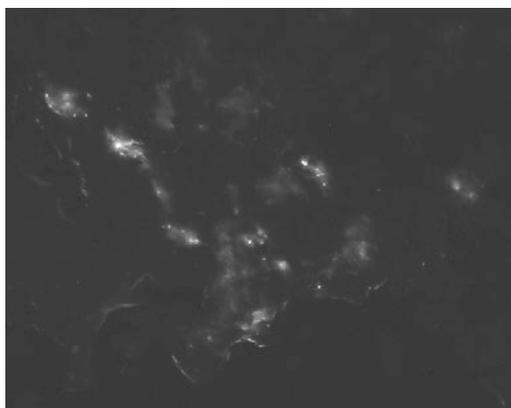


Рисунок 5. Трансплантированные МСК у животного 1-й группы на дефекте брюшины на 7 сутки после трансплантации. Флуоресцентная микроскопия, ув $\times 10$

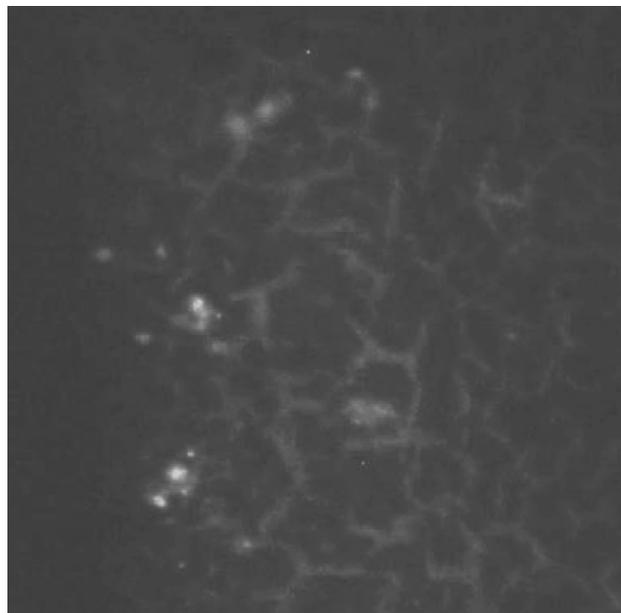


Рисунок 6. Трансплантированные МСК у животного 1-й группы в паренхиме селезенки на 7-е сутки после трансплантации. Определяется аутолюминисценция ткани селезенки. Флуоресцентная микроскопия, ув $\times 10$

Таким образом установлено, что после трансплантации культуры МСК в область дефекта париетальной брюшины сохраняется их высокая концентрация в очаге поражения в течение всего периода наблюдения с минимальной миграцией в селезенку на 7 сутки. Выявленные особенности свидетельствуют об отсутствии выраженного иммунного ответа на трансплантацию культуры аллогенных клеток и их тропность к поврежденной ткани.

Изучение влияние локального введения МСК на воспалительную реакцию. При изучении образцов крови было установлено, что у животных основной группы (при применении МСК) в ранний срок отмечается более низкий уровень всех провоспалительных медиаторов – ИЛ-6 = 2,2(0,6–2,8) пг/мл; ИЛ-1 = 22(19–29) пг/мл; ФНО- α = 2,5(0,7–4,2) – по сравнению с животными группы сравнения (без применения МСК): ИЛ-6 = 3,8(2–4,2) пг/мл; ИЛ-1 β = 37(32–47) пг/мл; ФНО- α = 4,1(2,1–5,4). Также отмечен более высокий уровень трансформирующего фактора роста, что может указывать на ускоренную репарацию повреждения при введении МСК (TGF = 79,5(69–91,8) нг/мл в основной и 70,5(66–72) нг/мл в контрольной группе соответственно), однако различия были недостоверны.

При изучении результатов в поздний срок выведения было установлено, что показатели воспалительной реакции практически не отличались в обеих группах, но в группе без введения МСК сохранялся более высокий уровень ИЛ-6 – 3,95(2,8–4,4) пг/мл по сравнению с основной группой – 2(0,2–2,2) пг/мл, что свидетельствовало о продолжающемся воспалении. При этом в поздний срок уровень трансформирующего фактора роста у группы с применением МСК был ниже, вследствие более быстрого заживления дефекта. Эффект снижения уровня трансформирующего фактора роста

оказывает благоприятное влияние в отношении предупреждения образования спаек, поскольку его высокий уровень приводит к повышенной миграции фибробластов и ускоренному неопластическому ангиогенезу.

В ближайшее время после травмы поврежденный участок брюшины покрывается макрофагами и «тканевыми регенераторными клетками», которые обеспечивают усиление фибринолиза – одного из ключевых механизмов предупреждения образования спаек. Эти клетки начинают элиминировать детрит, в то время как под влиянием тромбоцитарных ростовых факторов происходит миграция и пролиферация фибробластов и мезотелиальных клеток [14].

Рост клеток мезотелия и начало восстановления дефекта брюшины начинается в течение 24 часов, пролиферация фибробластов на 3 день и неопластический ангиогенез – на пятый. Однако по-прежнему не установлено являются ли эти регенераторные клетки фибробластами, макрофагами или стволовыми клетками, и их источник – перитонеальная жидкость, мезотелий, субмезотелиальная соединительная ткань, эндотелий сосудов или клетки крови [1]. Если подлежащий к повреждению участку брюшины орган неподвижен, например, при разрыве кишечника, происходит повреждение его мезотелия в результате воспалительного процесса и адгезии за счет фибрина. Процессы, происходящие при этом, регулируются целым каскадом активных субстанций и цитокинов. В формировании спаек перитонеальных поверхностей определенную роль играют ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО- α [5]. Среди большого количества различных ростовых факторов, обладающих способностью усиливать и ускорять процессы раневого заживления, трансформирующий ростовой фактор (transforming growth factor, TGF- β) показывает наибольший спектр активности. Роль этого фактора в процессах репарации, в том числе брюшины, достаточно высока. Однако его повышенный уровень оказывает скорее негативный эффект, приводя к замедлению фибринолиза, усилению ангиогенеза и спайкообразованию [7, 13].

При изучении биохимических образцов крови экспериментальных животных нами было выявлено положительное влияние трансплантации МСК на процессы заживления дефекта париетальной брюшины: снижение уровня провоспалительных цитокинов, уменьшение воспалительной реакции, стимуляция репаративных процессов, как в ранний, так и в поздний сроки после трансплантации.

При системном введении *in vivo* описана способность МСК к фиксации в очаге поражения (homing), как было показано на многих моделях [9, 11]. В нескольких научных публикациях при экспериментальном системном введении стволовых клеток животным с травмой париетальной брюшины их тропности к очагу поражения выявлено не было, при этом большинство клеток обнаруживали в легочной ткани [10]. Указанная особенность была связана с меньшим диаметром легочных капилляров (14 мкм) по сравнению с размером стволовой клетки (20–30 мкм), при этом легочная паренхима действовала как своеобразный фильтр. При локальном интраперитонеальном введении отме-

чалась аккумуляция клеток в паренхиме печени и селезенки, без их присутствия в поврежденной брюшной стенке [12]. Однако авторы проводили введение клеточной взвеси без применения носителей. Вместе с тем, использование матрикса может позволить предотвратить преждевременную элиминацию клеток из очага поражения. В результате эксперимента нами было установлено, что применение носителя, как в виде геля, так и в виде пленки, позволяет избежать миграции клеток из зоны аппликации. Лишь в поздние сроки единичные клетки были обнаружены в селезенке и отсутствовали в печени. Полученные данные находятся в противоречии с зарубежными литературными данными, в которых авторы отмечали массивную клеточную миграцию из зоны поражения, но, в тоже время, согласуются с результатами отечественных исследователей [1]. Длительное присутствие пересаженных МСК в области дефекта париетальной брюшины продлевает их клеточный терапевтический эффект.

Таким образом, выявленные особенности позволяют обосновать возможность применения локальной клеточной трансплантации с целью ускорения репарации поврежденной брюшины и уменьшения процессов спайкообразования.

Выводы

1. Окраска мезенхимальных стволовых клеток флуоресцентным красителем РКН-26 позволяет получить устойчивое и длительное окрашивание клеточной культуры, что делает возможным оценку поведения пересаженных клеток после трансплантации;

2. Применении носителей для трансплантации МСК, как в виде пленки, так и в виде геля, на область дефекта париетальной брюшины позволяет сохранить их высокую концентрацию в зоне повреждения и предупредить миграцию;

3. Применение МСК снижает воспалительную реакцию как в раннем, так и в позднем периоде после травмы париетальной брюшины, и ускоряет заживление повреждения, что является предпосылкой для предотвращения спайкообразования.

Литература

1. Богдан, В. Г. Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани при моделировании дефекта брюшной стенки: морфологические особенности тканевой реакции / В. Г. Богдан, И. А. Швед // Военная медицина. – 2013. – № 1. – С. 94–100.
2. Жура, А. В. Экспериментальная модель перитонеальных спаек / А. В. Жура, С. И. Третьяк, В. Я. Хрыщанович, Ж. А. Макаревич // Новости хирургии. – 2017. – № 4. – С. 333–339.
3. Спаечная болезнь брюшной полости / А. А. Андреев [и др.] // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2017. – Т. 10, № 4. – С. 320–326.
4. *Chronological evaluation of inflammatory mediators during peritoneal adhesion formation using a rat model* / M. Binnebösel [et al.] // *Langenbecks Arch Surg.* – 2011. – Vol. 396. – P. 371–378.
5. *Herrick, S. E. Mesothelial progenitor cells and their potential in tissue engineering* / S. E. Herrick, S. E. Mutsaers // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2004. – Vol. 36, № 4. – P. 621–642.

❑ Оригинальные научные публикации

6. *Intra-abdominal Adhesions* / D. Brüggmann, [et al.] // *Dtsch Arztebl Int.* – 2010. – Vol. 107. – P. 769–775.

7. *Involvement of transforming growth factor-b3 and beta-glycan in the cytoarchitecture of postoperative omental adhesions* / V. Go´mez-Gil [et al.] // *J. Surg. Res.* – 2014. – Vol. 187, № 2. – P. 699–711.

8. *Koninckx, P. R. Role of the peritoneal cavity in the prevention of postoperative adhesions, pain, and fatigue* / P. R. Koninckx, V. V. Gomel, A. Ussia, L. Adamyan // *Fertil Steril.* – 2016. – Vol. 106, № 5. – P. 998–1010.

9. *Magnus, T. Stem cell myths* / T. Magnus, Ying Liu, Graham C. Parker, Mahendra S. Rao // *Philos Trans R. Soc Lond B Biol Sci.* – 2008. – Vol. 363. – P. 9–22.

10. *Mesenchymal Stem Cells Attenuate Peritoneal Injury through Secretion of TSG-6* / N. Wang [et al.] // *Plos One* [Electronic resource]. – 2012. – Vol. 7, № 8. – Mode of access: <http://www.plosone.org>. – Date of access: 27.02.2015.

11. *Mutsaers, S. E. The mesothelial cell* / S. E. Mutsaers // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2004. – Vol. 36, № 1. – P. 9–16.

12. *Novel mechanism for mesenchymal stem cells in attenuating peritoneal adhesion: accumulating in the lung and secreting tumor necrosis factor α -stimulating gene-6* / N. Wang [et al.] // *Stem Cell Res Ther* [Electronic Resource]. – 2012. – Vol. 51. – Mode of access: <http://stemcellres.com/content/3/6/51>. – Date of access: 02.03.2015.

13. *Peritoneal adhesion formation and reformation tracked by sequential laparoscopy: optimizing the time point for adhesiolysis* / V. Go´mez-Gil [et al.] // *Surgery.* – 2010. – Vol. 147, № 3. – P. 378–391.

14. *The origin of regenerating mesothelium: a historical perspective* / S. E. Mutsaers [et al.] // *Int. J. Artif. Organs.* – 2007. – Vol. 30, № 6. – P. 484–494.

15. *Tomino, Y. Mechanisms and interventions in peritoneal fibrosis* / Y. Tomino // *Clin Exp Nephrol.* – 2012. – Vo. 16. – P. 109–114.