

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОЙ ВЗВЕСИ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ НЕИЗМЕНЕННОЙ КОЖИ ПОСТРАДАВШИХ С ОЖГОВОЙ ТРАВМОЙ

Алейник Д.Я.¹, Чарыкова И.Н.¹, Давыденко Д.В.¹, Рубцова Ю.П.¹

¹ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России, Нижний Новгород, e-mail: daleynik@yandex.ru

Проблема восстановления дефектов кожи после ожоговой травмы с помощью аутологичного клеточного материала – одно из перспективных направлений современной регенеративной медицины. Представлены результаты исследования клеточного материала, выделенного из биоптатов неизменной кожи пациентов разного возраста с ожоговой травмой. Клеточную взвесь получали методами тепловой и холодной ферментативной обработки, после которой определяли концентрацию и жизнеспособность клеток. Иммунофенотип клеток взвеси определяли на проточном цитофлуориметре Navios Bectan Coulter. Часть клеток культивировали по стандартному протоколу. Рост культуры контролировали каждые 24 часа до формирования субконфлюэнтного монослоя (70-80%), который фиксировали через 96-144 часа. После чего проводили гистохимическое исследование, используя антитела к поверхностному антигену фибробластов человека – виментину и маркеру клеток эпидермиса – цитокератину. Во взвеси свежeweделенных клеток были представлены и кератиноциты, и фибробласты. Клетки сохраняли жизнеспособность и функциональную активность, так как фиксировалась их выраженная адгезия к пластику, способность к пролиферации и экспрессии типичных маркеров. Характеристики клеток взвеси не зависели от возраста пострадавших. Получен клеточный материал хорошего качества, что открывает перспективы для его клинического применения.

Ключевые слова: альбумин, эритроциты, ожоги, свободнорадикальное окисление, перекисное окисление липидов, микроциркуляция.

CHARACTERISTICS OF THE CELL SUSPENSION ISOLATED FROM INTACT SKIN IN PATIENTS WITH A BURN INJURY

Aleynik D.Ya.¹, Charykova I.N.¹, Davydenko D.V.¹, Rubtsova Yu.P.¹

¹Federal State Budgetary Institution «Privolzhsky Federal Research Medical Centre» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, e-mail: daleynik@yandex.ru

The problem of skin defect recovery after a burn injury by using autologous cell material is one of the challenging branches of modern regenerative medicine. The study presents research results of the cell material isolated from intact skin biopsy samples of patients of different ages with a burn injury. Cell suspension was obtained by methods of heat and cold enzyme treatment, following which cell concentration and vitality were determined. Suspension cell immunophenotype was determined with the Navios Bectan Coulter cytofluorometer. A part of the cells were cultured by a standard protocol. Cultural effervescence was controlled every 24 hours up to formation of a subconfluent monolayer (70-80%), which was registered in 96-144 hours. This was followed by a histochemical study using antibodies to vimentin, a surface antigen of human fibroblasts, and cytokeratin, an epidermis cell marker. The suspension of freshly isolated cells displayed keratinocytes and fibroblasts. The cells retained vitality and function, since they showed an expressed adhesion to plastic, capacity for proliferation and expression of typical markers. Characteristics of the suspension cells did not depend on the patients' age. We obtained a good quality cell material offering new opportunities for its clinical use.

Keywords: cell material, low manipulation techniques, keratinocytes, fibroblasts, phenotyping, burn, skin.

Восстановление поражений кожи при ожогах и ранах продолжает оставаться серьезной и социально значимой проблемой. Одним из современных направлений лечения дефектов кожи является использование клеточных технологий [7; 9], в частности – применение персонафицированных маломанипуляционных технологий. Основные преимущества этих методов – использование аутологичного клеточного материала и исключение этапов культивирования, что обеспечивает их максимальную простоту и безопасность. Наиболее

известная и получившая признание маломанипуляционная технология для лечения дефектов кожи – технология «ReCell» компании Avita Medica, применяющаяся в ряде стран Европы, Канаде и Австралии [5; 6; 8]. ReCell получила регистрацию и в России и использовалась в ряде ведущих ожоговых центров [3], в том числе в ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России в 2013-2014 годах. Показанием для ее применения являются локальные ожоги 2-й степени, что значительно ограничивает возможности использования. Кроме того, в клинической практике специалистов не удовлетворяло длительное нахождение пациентов под наркозом (до часа, иногда более), необходимое для полноценного ферментативного разделения кожи и выделения клеточной взвеси, и отсутствие фиксации клеточного материала к раневому ложу, приводящее к «стеканию» взвеси при расположении ран на боковых поверхностях туловища и/или конечностей.

Для уменьшения указанных недостатков специалисты ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России разработали оригинальный способ лечения ожоговых ран [2], также основанный на применении взвеси свежевыделенных аутологичных клеток кожи пациента. Его применение позволило получить хорошие клинические результаты при лечении детей [1] с ожоговыми поражениями кожи как 2-й, так и 3-й степени. При использовании ReCell не фиксируются персональные данные о клеточном материале в каждом конкретном случае, что затрудняет анализ полученных результатов и возможность их коррекции и, на наш взгляд, является еще одним недостатком.

Поэтому было необходимо: во-первых, определить состав и дать характеристику клеточной взвеси, выделенной из неизменной кожи пациентов с ожоговой травмой с использованием различных методов ферментативной обработки; во-вторых, выбрать оптимальный по простоте и эффективности метод ферментативной обработки; в-третьих, определить влияние на качество полученного клеточного материала возраста пострадавших.

Экспериментальная часть

Материалом для исследования были биоптаты утильной кожи 18 детей и 16 взрослых с ожоговыми поражениями, взятые во время операций аутодермопластики. Средний возраст детей составил 2.34 ± 0.69 , взрослых – 52.75 ± 2.87 года. Протокол исследования утвержден локальным этическим комитетом (протокол № 4 от 25.03.2015) и Ученым советом ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России. У каждого пациента или его официального представителя было получено информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

Биоптаты кожи забирали в условиях операционной в стерильную пробирку, содержащую 0.9%-ный физиологический раствор и антибиотики (пенициллин/стрептомицин), и доставляли в лабораторию.

В условиях ламинарного бокса кожу тщательно многократно промывали стерильным 0.9%-ным физиологическим раствором и отделяли от остатков подкожно жировой клетчатки. После чего повторно промывали и переносили в пробирку с 0.25%-ным раствором трипсина. Несколько образцов разделяли на равные части, одну из которых помещали в холодильник при температуре +4-+6 °С на 18 часов, а вторую – в термостат при 37 °С на 1 час. По окончании периода ферментативной обработки действие фермента останавливали добавлением физиологического раствора с 10% аутологичной сыворотки. Пинцетом осторожно отделяли эпидермис от дермы по линии базальной мембраны и физиологическим раствором интенсивно смывали клетки с обоих слоев кожи с помощью шприца или пипетки. Полученную клеточную взвесь собирали в стерильную пробирку, тщательно ресуспендировали и использовали для исследования. Следует отметить, что при тепловой обработке не всегда происходило хорошее разделение слоев кожи. Для работы был выбран метод холодной ферментативной обработки как более щадящий.

Концентрацию и процент жизнеспособных клеток во взвеси определяли на счетчике «Countes», Invitrogen, США. Для определения жизнеспособности применяли прижизненный краситель трипановый синий.

Фенотипирование клеток взвеси проводили на цитофлюориметре Navios Becton Coulter, США с помощью панели антител Becton Coulter (CD 45PC5, CD 14 PC5, CD HLA-DR PC7, CD 34PC7, Cetokeratin_Fitc, CD 90Fitc, CD 105PE, CD 44Fitc, CD 73PE, CD 10PC7, CD 13 PC5 с соответствующими изотипическими контролями). Для фенотипирования использовали от 500 тысяч до 1 миллиона клеточной взвеси из каждой пробы.

Часть клеточной взвеси (200 тыс./кв. см) засеивали на чашки Петри (S=7 кв. см, «Costar») в среде DMEM с добавлением антибиотиков (пенициллин/стрептомицин), 2% глутамина и 10% телячьей эмбриональной сыворотки и помещали в CO₂ – инкубатор при 5% CO₂, 37 °С и абсолютной влажности. Для работы использовали реактивы и среды производства ООО «ПанЭко» Москва, Россия. Каждые 24 часа контролировали состояние культуры на пластике с помощью инвертированного микроскопа «Leica DM I 3000B», оснащенного видеокамерой и программой «LAS V 4.3», при увеличении ×50, ×100, ×200. Использовали метод светлого поля и фазового контраста. Через 48 часов после начала инкубации меняли среду. В дальнейшем смену среды проводили каждые 48 часов. За ростом клеток на пластике наблюдали в течение 96-144 часов до образования субконфлюэнтного монослоя. После чего культуру на части чашек окрашивали с помощью стандартной окраски азур-эозином по Романовскому, а часть чашек с культурой передавали для иммуногистохимического исследования.

Иммуногистохимическое исследование проводили на монослое клеток в чашках Петри, где клетки были предварительно зафиксированы 70%-ным этанолом. Протокол исследования включал инкубацию клеток с первичными антителами с последующей визуализацией на основе использования системы детекции UltraVision Quanto (Lab Vision Corporation, USA) и ее протокола (без блокирования пероксидазной активности и протеинового блока).

Были использованы моноклональные мышинные антитела к поверхностному белку фибробластов человека (Monoclonal mouse antibody to human fibroblast surface protein), clon 1B10 (Diagnostic BioSystems, USA), моноклональные мышинные антитела к Cytokeratin Pan (СКPAN), clon AE1/AE3 и моноклональные кроличьи антитела к Vimentin, clon SP20 (Lab Vision Corporation, USA). Окрашивание проводили сразу двумя антителами в одной чашке Петри, разграничивая области их нанесения гидрофобным карандашом. Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера.

Для статистической обработки результатов применяли методы непараметрической статистики с использованием пакета программ STATISTICA 6. Статистический анализ включал оценку нормальности распределения, определение среднего арифметического ($M \pm m$), t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

В выделенной взвеси фиксировали клетки разного размера, округлой и полигональной формы, без признаков деградации. В образцах, полученных после тепловой ферментативной обработки, отмечалось достаточно большое количество клеточного детрита, после холодной – оно было незначительно. Количество выделенных клеток из одного и того же биоптата при различных способах ферментативной обработки существенно отличалось (таблица 1), так же как и доля жизнеспособных клеток. При этом в каждом образце при использовании метода холодной ферментативной обработки и количество выделенных клеток, и процент жизнеспособных среди них преобладали по сравнению с данными, полученными при тепловой ферментативной обработке.

Полученные данные согласуются с результатами других авторов, указывающих на более щадящее действие фермента при холодной обработке, характеризующееся большим выходом клеточной массы и доли жизнеспособных клеток [4].

Таблица 1

Концентрация и % жизнеспособных клеток во взвеси при различных способах ферментативной обработки

№ образца	Холодовая трипсинизация		Тепловая трипсинизация	
	Количество клеток с 1 кв. см биоптата	% жизнеспособных клеток	Количество клеток с 1 кв. см биоптата	% жизнеспособных клеток
1	7.3×10^6	81%	6.9×10^5	70%
2	7.6×10^6	84%	4.8×10^6	50%
3	10.8×10^6	76%	6.1×10^6	39%
4	8.9×10^6	78%	4.8×10^6	48%
5	7.0×10^6	80%	1.7×10^6	69%
6	7.8×10^6	81%	2.0×10^6	66%

Последующее исследование проводили только с образцами кожи, обработанными методом холодной трипсинизации. При проведении холодной ферментативной обработки сравнивали эффективность выделения клеток с 1 кв. см биоптата кожи, полученного от пострадавших детского возраста, и с биоптата такой же площади, полученного у взрослых. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Характеристика клеток взвеси в зависимости от возраста пострадавших

Группы	Возраст пострадавших	Жизнеспособность в % (M±m)	Количество клеток, выделенных с 1 кв. см биоптата (M±m)
Дети	2.34±0.69	80.39±3.02%	12.88±0.75 млн
Взрослые	52.75±2.87	76.82±4.44%	7.17±4.44 млн
P		1.000	1.000

Концентрация клеток в суспензии, выделенной методом холодной трипсинизации, колебалась от 6 до 20 млн/мл; жизнеспособность – от 60 до 88%. Статистически значимых различий между данными, полученными при исследовании материала от детей и взрослых при выраженных возрастных различиях, не выявлено.

При фенотипировании установлено, что во всех пробах преобладали (80.4±9.7%) клетки, положительные на Ceterkeratin (внутриклеточный маркер кератиноцитов). Маркеры мезенхимальных клеток (CD 90+, CD 105PE+, CD 44+, CD 73+, CD 10+, CD13+) определялись на 14.2±5.6% клеток, что свидетельствовало о присутствии в клеточной взвеси клеток мезенхимального происхождения – предположительно фибробластов (основной популяции клеток дермы). Маркеры гемопоэтических клеток (CD 45, CD 14, CD HLA- DR, CD 34) составляли не более 4-6%, а в ряде образцов не определялись.

При наблюдении за ростом клеток в культуре уже через 24 часа фиксировали адгезию единичных клеток к пластику, однако основная масса клеток оставалась в среде (рис. 1).

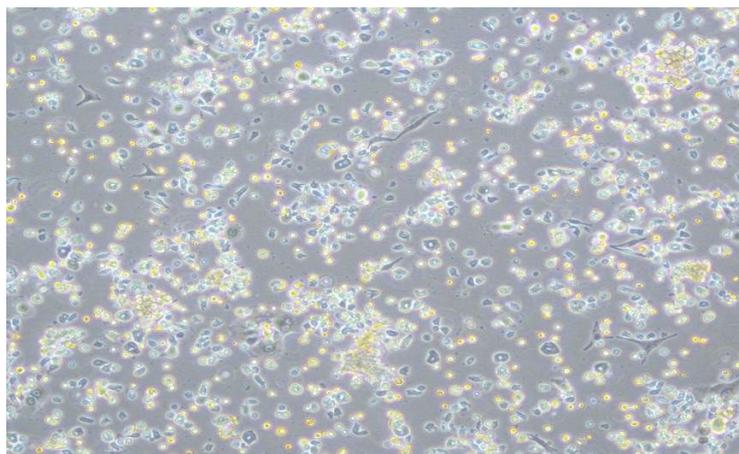


Рис. 1. Взвесь аутологических клеток на чашке Петри через 24 часа культивирования (увеличение $\times 100$, фазовый контраст)

На рис. 1 видны единичные распластанные клетки веретеновидной или звездчатой формы с выраженными отростками (фибробласты) и преобладающие, как плавающие в среде, так и прикрепившиеся к пластику, клетки полигональной и округлой формы (кератиноциты), а также мелкие клетки округлой формы (клетки крови).

Через 48 часов число клеток, фиксированных к пластику, увеличивалось (рис. 2). После смены среды на поверхности пластика видны: полигональные и округлые клетки с крупными ядрами, клетки веретеновидной или звездчатой формы с выраженными отростками, кроме того, наблюдали скопления клеток различной формы и размеров.

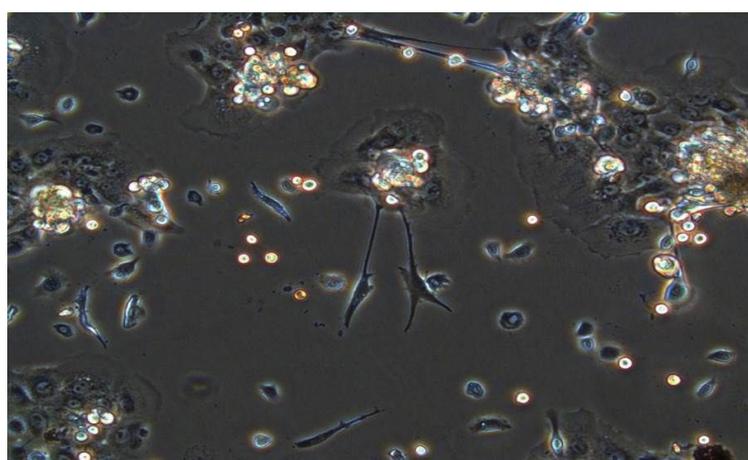


Рис. 2. Культура аутологических клеток на чашке Петри через 48 часов культивирования (увеличение $\times 100$, фазовый контраст)

Через 96-144 часа на поверхности культурального сосуда отмечали формирование субконфлюэнтного монослоя. Клетки монослоя покрывали до 70-80% поверхности. В эти сроки культуру фиксировали и окрашивали непосредственно на пластике. Монослой был сформирован крупными клетками полигональной формы с центрально расположенными крупными ядрами, в которых определялись 3-4 ядрышка. Форма и размеры клеток соответствовали таковым для клеток эпидермиса. Кроме того, на поверхности фиксировались единичные веретеновидные клетки с выраженными отростками, что характерно для фибробластов. Часть образцов использовали для иммуногистохимического исследования. Окрашивание проводили сразу двумя антителами в одной чашке Петри, разграничивая области их нанесения гидрофобным карандашом. Ядра клеток докрасивали гематоксилином Майера.

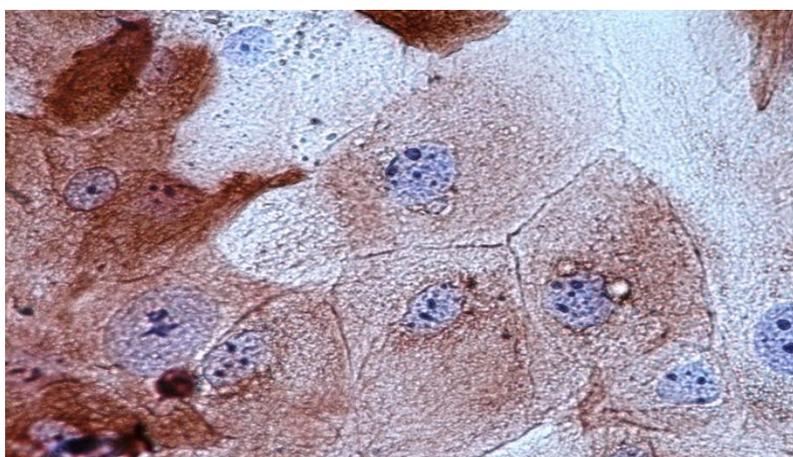


Рис. 3. Cytokeratin Pan-позитивные клетки в культуре (иммуногистохимическое окрашивание антителом Cytokeratin Pan, увеличение $\times 400$)

Иммуногистохимическое окрашивание антителами к Cytokeratin Pan и Vimentin позволило наглядно дифференцировать фибробласты и кератиноциты. Окраска цитоплазмы Cytokeratin Pan свидетельствовала о наличии в этой культуре эпителиальных клеток, а различная интенсивность окрашивания клеток в образцах демонстрировала многослойность (слоистость) культуры (рис. 3). Клетки Cytokeratin Pan-позитивные отличаются по форме и размерам от Vimentin-позитивных фибробластов (рис. 4), на фоне интенсивно окрашенной цитоплазмы которых отчетливо просматриваются ядра неокрашенных кератиноцитов.



Рис. 4. Виментин-позитивные клетки в культуре (иммуногистохимическое окрашивание антителом Vimentin, ув. $\times 400$)

Таким образом, проведенное исследование клеточной взвеси, выделенной из образцов неизменной кожи пациентов с ожоговой травмой разного возраста, продемонстрировало наличие в ее составе как клеток эпидермиса – кератиноцитов, так и основных клеток дермального слоя – фибробластов. Это подтверждается выявлением различными методами (цитофлуориметрия, иммуногистохимия) в составе взвеси клеток как несущих маркеры кератиноцитов (цитокератин), так и маркеры, типичные для клеток мезенхимы – фибробластов: виментин, CD 90+, CD 105PE+, CD 44+, CD 73+, CD 10+, CD13+. Микроскопически форма клеток также соответствует основным типам клеток двух слоев кожи. Высокая жизнеспособность клеток в выделенной взвеси и способность к адгезии и пролиферации на пластике с сохранением характерных особенностей демонстрирует полноценность выделенных клеточных элементов. Следует отметить, что исследование материала, полученного от детей и взрослых, по жизнеспособности и количеству выделенных клеток с одного квадратного сантиметра не выявило статистически значимых различий, то есть возраст пострадавшего не влияет на характеристику полученной из его кожи клеточной взвеси.

Заключение. Таким образом, взвесь свежесделанных клеток, полученная из неизменной кожи пациентов с ожоговой травмой, состоит из основных клеточных элементов ее обоих слоев: и кератиноцитов, и фибробластов. Аутологичные клетки после выделения сохраняют высокую жизнеспособность и функциональную активность, так как определяется их выраженная адгезия к пластику, сохраняется пролиферативная активность и способность к экспрессии типичных рецепторов. Характеристики клеток взвеси не зависят от возраста пострадавших. В результате показано, что при использовании метода холодной трипсинизации из неизменной кожи пациентов с ожоговой травмой получен клеточный

материал с хорошими свойствами, и это открывает перспективы для его клинического применения.

Список литературы

1. Алейник Д.Я., Докукина Л.Н., Квицинская Н.А., Чарыкова И.Н., Рубцова Ю.П., Воловик М.Г. Применение свежезаготовленных аутологичных клеток в практике детской комбустиологии // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2015. – Т. 5, № 4. – С. 18–23.
2. Карякин Н.Н., Докукина Л.Н., Алейник Д.Я., Аминев В.А., Квицинская Н.А., Соколов Р.А. Способ лечения глубоких ожогов на ранних этапах : Патент России № 2499603. 2013. Бюл. № 3.
3. Королева Т.А., Будкевич Л.И., Шурова Л.В., Долотова Д.Д. Оценка эффективности применения современных эквивалентов кожи в лечении детей с глубокими ожогами // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2014. – Т. 4, № 3. – С.77–84.
4. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство. – М., БИНОМ. - 2010. - С. 691.
5. A comparative study of spray keratinocytes and autologous meshed split-thickness skin graft in the treatment of acute burn injuries / R. Sood, D.E. Roggy, M.J. Zieger, M. Nazim, B.C. Hartman, J.T. Gibbs // Wounds. – 2015. – Vol. 27, N 2. – P. 31-40.
6. A randomized trial comparing ReCell system of epidermal cells delivery versus classic skin grafts for the treatment of deep partial thickness burns / G. Gravante, M.C. Di Fede, A. Araco, M. Grimaldi, B. De Angelis, A. Arpino, V. Cervelli, A. Montone // Burns. – 2007. – Vol. 33, N 8. – P. 966- 972.
7. Barret J.P., Wolf S.E., Desai M.H., Herndon D.N. Cost-efficacy of cultured epidermal autografts in massive pediatric burns // Ann Surg. – 2000. – Vol. 231. – N 6. - P. 869-876.
8. The use of a non-cultured autologous cell suspension and Integra dermal regeneration template to repair full-thickness skin wounds in a porcine model: a one-step process / F.M. Wood., M.L. Stoner, B.V. Fowler, M.W. Fear // Burns. - 2007. - Vol. 33, N 6. - P. 693-70.
9. Wood F.M., Kolybaba M.L., Allen P. The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn injuries: a critical review of the literature // Burns. – 2006. – Vol. 32, N 4. – P. 395-401.