

УДК 616-001.17-092.9:57.086.83

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДЕРМАЛЬНЫХ АУТОФИБРОБЛАСТОВ

Р.Р. Тухватшин, Е.В. Самаева

Представлены данные о культивировании аутофибробластов с применением обогащенной тромбоцитами плазмы и препарата из корня солодки "Глицирам". Отмечено, что за небольшой промежуток времени можно получить наибольшую массу жизнеспособных клеток.

Ключевые слова: аутофибробласты; обогащенная тромбоцитами плазма; "Глицирам"; культивирование.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF METHODS FOR CULTIVATION OF DERMAL AUTOFIBROBLASTS

R.R. Tukhvatshin, E.V. Samaeva

There are data on cultivation of autofibroblasts with the use of platelet-rich plasma and products from licorice "Gliciram". It is noticed that it allows for a short period of time to get the greatest mass of viable cells.

Key words: autofibroblasts; platelet-rich plasma ; "Gliciram"; cultivation.

Актуальность. На современном этапе проблема ожогов является очень актуальной. По данным ВОЗ, термические поражения занимают 3-е место в структуре общего травматизма среди травм мирного времени [1, 2]. При этом существенная роль в течении и исходах термической травмы, развитии инфекционных осложнений ожоговой болезни и сроках выздоровления больных отводится местному лечению ожоговых ран [3]. Сегодня решение проблемы дефицита неповрежденной кожи на фоне обширных, а тем более критических для жизни ожогов связано с использованием трансплантатов, полученных на основе культивированных клеток кожи человека (аутофибробластов) [4].

Патогенетическая суть этой методики определяется стимулирующим влиянием трансплантированных на рану аутофибробластов на пролиферацию эпидермоцитов, сохранившихся в ране, и эпидермоцитов сетчатых лоскутов аутокожи [5, 6]. При этом преимущество имеет использование аутоклеток: наблюдается длительный клинический эффект, исключен риск заражения пациента инфекционными агентами, а также риск развития аллергических реакций, не возникает трудностей с поиском подходящих доноров. Пересадку лучше производить в первые 3-е суток после ожоговой травмы, когда раневая по-

верхность хорошо защищена иммунными клетками от микробной инвазии [7]. Для осуществления этого необходимо добиться получения из биоптата кожи пациента наибольшее количество жизнеспособных клеток за первые 3-е суток от момента получения травмы, используя при этом недорогие и доступные стимуляторы роста клеток.

Нами предложена методика выращивания культуры аутофибробластов с применением обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) и препарата корня солодки "Глицирам". Эта методика основывается на том, что ОТП – это биологический продукт, получаемый из аутологичной крови, содержащий высокое число тромбоцитов в небольшом количестве плазмы (1 млн/мкл), в котором содержится в 3–5 раз больше факторов роста, чем в цельной крови, в том числе стимулирующих рост фибробластов [8, 9].

Преимущество применения ОТП, полученной из периферической крови пациента, в отличие от рекомбинантных ростовых факторов заключается в локальном многофакторном воздействии высококонцентрированного комплекса биологических медиаторов – факторов роста, которые находятся в естественных соотношениях и активном взаимодействии на аутологичные ткани путем сложного

и многоступенчатого регулирования каскада ключевых клеточных реакций (хемотаксис, миграции, митогенез, дифференцировка и др.), направленных на регуляцию и стимуляцию процессов естественной регенерации [8, 9]. Кроме того ОТП, полученная из собственной крови пациента биосовместима, не вызывает иммунных реакций, безопасна с точки зрения переноса трансмиссивных заболеваний.

Преимуществом применения препарата корня солодки “Глицирам” является его природное происхождение. Как правило, препараты природного происхождения при достаточно высокой эффективности даже при длительном их использовании вызывают минимальные побочные действия, оказывают эффект в весьма низких концентрациях, отсутствует токсичность. “Глицирам” – аммониевая соль глицирризиновой кислоты, выделенная из корней Солодки голой, обладающая действием, напоминающим действие дезоксикортикостерона и кортизона, которые также способствуют росту и дифференцировке аутофибробластов [10].

Целью работы является разработка методики, позволяющей получить наибольшее общее количество дермальных аутофибробластов, обладающих высокой жизнеспособностью, за небольшой промежуток времени (3 суток).

Материалы и методы исследования. Эксперименты проводились на лабораторных беспородных крысах обоего пола массой 150–200 граммов. Под кетаминным наркозом у крысы с наружной поверхности бедра, после удаления шерсти, брали биопсию кожи 2×3×4 мм толщиной 0,2–0,3 мм (эпидермис и сосочковый слой дермы).

ОТП получали из левого желудочка сердца после предварительного вскрытия грудной клетки под кетаминным наркозом. Кровь гепаринизировалась (100 Ед на 1 мл), затем центрифугировалась. На первом этапе после центрифугирования при 1300 об/мин в течение 10 минут. Плазму, содержащую тромбоциты, отделяли от эритроцитов и лейкоцитов. Вторичное центрифугирование при 4000 об/мин в течение 10 минут приводило к агрегации тромбоцитов на дне пробирки. Супернатант – бедная тромбоцитами плазма удалялась.

Питательная среда для культивирования клеток – DMEM. При культивировании фибробластов использовались следующие методики: культивирования фибробластов с применением 10%-ной фетальной бычьей сыворотки (FBS) без трипсинизации (1-я группа – контроль); с применением 10 % FBS с предварительной трипсинизацией (0,25%-ный раствор трипсина) (2-я группа); с применением 10 % FBS и 20 % ОТП (3-я группа); с применением 10%FBS + 20% ОТП + “Глицирам” (4-я

группа); с применением 10%FBS + 20% стволовые клетки (СК) в плазме крови (5-я группа).

Стволовые клетки получали после предварительной стимуляции костного мозга Нейпогеном в стандартной дозировке. Сконцентрированы на сепараторе клеток Fresenius (получены в Кыргызском научном центре гематологии, подсчет на аппарате Abacus Junior 30ND).

Контроль роста культуры проводился на 3-и сутки. Оценивали ее по следующим критериям: макроскопический осмотр культуральных флаконов с содержимым, микроскопия и фотографирование (микроскоп “ЛЮМАМ”, адаптированный под фотосъемку на зеркальной цифровой фотокамере SONY DSLR-A100 BODY), окраска гематоксилин-эозином, подсчет клеток в камере Горяева после предварительной окраски 0,4%-ным раствором трипанового синего.

Полученный фактический материал подвергали компьютерной обработке с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel с учетом критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. На 3-и сутки от начала культивирования наблюдалась следующая макроскопическая картина. При культивировании дермальных аутофибробластов во всех группах микрофрагменты биоптата (МБ) в той или иной степени фиксировались ко дну культурального флакона (КФ), а в 3-й, 4-й, 5-й группах МБ кожи вместе с форменными элементами крови были связаны между собой пленкой (фибриновой), которая легко отделялась от дна культурального флакона скребком для снятия клеток. Желто-оранжевый цвет среды в этих же группах свидетель-

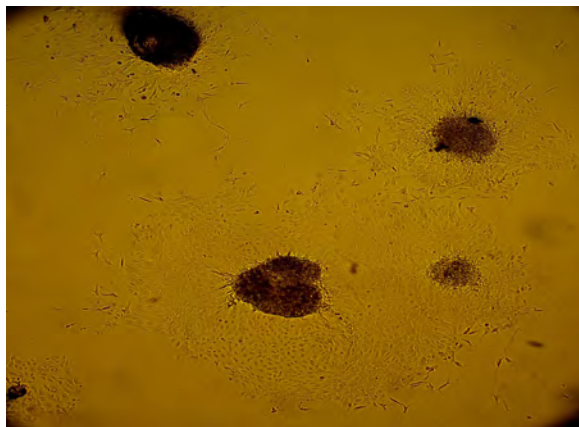


Рисунок 1 – Биопатч кожи, окруженный дермальными аутофибробластами на 3-и сутки культивирования. Об 10×. Ок 16×

Таблица 1 – Макроскопическая характеристика флаконов с культурой клеток

Признаки	1-я гр.	2-я гр.	3-я гр.	4-я гр.	5-я гр.
Цвет среды	Красно-оранжевая	Красно-оранжевая	Желто-оранжевая	Желто-оранжевая	Желто-оранжевая
Прозрачность среды	Прозрачная	Прозрачная	Прозрачная	Прозрачная	Прозрачная
Количество прикрепившихся ко дну КФ МБ	2/3	2/3	Все	Все	Все

Таблица 2 – Среднее количество клеток

Показатели	1-я гр.	2-я гр.	3-я гр.	4-я гр.	5-я гр.
Общее число клеток	29,02± 0,36×10 ⁴	24,28± 0,27×10 ⁴ *	29,58± 0,2×10 ⁴ *	19,66± 0,3×10 ⁴ *	28,8± 0,14×10 ⁴ *
Жизнеспособные клетки	27,48± 0,35×10 ⁴	21,82± 0,26×10 ⁴ *	28,04± 0,19×10 ⁴ *	18,46± 0,19×10 ⁴ *	28,34± 0,13×10 ⁴ *
% жизнеспособных клеток	95	90	95	94	98
Нежизнеспособные клетки	1,54± 0,008×10 ⁴	2,46± 0,009×10 ⁴ *	1,54± 0,007×10 ⁴ *	1,2± 0,08×10 ⁴ *	0,46± 0,007<10 ⁴ *
% нежизнеспособных клеток	5	10	5	6	2

Примечание. (*) – достоверное отличие показателя от значения контрольной группы (P < 0,05).

ствовал об активной жизнедеятельности клеток (таблица 1).

Микроскопически рост клеток наблюдался во всех образцах, но о количестве и качестве культуры можно судить только после подсчета клеток в камере Горяева после предварительного окрашивания 0,4%-ным раствором трипанового синего с целью определения количества жизнеспособных клеток (таблица 2).

Прижизненная фазово-контрастная микроскопия показала, что МБ кожи крысы были окружены

ареолом из дермальных аутофибробластов типичной веретенообразной формы (рисунок 1). При культивировании с участием стволовых клеток дно КФ покрывал слой форменных элементов крови, фибробласты были слабо различимы и представлены в небольшом количестве (рисунок 2).

После фиксации 70°-ным спиртом и окраски гематоксилин-эозином визуализировались дермальные фибробласты веретенообразной и звездчатой формы в виде монослоя. Ядра клеток синие, цитоплазма и межклеточное вещество – розовые (рисунок 3).

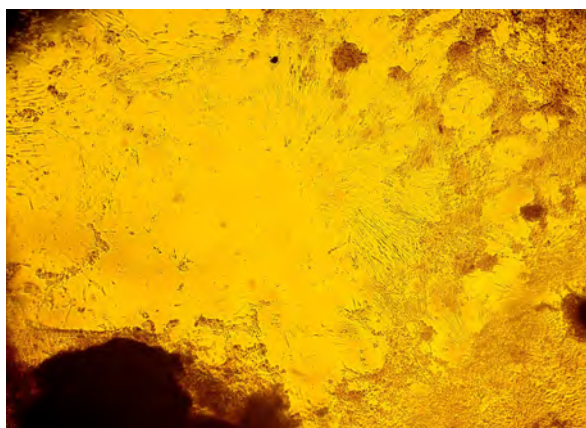


Рисунок 2 – Культивирование дермальных аутофибробластов с применением FBS + стволовые клетки (СК) на 3-и сутки. Об 10×. Ок 8×

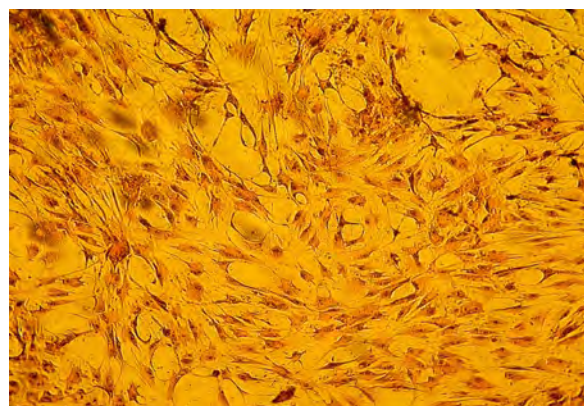


Рисунок 3 – Дермальные аутофибробласты типичной веретеновидной и звездчатой (с отростками) формы. Окраска препарата гематоксилин-эозином. Об 10×. Ок 16×.

Таким образом, анализ 5 различных методик культивирования дермальных аутофибробластов позволил обобщить следующее:

1. Макроскопическая картина в 3-й, 4-й, 5-й группах свидетельствовала об активной жизнедеятельности и отсутствии бактериальной и грибковой зараженности клеток (желто-оранжевый цвет среды, прозрачность среды, максимальное и равномерное прикрепление микрофрагментов биоптата ко дну культурального флакона).
2. Прижизненная фазово-контрастная микроскопия показала наличие роста дермальных аутофибробластов во всех группах вокруг МБ.
3. Подсчет клеток в камере Горяева после предварительной окраски 0,4%-ным раствором трипанового синего позволил определить следующее:
 - наибольшее общее число клеток на 3-и сутки было получено в 1-й, 3-й и 5-й группах;
 - предварительная трипсинизация биопсийного материала увеличивала количество поврежденных клеток до 10 % от общей массы клеток;
 - наименьшее количество поврежденных клеток получено в 5-й группе (около 2 %).

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлено, что методикой, позволяющей получить наибольшее количество клеток, обладающих высокой жизнеспособностью (98 %), за небольшой промежуток времени (3-е суток) является культивирование аутофибробластов в присутствии ОТП и препарата корня солодки “Глицирам”.

Литература

1. Булай П.И. Биологические комплексы для заживления ожогов / П.И. Булай // Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств: Материалы междунар. конф. М., 1995. С. 116–117.
2. Парамонов Б.А. Ожоги: руководство для врачей / Б.А. Парамонов, Я.О. Порембский, В.Г. Яблонский. СПб.: СпецЛит, 2000. 480 с.
3. Ермолов А.С. Биологическая повязка для лечения ожоговых ран IIIA степени / А.С. Ермолов, С.В. Смирнов, В.Б. Хватов // Хирургия. 2008. № 10. С. 4–9.
4. Саркисов Д.С. Аллотрансплантация культивированных фибробластов на незаживающие раны после аутодермопластики / Д.С. Саркисов, Е.В. Глуценко, В.П. Туманов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1991. № 5. С. 542–544.
5. Алексеев А.А. Биотехнологические методы лечения ожогов в России: 20 лет спустя / А.А. Алексеев // Сб. науч. тр. I съезда комбустиологов России. М., 2005. С. 192–194.
6. Жилина Н.М. Сравнительный анализ кожной пластики традиционными методами и с использованием клеточной культуры фибробластов / Н.М. Жилина, В.Б. Иванов, Н.Н. Корень // Вестник новых мед. технологий. 1997. Т. IV. № 1. С. 88–92.
7. Лаврухин Ю.Н. Методы лечения остаточных ран у обожженных / Ю.Н. Лаврухин, Е.В. Челлаков, В.В. Арефьев // Вестник неотложной и восстановительной медицины. 2005. Т. 6. № 2. С. 386–387.
8. Marx R.E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP / R. E. Marx // Implant dentistry. 2001. Vol. 10. № 4. P. 225–228.
9. Афанасьев Ю.И. Гистология / Ю.И. Афанасьев, Н.А. Юрина, Е.Ф. Котовский. М.: Медицина, 2002. 744 с.
10. Путырский И.Н. Универсальная энциклопедия лекарственных растений / И.Н. Путырский, В.Н. Прохоров. М.: Махаон, 2000. 656 с.