

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ ПЛАСТОВ ИЗ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЭФФЕКТИВНО ИНДУЦИРУЕТ АНГИОГЕНЕЗ В ИШЕМИЗИРОВАННЫХ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ

П.И. Макаревич^{1,2}, М.А. Болдырева¹, К.В. Дергилёв¹, Е.В. Глуханюк², Ю.О. Галлингер², А.Ю. Ефименко², В.А. Ткачук², Е.В. Парфёнова¹

¹ Институт экспериментальной кардиологии, Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава РФ, Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Transplantation of cell sheets from adipose-derived mesenchymal stromal cells effectively induces angiogenesis in ischemic skeletal muscle

P.I. Makarevich^{1,2}, M.A. Boldyreva¹, K.V. Dergilev¹, E.V. Gluhanyuk², J.O. Gallinger², A.Yu. Efimenko², V.A. Tkachuk², Ye.V. Parfyonova¹

¹ Institute of experimental cardiology, Russian cardiology research and production complex, Moscow, Russia

² M.V. Lomonosov Moscow state university, Moscow, Russia

Трансплантация клеток для индукции ангиогенеза является перспективным подходом к терапевтическому ангиогенезу — одной из новых тактик лечения ишемических заболеваний. При этом эффективность такой терапии в ряде случаев оказывается недостаточно высокой из-за того, что введение клеток с помощью инъекции негативно сказывается на их выживаемости. Возможным решением данной проблемы может быть использование так называемых клеточных пластов (англ. cell sheets), которые представляют собой минимальные тканеинженерные конструкции, состоящие из клеток и нарабатываемого ими внеклеточного матрикса.

В настоящей работе исследована возможность стимуляции ангиогенеза с помощью клеточных пластов, состоящих из мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани (МСК ЖТ). На мышечной модели ишемии задней конечности было показано, что подкожная трансплантация клеточного пласта, состоящего из 1 млн МСК ЖТ эффективно индуцирует рост сосудов и вызывает восстановление кровоснабжения ткани по сравнению с контрольными животными с ишемией конечности. Гистологическое исследование выявило уменьшение площади некроза скелетных мышц и сохранность клеточного пласта на 14 сут. с наличием в его толще пролиферирующих клеток и единичных клеток с признаками апоптоза. Более того, при сравнении животных, которым были трансплантированы клеточные пласты из МСК ЖТ с группой, в которой такая же доза клеток была введена инъекционно, нами было обнаружено преимущество доставки клеточных пластов по показателям перфузии и защиты ткани от некроза.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что использование клеточных пластов из МСК ЖТ для индукции ангиогенеза и защиты скелетных мышц от ишемического повреждения может быть одним из перспективных подходов для терапевтического использования.

Ключевые слова: клеточная терапия, клеточный пласт, ангиогенез, мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани, ишемия конечности.

Введение

Индукция роста сосудов с помощью клеточной и генной терапии (известная как *терапевтический ангиогенез*) является одним из наиболее перспективных методов лечения целого ряда ишемических заболеваний — ишемической болезни сердца (ИБС), инфаркта миокарда (ИМ) и ишемии нижних конечностей [1].

Для этой цели в различных работах были использованы клетки, выделенные из костного мозга,

Delivery of cells is a promising approach to induce blood vessel formation for treatment of ischemia. Still, efficacy of these methods has been shown to be below expectations due to the fact that injection procedures used to transplant cells can diminish their survival rate. To circumvent this problem a technique known as “cell sheets” can be utilized. Cell sheets are minimal tissue-engineered constructs that comprise of cells along with their extracellular matrix proteins.

Present study investigates application of cell sheets from adipose-derived mesenchymal stromal cells (AD-MSC) to stimulate angiogenesis. In a mouse model of limb ischemia we demonstrate that subcutaneous implantation of a cell sheet from 1 mln AD-MSC effectively stimulates angiogenesis and restores perfusion of ischemic muscle compared to untreated animals with limb ischemia. Histology also indicates that cell sheet transplantation results in decreased necrosis of skeletal muscle and retain of AD-MSC at Day 14 with certain prevalence of proliferating and minimal amount of apoptotic cells within cell sheet.

Furthermore, comparison of cell sheet-treated animals vs. injection of the same dose of AD-MSC shows that cell sheet delivery was superior to routine injection-based delivery in terms of limb perfusion and tissue protection.

Obtained results indicate that local application of AD-MSC cell sheets to promote angiogenesis and protect skeletal muscle from ischemia can be a promising approach for therapeutic use.

Keywords: cell therapy, cell sheet, angiogenesis, adipose-derived mesenchymal stromal cells, limb ischemia.

периферической крови, плаценты, жировой ткани. При этом мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани (МСК ЖТ) являются одним из наиболее доступных источников клеточного материала для терапевтического ангиогенеза [2]. Обладающие высокой паракаринной активностью и способностью к эндотелиальной дифференцировке [3], МСК ЖТ сравнительно легко могут быть получены с помощью биопсии жировой ткани или при хирургических вмешательствах [4]. С подробным анализом тера-

пептического потенциала МСК ЖТ и их механизмов действия можно ознакомиться в обзорных работах последних лет [5–8].

При этом эффективность клеточной терапии в клинике остается ниже ожидаемой [9], о чем говорят результаты исследований, в которых для индукции роста сосудов суспензию МСК ЖТ вводили в ткани с помощью инъекции. Процессы ангиогенеза и регенерации ткани требуют наличия стимула в течение продолжительного (до нескольких недель) времени [10]. По этой причине трансплантация клеток может быть успешной только в том случае, если клетки сохраняют жизнеспособность и функциональную активность после доставки в ткани. С этих позиций инъекция стволовых или прогениторных клеток имеет ряд недостатков, так как при трансплантации в суспендированном состоянии клетки, лишённые контактов друг с другом, погибают из-за анокиза [11]. Кроме того, в зависимости от размера клеток, диаметра иглы, плотности суспензии и скорости введения от 40 до 60% клеток могут необратимо повреждаться при прохождении через иглу или катетер [12], что также уменьшает жизнеспособность трансплантата. Дополнительным фактором, снижающим вероятность успешного приживания, является воспалительное окружение в ишемизированной ткани [13]. При этом показано, что воспалительные хемо- и цитокины являются положительными регуляторами пролиферации и активности МСК ЖТ, однако с учетом перечисленных выше стрессовых стимулов они могут стать одним из триггеров апоптоза [14].

Возможной альтернативой инъекционному введению являются методы трансплантации клеток в виде сформированных *in vitro* клеточных пластов (англ. cell sheets) [15]. Данный метод основан на том, что МСК ЖТ культивируют в условиях плотного или сверхплотного монослоя, что приводит к формированию минимальной тканеинженерной конструкции состоящего из пласта клеток и наработанного ими внеклеточного матрикса (ВКМ). Получаемый таким образом одно- или многослойный конструкт может быть снят с культуральной пластике различными способами и затем пересажен на поверхность ишемизированной ткани [16]. Использование клеточных пластов позволяет трансплантировать клетки с сохраненными межклеточными контактами вместе с белками матрикса и наработанными факторами роста в составе ВКМ. Таким образом, данный метод практически нивелирует целый ряд недостатков инъекционного введения суспензии МСК ЖТ.

В опытах на животных показано, что пересадка клеточных пластов из МСК ЖТ на эпикардальную поверхность сердца вызывает уменьшение размеров ИМ и индуцирует ангиогенез в перинфарктной зоне, что приводило к росту перфузии по данным МРТ-кардиографии [17]. Вторым распространенным состоянием, при котором необходима индукция ангиогенеза, является критическая ишемия нижних конечностей (КИНК). При КИНК наиболее логичным использованием представляется аппликация клеточных пластов для закрытия язвенных дефектов, однако вопрос о наличии у клеточных пластов из МСК ЖТ собственного ангиогенного потенциала изучен мало. Это является актуальной задачей, так как трансплантация клеточных пластов вполне может оказаться ценным вспомогательным методом во время реконструктивных операций или шунтирования, увеличивая шансы на сохранение конечности.

С учетом изложенных выше фактов нами была проведена работа по получению клеточных пластов из МСК ЖТ и оценке их ангиогенного эффекта при подкожной трансплантации на ишемизированные мышцы задней конечности мыши.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Для выделения МСК ЖТ и моделирования ишемии задней конечности использовали самцов мыши C57/B6 весом 25–28 г (9–10 нед.). Манипуляции с животными были одобрены этическим комитетом в соответствии с внутренними требованиями Института экспериментальной кардиологии ФГБУ РКНПК.

Выделение МСК ЖТ мыши. Перед выделением МСК ЖТ мышей усыпляли в индукционной камере летальной дозой изофлюрана до прекращения дыхательной деятельности, после чего смещали шейные позвонки для умерщвления. После этого в ламинарном боксе трупы животных погружали на 5–6 сек. в 70% этиловый спирт, размещали на спине и выполняли продольный разрез кожных покровов Y-образным разрезом по вентральной поверхности тела. После забора жировую клетчатку помещали в пробирку со стерильным фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Полученный материал в ламинарном шкафу механически измельчали ножницами до гомогенной суспензии, которую смешивали в соотношении 1:2 с раствором коллагеназы I типа (200 ед./мл) (Worthington, США) и инкубировали при 37°C в течение 40–60 мин., периодически интенсивно встряхивая и контролируя визуально ее состояние и гомогенность. По окончании инкубации к полученной суспензии добавляли равный объем среды DMEM (HyClone, США) с 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (HyClone, США). Строму, клеточный компонент и дебрис осаждали центрифугированием (200 g, 10 мин.), по окончании которого флотирующие адипоциты и жидкую фазу удаляли, а осадок ресуспендировали в DMEM/10% ФБС. Для удаления дебриса полученную суспензию фильтровали через нейлоновые фильтры с размером пор 100 мкм (BD Falcon, США), полученный фильтрат центрифугировали (200 g, 5 мин.). После удаления супернатанта осадок ресуспендировали в среде DMEM/10% ФБС, подсчитывали в камере Горяева и высаживали в чашки Петри (диаметр 60 или 100 мм) в плотности $10\text{--}20 \times 10^4$ кл./мл в объеме среды 7–8 мл. Затем чашки помещали в инкубатор при стандартных условиях (37°C, 5% CO₂) на 1 сут. и на следующий день неприкрепившиеся клетки отбирали вместе со средой, после чего культуру аккуратно отмывали 1×ФСБ, а среду заменяли на свежую в таком же объеме.

Культивирование МСК ЖТ и сборка клеточных пластов. Мышиные МСК ЖТ культивировали в увлажняемом инкубаторе при стандартных условиях — (37°C; 5% CO₂) на непокромом пластике в среде DMEM/10% ФБС с пассированием 1:1 по достижении 70–80% конфлюэнта.

По достижении 4–5 пассажа МСК ЖТ снимали трипсином и ресуспендировали в среде DMEM/10% ФБС с плотностью 10^6 кл./мл. Полученную суспензию высаживали на 12-луночные непокромые культуральные планшеты (Corning, США) в количествах 0,5–1,0–1,5 млн МСК ЖТ на лунку (соответственно $\approx 125\text{--}250\text{--}375$ тыс./см²).

После этого объем среды доводили до 1,5 мл и, аккуратно встряхнув, планшет оставляли в инкубаторе на 24 ч. для сборки клеточных пластов.

Флуоресцентная метка клеточных пластов с помощью CMFDA. Для детекции клеточных пластов на гистологических препаратах их метили с помощью флуоресцентного прижизненного красителя CMFDA (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя непосредственно перед снятием для подкожной имплантации мышам по протоколу, изложенному ниже.

Снятие клеточных пластов с помощью кратковременной обработки раствором трипсина/ЭДТА. Для снятия клеточных пластов по окончании их сборки среду с 12-луночного планшета отбирали отсосом, содержащиеся на лунках пласты отмывали 1 раз ФСБ (30 сек.), дважды теплым раствором Версена (по 20 сек.) и затем обрабатывали 0,025% раствором трипсина/ЭДТА (10 сек.), который затем удаляли отсосом, а лунки заливали ФСБ (3–3,5 мл). Далее с помощью одноразового носика для пипетки пласт очерчивали по линии стыка дна и стенки лунки, а затем аккуратно снимали, используя шпатель или носик для пипетки, аккуратно встряхивая планшет постукиванием по его стенке. Флотирующий пласт далее использовали для пересадки животными.

Мышинная модель ишемии задней конечности, инъекция суспензии МСК ЖТ и трансплантация клеточных пластов. Индукцию односторонней ишемии задней конечности проводили по ранее отработанному протоколу с помощью лигирования ветвей *a. femoralis* с ее дальнейшим иссечением [18]. В группе контроля после иссечения *a. femoralis* кожа ушивалась непрерывным обвивным швом с помощью атравматической иглы шелком 5-0. В группе инъекции МСК ЖТ в ишемизированные мышцы тремя равными инъекциями (в *m. biceps femoris*, *m. tibialis anterior* и *m. quadriceps femoris* вводили суммарно 1,0 млн клеток в 150 мкл ФСБ; в группе трансплантации МСК ЖТ в виде клеточного пласта его накладывали на область иссеченного сосуда в капле ФСБ, затем осушали рану с помощью ватного тампона до адгезии трансплантата в течение 60–90 сек., кожу ушивали атравматической иглой (шелк 5-0) обвивным швом. После операции степень нарушения кровотока оценивали с помощью лазер-доплеровского сканирования (см. ниже), после чего животных помещали в чистую клетку для восстановления.

Оценка кровотока методом лазер-доплеровского сканирования. Для оценки кровотока использовали лазер-доплеровский сканер LD12 (Moog, Великобритания). Измерение проводили сразу после операции и на 7 и 14 дни под изофлюрановым наркозом по ранее отработанному протоколу [19]. После измерения на 14 день животных выводили из опыта описанным выше методом, а из ишемизированной конечности выделяли переднюю большеберцовую мышцу, которую замораживали в среде Tissue-Tek (Sacuga Ltd., Япония) в парах жидкого N₂. Из замороженных блоков на криотоме (Microm HM 505E, Германия) получали серийные поперечные срезы толщиной 7 мкм с шагом 0,5 мм, после чего подсушенные на воздухе стекла со срезами хранили при -20°C.

Оценка плотности сосудов в передней большеберцовой мышце. Замороженные срезы мышц окрашивали антителами к маркерам эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток, после чего сосуды визуализировали с помощью флуоресцентного микроско-

па Zeiss AxioObserver A1, оборудованного камерой AxioCam (Carl Zeiss, Германия). Анализ полученных изображений проводили в программе ImageJ (NIH, США).

Срезы фиксировали в ледяном ацетоне (20 мин. в морозильнике), осушали в вытяжном шкафу и погружали на 5 мин. в ФСБ, затем блокировали в течение 1 ч. в 10% сыворотке донора вторичных антител и отмывали 5 мин. в ФСБ. Зафиксированную ткань окрашивали первичными крысиными антителами против CD31 мыши (BD Pharmingen, США) и затем вторичными кроличьими антителами против иммуноглобулинов крысы, конъюгированными с красным флуорофором AlexaFluor594 (Invitrogen, США). Далее срезы ополаскивали в ФСБ и докрашивали первично-мечеными FITC-конъюгированными антителами против α -гладкомышечного актина (α -ГМА) (Sigma-Aldrich, США). После окрашивания и отмывки ядра клеток визуализировали с помощью DAPI и срезы заключали под покровные стекла. Для подсчета сосудов анализировали по 5–6 срезов на каждом стекле, после чего получали усредненное количество сосудов в поле зрения для каждого животного и для группы в целом.

Оценка площади некроза в скелетных мышцах. Для оценки площади некроза срезы скелетных мышц фиксировали 4% формальдегидом на ФСБ и затем окрашивали гематоксилином и эозином стандартным способом. Оценка площади некротизированных волокон на срезах проводили методом морфометрии в программе ImageJ по ранее отработанному протоколу [20]. Некротизированными считались ануклеарные волокна с признаками плазмореаксиса, также к сопутствующим некрозу изменениям относили демаркационную клеточную инфильтрацию, которую включали в площадь некротизированной ткани при обсчете.

Визуализация клеточного пласта и оценка жизнеспособности трансплантированных МСК ЖТ в его составе. Окрашенные с помощью CMFDA (см. выше) клеточные пласты были визуализированы на свежих незафиксированных срезах двуглавой мышцы бедра, выделенной на 14 день из зоны трансплантации клеточных пластов. Для оценки пролиферации и апоптоза в клеточных пластах срезы фиксировали в 4% формальдегиде на ФСБ, отмывали и после блокирования в 10% сыворотке донора вторичных антител окрашивали поликлональными кроличьими антителами против активированной каспазы-3 (Signaling technology, США) или Ki-67 (Abcam, Англия) в течение 1 ч. После этого стекла отмывали в ФСБ и докрашивали вторичными антителами против кроличьих IgG, конъюгированными с красным флуорофором AlexaFluor 594 (Invitrogen, США). Ядра клеток визуализировали с помощью DAPI, а окрашенные срезы заключали под покровными стеклами и использовали для флуоресцентной микроскопии с оценкой наличия клеток, окрашенных CMFDA (клетки пласта), с признаками апоптоза (активацией каспазы-3) или пролиферации (положительных по Ki-67).

Статистическая обработка данных. Данные представлены в формате среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (для параметрического распределения) или стандартное отклонение (для непараметрических распределений). Статистическую обработку результатов выполняли в пакете Statsoft Statistica 6.0 с использованием t-критерия Стьюдента или U-критерия Манна – Уитни. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты

Подбор оптимальной плотности культуры МСК ЖТ для быстрого формирования клеточных пластов на непокрытом пластике. На начальном этапе была выполнена отработка метода, позволяющего быстро (до 24 ч.) получать клеточные пласты, которые могут быть сняты с пластика с сохранением целостности, что позволит осуществлять их трансплантацию.

Оценка формирования клеточных пластов из МСК ЖТ при различной плотности суспензии показала, что снимаемые с пластиковой посуды конструкты могут быть получены через 24 ч. при посадке мышинных МСК ЖТ с плотностью 250 или 375 тыс. кл./см² поверхности дна планшета (рис. 1А–В). Использование плотности культуры равной 125 тыс. кл./см² позволяло получить структуру, подобную клеточному пласту, однако снять ее для трансплантации без повреждения не удавалось даже по истечении 48 ч. культивирования (рис. 1Г, Д).

Кроме того, на данном этапе был отработан способ снятия клеточных пластов из МСК ЖТ с помощью слабого (0,025%) раствора трипсина/ЭДТА с обработкой сформированных конструктов в течение 10–15 сек., что позволяет избежать применения дорогостоящего термочувствительного пластика. Последнее является важным при производстве конструктов большой площади или получении их большими сериями.

Восстановление кровотока в задней конечности мыши под действием МСК ЖТ, трансплантированных с помощью инъекции или в виде клеточных пластов. В опыте на модели ишемии задней конечности мыши была оценена эффективность двух методов трансплантации МСК ЖТ по сравнению с отрицательным контролем. В сформированных группах животных были выполнены операции по индукции ишемии, после чего 1,0 млн МСК ЖТ вводили в ткани тремя внутримышечными инъекциями или интраоперационно трансплантировали в виде клеточного пласта на зону резецированной бедренной артерии.

По данным лазер-доплеровского исследования, проведенного в день индукции ишемии, операция вызывала падение скорости кровотока в оперированной конечности до $7,7 \pm 1,4\%$ по сравнению со здоровой конечностью. Двухнедельное наблюдение за животными не выявило в группах исследования ампутаций конечности или выраженных гангренозных изменений, хотя в контрольной группе (индук-

ция ишемии без введения клеток) были отмечены единичные дистальные некрозы пальцев стопы.

Исследование динамики перфузии конечности показало, что по сравнению с отрицательным контролем в группах введения МСК ЖТ отмечались более высокие показатели скорости кровотока в конечной точке исследования, причем введение МСК ЖТ с помощью инъекции уступало по эффективности методу трансплантации клеточного пласта, содержащего аналогичное количество клеток (рис. 2).

В группе с внутримышечной инъекций МСК ЖТ на 14 сут. относительная перфузия (определяемая как процентное отношение скоростей перфузии в ишемизированной и здоровой конечностях) была значимо выше, чем в группе отрицательного контроля ($43,1 \pm 4,4\%$ по сравнению с $33,7 \pm 3,2\%$ соответственно; $p = 0,003$). При этом подкожная трансплантация клеточного пласта обладала максимальной эффективностью и приводила к восстановлению относительной перфузии до $53,7 \pm 4,7\%$, что было значимо выше, чем в группе инъекционного введения ($p = 0,03$) и отрицательного контроля ($p = 0,001$).

Оценка плотности кровеносных сосудов после трансплантации МСК ЖТ в виде клеточных пластов или с помощью инъекций. Терапевтическое действие МСК ЖТ в ишемизированной ткани в значительной степени обусловлено ангиогенным эффектом за счет паракринной активности клеток, секретирующих ангиогенные факторы. Анализ плотности сосудов в ишемизированной передней большеберцовой мышце, выделенной из конечностей подопытных животных, проводили на замороженных срезах, окрашенных на маркеры клеток эндотелия и гладкомышечных клеток (рис. 3).

Анализ полученных микрофотографий показал, что инъекция МСК ЖТ приводила к значимому увеличению ($p = 0,03$) плотности капилляров по сравнению с животными контрольной группы, где плотность капилляров составила $165,3 \pm 19,3$ /поле зрения. При этом показатель плотности капилляров в группе трансплантации клеточных пластов был значимо выше, чем в группе инъекции эквивалентной дозы МСК ЖТ ($231,1 \pm 18,6$ по сравнению с $194,4 \pm 10,4$ соответственно; $p = 0,007$). Таким образом, на данном этапе был обнаружен выраженный ангиогенный эффект МСК ЖТ, как вводимых внутримышечно, так и апплицируемых на ее поверхность с явной тенденцией к преимуществу последних (рис. 3).

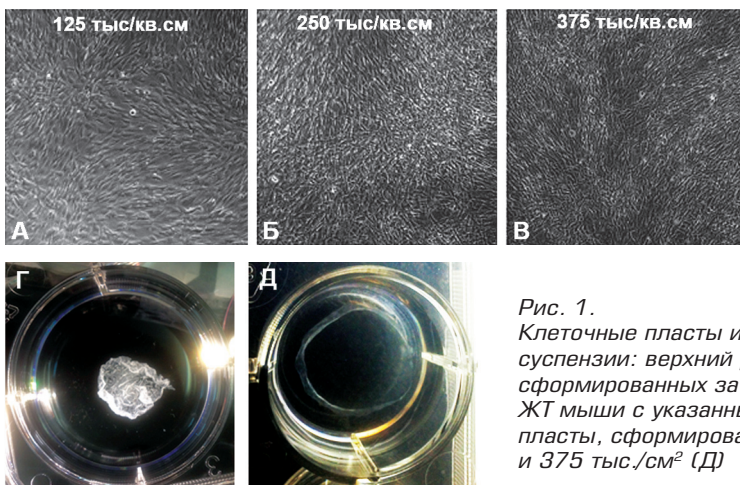


Рис. 1. Клеточные пласты из МСК ЖТ мыши при различных плотностях суспензии: верхний ряд (А–В): микрофотографии клеточных пластов сформированных за 24 ч. на 12-луночном планшете из суспензии МСК ЖТ мыши с указанными плотностями; нижний ряд: снятые клеточные пласты, сформированные при плотности 125 тыс./см² (Г) и 375 тыс./см² (Д)

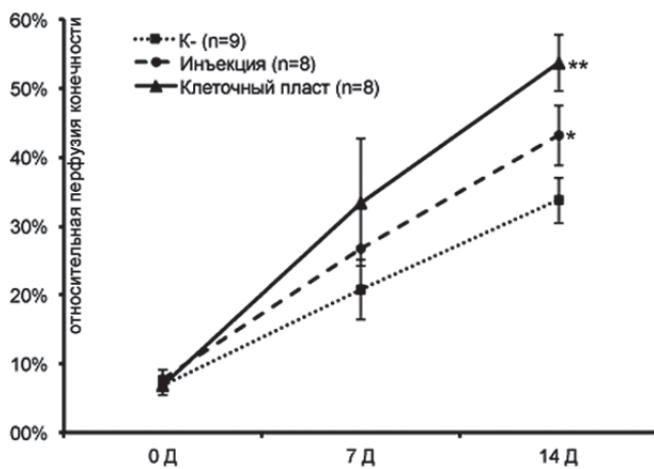


Рис. 2. Восстановление кровотока в ишемизированной конечности у животных из различных групп эксперимента. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение; U-критерий Манна – Уитни: * $p = 0,01$ по сравнению с отрицательным контролем и ** $p = 0,03$ по сравнению с группой инъекции МСК ЖТ

При этом оценка плотности крупных α -ГМА-позитивных сосудов, имеющих просвет, не выявила значимых различий между группами исследования (рис. 3).

Оценка площади некротизированной ткани в ишемизированных скелетных мышцах. Уменьшение площади некроза является одним из ключевых показателей терапевтической эффективности, который может реализовываться за счет нормализации трофики и антиапоптотического действия цитокинов, продуцируемых МСК ЖТ. При анализе площади некротизированной ткани методом морфометрии на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, было установлено, что площадь ткани с признаками некроза значительно снижалась после трансплантации МСК ЖТ. Уменьшение площади некротизированных волокон на срезах совпадало с тенденцией к более высокой плотности капиллярных сосудов в этих группах (рис. 4). Сравнение результатов, полученных после инъекции МСК ЖТ и трансплантации клеточных пластов показало, что последние обладают умеренным, но статистически значимым преимуществом по сравнению с инъекционным введением (рис. 4).

Детекция подкожно пересаженных клеточных пластов и оценка их жизнеспособности и васкуляризации. Более высокая выживаемость МСК ЖТ в составе трансплантированного клеточного пласта считается одним из факторов, который лежит в основе их более высокой терапевтической эффективности.

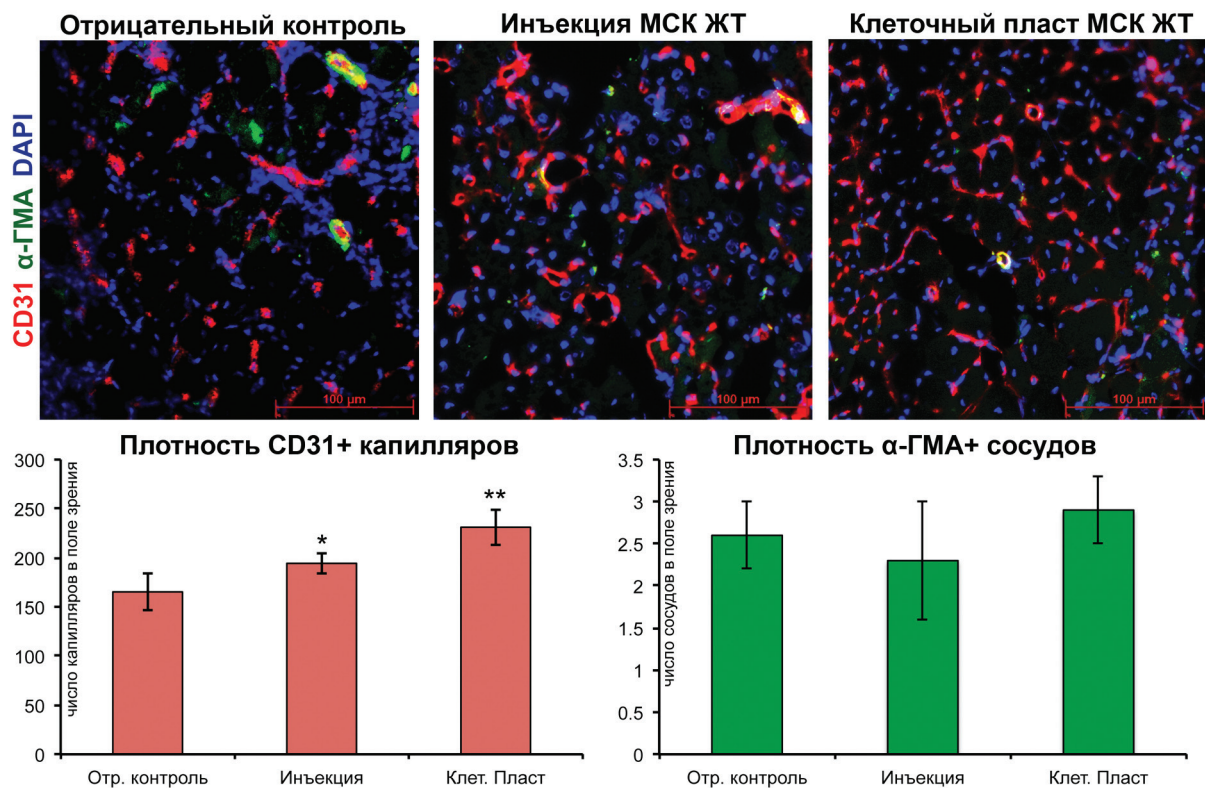


Рис. 3. Результаты оценки плотности кровеносных сосудов в передней большеберцовой мышце ишемизированной конечности мыши на 14 день от начала эксперимента.

Верхний ряд: микрофотографии окрашенных срезов с визуализированными кровеносным сосудами; ув. $\times 200$. Нижний ряд – результаты анализа плотности сосудов в пересчете на поле зрения: данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего; t-критерий Стьюдента: * $p = 0,03$ по сравнению с отрицательным контролем и ** $p = 0,007$ по сравнению с группой инъекции МСК ЖТ

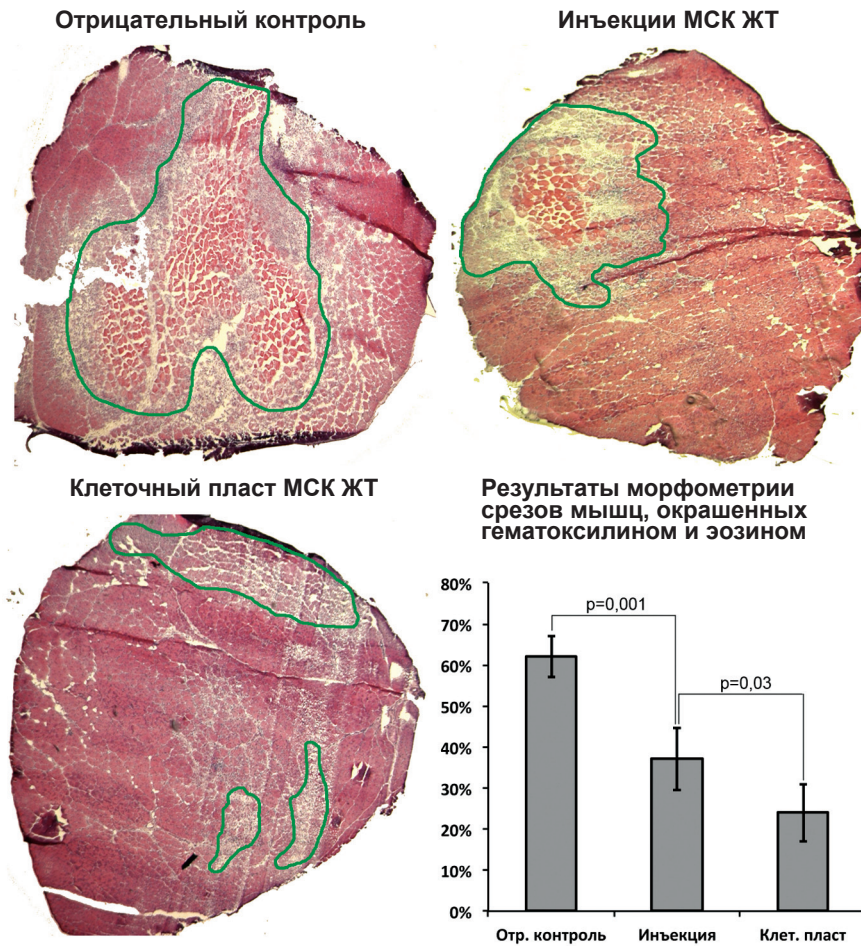


Рис. 4. Результаты морфометрии площади некроза на срезах передней большеберцовой мышцы: микрофотографии – срезы ишемизированных мышц животных из различных групп исследования; окрашивание гематоксилином и эозином, зеленой линией выделены зоны некроза; график – количественные результаты морфометрии площади некроза (% от площади среза): данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение; U-критерий Манна – Уитни; значения «р» приведены на рисунке

Для обнаружения трансплантированных таким образом МСК ЖТ участок мышечной ткани в области аппликации клеточного пласта иссекался и затем использовался для получения замороженных срезов, на которых детектировали сам клеточный пласт (по метке CMFDA, нанесенной перед трансплантацией), а также проводили окрашивание ткани на маркеры клеток кровеносных сосудов и апоптоза/пролиферации.

При этом было установлено, что к 14 сут. клеточный пласт сохраняется подкожно в виде многослойной массы, в которую входят как меченые CMFDA клетки (трансплантированные МСК ЖТ), так и клетки организма-реципиента, не несущие метки. Интересным было то, что в толще клеточного пласта были обнаружены признаки хорошей капилляризации.

Вторым важным аспектом при трансплантации клеточного материала является сохранность клеток и возможность их пролиферации, которую оценивали с помощью гистологического окрашивания на маркеры активации апоптоза (каспаза-3) и пролиферации (Ki-67). При этом были выявлены клетки как с признаками пролиферации, так и единичные апоптотические клетки, причем оба типа были найдены в толще клеточного пласта среди CMFDA-позитивных клеточных элементов.

Обсуждение

Методы тканевой и клеточной инженерии являются одними из наиболее перспективных в регенеративной медицине и, вероятно, в дальнейшем могут начать заменять классические методы клеточной терапии, основанные на инъекциях клеток в ткани или кровотоки. Несомненно, инъекционная транспланта-

ция клеток незаменима при системном введении в кровотоки, например, пересадке костного мозга, лечении аутоиммунных, гематологических заболеваний. Однако восстановление тканевых дефектов и стимуляция регенерации требуют применения более сложных подходов, позволяющих восстановить архитектуру и функцию ткани и уменьшить влияние неблагоприятных факторов, возникающих при инъекциях клеточного материала в суспензионной форме. К ним относят высокую вероятность апоптоза клеток в суспензии, повреждение при снятии и введении через иглу или катетер, а также потерю контактов клеток с белками матрикса и между собой [12].

Клеточные пласты – минимальные тканеинженерные конструкции, состоящие из клеток и наработанного ими внеклеточного матрикса представляют собой одну из оптимальных альтернатив инъекционной трансплантации. Одним из преимуществ клеточных пластов является отсутствие необходимости в дорогостоящих и узко «специализированных» био-реакторах и установках.

Как правило, клеточные пласты могут быть созданы с помощью общепринятых культуральных систем, сред и приемов и не требуют специальных условий культивирования [15]. Вторым ключевым преимуществом клеточных пластов является отсутствие в их составе ксеногенных (химических или полученных от животных) биоматериалов, свойства которых влияют на эффективность и – что важнее – безопасность всей конструкции [15]. Клеточный пласт состоит из жизнеспособных клеток, окруженных наработанным ими ВКМ, в котором накапливаются факторы роста и цитокины, т.е. сохраняется «память» о паракринных

стимулах, характерных для данных клеток и поддерживается ими же сформированное микроокружение. Роль ВКМ как одного из важных компонентов для формирования ткани хорошо иллюстрируют результаты последних лет с использованием децеллюляризованных органов и тканей [21, 22]. Таким образом, присутствие в составе клеточного пласта полноценного ВКМ является не только механическим компонентом, но и может играть самостоятельную роль в стимуляции регенеративных процессов.

В представленной работе нами решалась задача разработки способа быстрой генерации клеточных пластов из МСК ЖТ, чей регенеративный потенциал хорошо изучен, и анализа ангиогенной эффективности этих клеточных конструкторов при аппликации подкожно на ишемизированные скелетные мышцы.

Полученные нами данные показали, что одним из ключевых условий ускоренного формирования клеточных пластов является использование высокой плотности суспензии, наносимой на чашки/планшеты. В ряде работ клеточные пласты получали путем высадки клеток в плотности близкой к конфлюэнтному монослою, после чего их длительно (до 3–5 сут.) культивировали в таком состоянии [17, 23]. Разработанный нами метод позволяет быстро получить клеточные пласты в течение 1 сут. за счет повышения количества клеток до «сверхконфлюэнтной» плотности (250–375 тыс./см²) уже в момент их нанесения на культуральную посуду. При этом следует сразу же оговориться, что данные значения плотности суспензии могут варьировать для разных типов клеток из-за различий их размеров, скорости пролиферации, а также активности продукции ими внеклеточного матрикса и молекул адгезии [23]. В частности, например, в наших опытах с крысиными МСК ЖТ, которые существенно больше, чем мышинные клетки аналогичного типа, клеточные пласты удавалось получить на 12-луночных планшетах через 24–36 ч. при использовании плотности 150–200 тыс. кл./см² [24]. Следует также отметить, что предложенный способ снятия клеточных пластов позволяет избежать использования термочувствительного пластика (например, покрытого поли-N-изопропилакриламидом), который имеет высокую стоимость [16].

Использованный нами способ подкожной трансплантации клеточных пластов без применения специальных материалов (например, фибринового клея) основан на том, что поверхность операционной раны имеет достаточно высокую адгезивность и позволяет клеточному пласту быстро (в течение 1–2 мин.) и эффективно прикрепляться, после чего он может быть укрыт кожным лоскутом. Похожий способ был использован в работе К. Tatsumi и соавт. (2013), которые успешно использовали клеточные пласты из трансдуцированных миобластов, продуцирующих FXVIII, в качестве «подкожных помп» для компенсации дефицита гемостаза у мышей с моделью гемофилии А [25].

Важной находкой нашей работы является то, что подкожно трансплантированный клеточный пласт обладает достаточно хорошей выживаемостью и был обнаружен при гистологическом исследовании в опытах с конструкторами, меченными красителем CMFDA (рис. 1А, Б). Подкожно расположенный трансплантат, имевший на срезах форму многоклеточной массы, содержал как исходно трансплантированные МСК (CMFDA-позитивные клетки), так и клетки, пришедшие в толщу клеточного пласта, и не

имевшие флуоресцентной метки. К таковым могут, вероятнее всего, относиться не только лейкоциты (нейтрофилы, моноциты, лимфоциты и др.) [26], но и клетки эндотелия, которые визуализировались при гистологическом окрашивании.

Обнаруженные в составе клеточного пласта множественные сосуды имели капиллярный размер (точечные CD31⁺ сосуды без видимого просвета), что указывало не только на выживание трансплантированных МСК ЖТ, но и на взаимодействие клеточного пласта с организмом-реципиента (рис. 5Д, Е) и его васкуляризацию. Сходные результаты были ранее получены при трансплантации клеточных пластов из клеток эндотелия [27] и стволовых клеток сердца [28], однако нами была впервые обнаружена васкуляризация пластов из МСК ЖТ, которые не подвергались преваскуляризации или не со-культивировались с эндотелиоцитами.

Открытым остается вопрос о происхождении сосудов, появляющихся в толще трансплантированного пласта. Очень короткое время нахождения МСК ЖТ в культуре и использование стандартных условий культивирования (DMEM/10% ФБС) с нормальным напряжением O₂ практически полностью исключают возможность того, что часть МСК ЖТ успела «реализовать» свой умеренный потенциал к дифференцировке в эндотелиальном направлении [3]. Таким образом, в нашей системе вероятность спонтанной преваскуляризации клеточных пластов крайне мала и очевидно, что основным периодом для формирования сосудов являлся двухнедельный период после трансплантации. В этом случае также возникает вопрос о происхождении эндотелиоцитов, формирующих сосуды, и весьма вероятным является механизм васкуляризации за счет «врастания» капилляров из организма-реципиента по аналогии с тем как это происходит с бесклеточными конструкциями из белков ВКМ [20, 29]. При этом несомненным является вклад паракринных влияний функции МСК ЖТ в формирование и стабилизацию капилляров/артериол [14, 17, 30]. Нельзя также исключить, что сосуды в толще трансплантата образуются из мигрировавших в него прогениторных эндотелиальных клеток из костного мозга, путем васкулогенеза. Однако, для ответа на вопрос о механизмах васкуляризации трансплантированного пласта из МСК ЖТ необходимо проведение дополнительных экспериментов.

Обнаружение в толще клеточного пласта клеток с признаками апоптоза и пролиферации позволило нам сделать выводы о «судьбе» трансплантата. Предварительные данные указывают на то, что в толще клеточного пласта имеются как пролиферирующие (Ki-67⁺), так и апоптотические клетки (позитивные по каспазе-3), причем среди них имеются как МСК ЖТ (CMFDA-позитивные клетки), так и клетки, пришедшие в толщу пласта из организма хозяина (рис. 5В, Г). Важность последнего наблюдения заключается в том, что трансплантированные клетки не являются инкапсулированным материалом и не оказываются закрытыми «барьером» или коллагеновой капсулой, как это происходит, например, при введении суспензии в ЦНС [31]. Предварительный характер полученных нами данных требует дальнейших экспериментов с количественной оценкой пролиферирующих и апоптотических клеток, а также проведения опытов на более отдаленных сроках для установления «судьбы» МСК ЖТ.

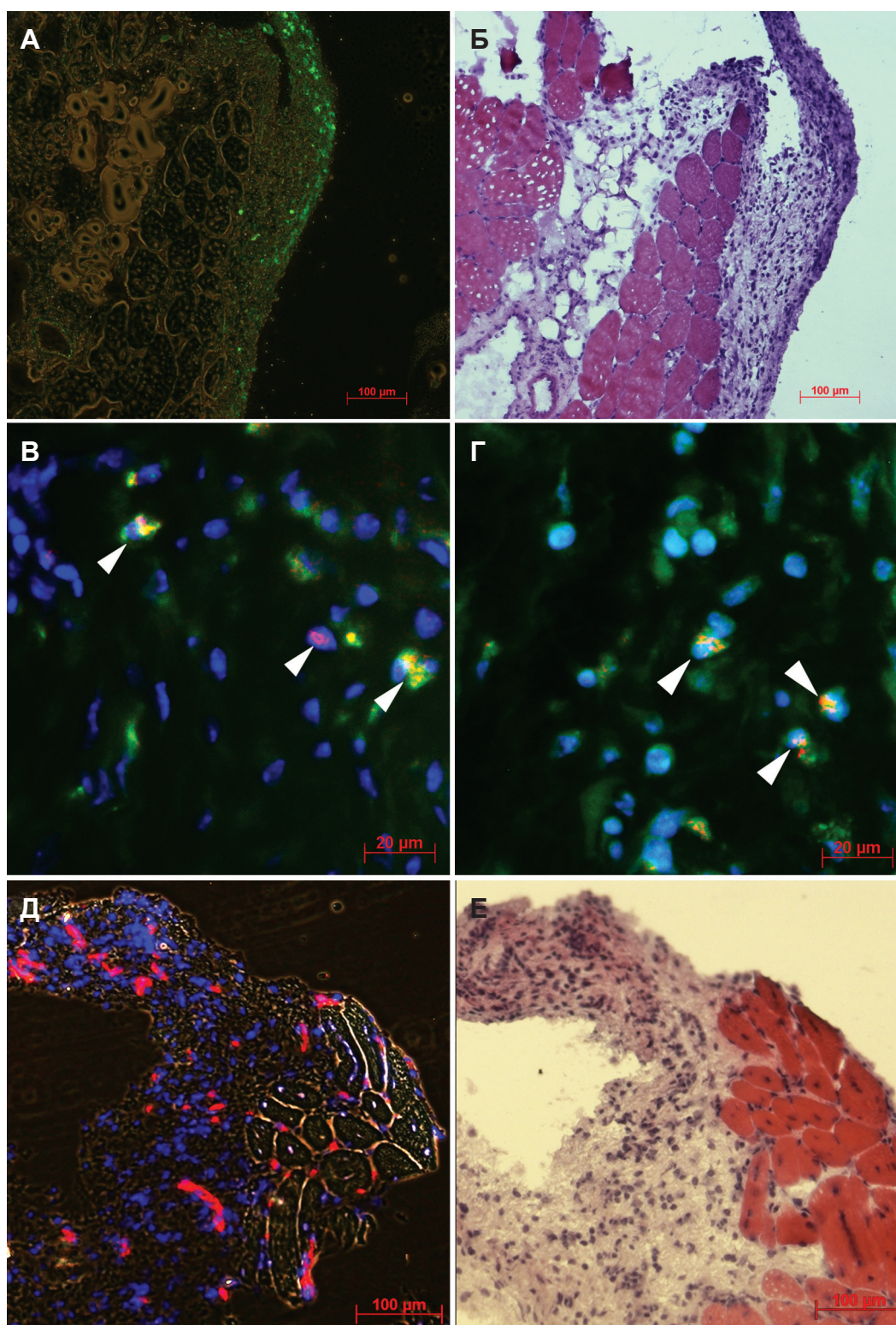


Рис. 5. Результаты гистологического исследования клеточных пластов, извлеченных на 14 день после трансплантации.
 Верхний ряд: детекция трансплантированных МСК ЖТ по сигналу CMFDA (А, зеленый сигнал) и соответствующий параллельный срез (Б);
 средний ряд: детекция в толще клеточного пласта пролиферирующих и апоптотических клеток; окрашивание на Ki-67 (В, красный) и активированную каспазу-3 (Г, красный);
 нижний ряд: капиллярная васкуляризации клеточных пластов на 14 сут. эксперимента (Д) и соответствующий параллельный срез (Е); окрашивание на CD31 (Д, красный); на (Б) и (Е) – окрашивание гематоксилином и эозином, ядра (В–Д) докрашены DAPI

Ключевыми для выводов об эффективности разработанной методики стали эксперименты на модели ишемии задней конечности. В них было показано, что подкожная пересадка клеточного пласта из 1,0 млн МСК ЖТ вызывала увеличение перфузии ишемизированной конечности мыши, причем по параметрам относительной скорости кровотока такой метод превосходил инъекционное введение МСК ЖТ в аналогичной дозе (рис. 2). Сходные данные на модели ИМ были получены Sekine и соавт.; в ней же ими было сделано предположение о роли более высокой выживаемости клеток в составе клеточных пластов, которое подтвердили с помощью метода прижизненной визуализации трансплантата [23].

Сходным образом изменялись и показатели площади некротизированной ткани, которые являются важным индикатором нормализации трофики ткани за счет восстановления кровоснабжения (рис. 4). Трансплантация МСК ЖТ с помощью инъекции значительно уменьшала площадь некротизированной ткани, а после пересадки клеточных пластов размеры некроза были минимальными среди всех групп исследования (рис. 4). Следует сразу упомянуть о том, что выраженность некроза может варьировать в зависимости от используемой линии мышей. В частности, ранее мы наблюдали, что при индукции ишемии у мышей линии BALB-C отмечаются массивные некрозы и ампутации в то время, как линия C57 характеризуется определенной «устойчивостью» к развитию некроза мышц. Это связано с тем, что у мышей линии C57 более развито по сравнению с BALB-C капиллярное русло и микроциркуляторное звено обладает способностью эффективно справляться с нарушениями трофики при ишемии [32].

Полученные нами данные морфометрии коррелировали с результатами доплерографии и оценки плотности сосудов, что свидетельствует о наличии тканепротективного действия МСК ЖТ, доставляемых обоими способами. При этом клеточные пласты обладали более высокой эффективностью, вероятно действуя по паракринному механизму, как и клетки, введенные инъекционно. Фактором, обеспечивающим более высокую эффективность клеточных пластов, вероятнее всего является повышенная выживаемость клеток при таком способе трансплантации, а также наличие синтезированного ими ВКМ, содержащего ангиогенные факторы роста и другие цитокины.

Результаты гистологического исследования плотности сосудов подкрепляли полученные нами данные лазер-доплеровского сканирования. В ишемизированной передней большеберцовой мышце после инъекций МСК ЖТ количество CD31⁺ капилляров было выше, чем в контроле, однако после трансплантации клеточных пластов из МСК ЖТ этот показатель имел максимальные значения среди всех групп экспериментальных животных (рис. 3). Следует отметить, что при оценке плотности крупных α -ГМА-позитивных сосудов, имеющих просвет, нами не было выявлено статистически значимых отличий между группами эксперимента. Расхождение

такого рода не исключает разницы по показателям восстановления кровотока, так как капиллярное русло играет ключевую роль в обеспечении ее трофики [33] и имеет очень значимое влияние на перфузию ткани при ее оценке доплеровскими методами [34].

Представленная работа ставит в дальнейшем ряд вопросов, касающихся:

- оценки долгосрочной выживаемости клеточных элементов в составе пластов с количественным исследованием доли апоптотических и пролиферирующих клеток;

- изучения механизмов взаимодействия трансплантированного материала и организма-реципиента – в частности, установление происхождения кровеносных сосудов в толще клеточного пласта и оценки иммунного ответа и подтипов лейкоцитов, участвующих в нем;

- возможности усиления терапевтических свойств клеточных пластов на основе МСК ЖТ за счет увеличения их паракринной активности, например, с помощью генетической модификации.

Заключение

Таким образом, в данной работе отработан эффективный и быстрый способ получения клеточных пластов из МСК ЖТ, а также проведена оценка их ангиогенных свойств и исследованы события, происходящие после подкожной трансплантации клеточных пластов на ишемизированные скелетные мышцы мыши.

Нами показано, что клеточные пласты из МСК ЖТ обладают выраженными ангиогенными свойствами, защищают ткани от некроза, причем по этим показателям они превосходят внутримышечную инъекцию клеток в эквивалентной дозе. Также было установлено, что трансплантированный клеточный пласт сохраняется до 14 суток в жизнеспособном состоянии, подвергается капиллярной васкуляризации и характеризуется наличием пролиферирующих клеток и умеренным апоптозом.

Полученные данные свидетельствуют о том, что клеточные пласты из МСК ЖТ активно взаимодействуют с организмом реципиента и являются потенциально эффективным средством для терапевтического ангиогенеза при КИНК и связанных с ней хирургических реконструктивных вмешательствах.

Финансирование исследования

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках выполнения Соглашения о предоставлении субсидии от 03.10.2014 за № 14.610.21.0001 (уникальный идентификатор ПНИЭР RFMEFI61014X0001).

Благодарности

Авторы статьи выражают коллегияльную благодарность студентам факультета фундаментальной медицины С.С. Саркисяну и П.А. Родиной за неоцененную помощь при анализе гистологических препаратов и экспериментах на животных.

adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 2013; 15(6): 641-8.

3. Fischer L.J., McIlhenny S., Tulenko T. et al., Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell

ЛИТЕРАТУРА:

1. Myers T.J., Granero-Molto F., Longobardi L. et al., Mesenchymal stem cells at the intersection of cell and gene therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2010; 10(12): 1663-79.

2. Bourin P., Bunnell B.A., Casteilla L. et al., Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded

- growth supplement and shear force. *J. Surg. Res.* 2009; 152(1): 157-66.
4. Hong S.J., Traktuev D.O., March K.L. Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 2010; 15(1): 86-91.
5. Efimenko A.Y., Kochegura T.N., Akopyan Z.A. et al. Autologous stem cell therapy: how aging and chronic diseases affect stem and progenitor cells. *BioResearch Open Access* 2015; 4(1): 26-38.
6. Huang S.J., Fu R.H., Shyu W.C. et al. Adipose-derived stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cell Transplant.* 2013; 22(4): 701-9.
7. Kim E.H., Heo, C.Y., Current applications of adipose-derived stem cells and their future perspectives. *World J. Stem Cells* 2014; 6(1): 65-8.
8. Suzuki E., Fujita D., Takahashi M. et al. Adipose tissue-derived stem cells as a therapeutic tool for cardiovascular disease. *World J. Cardiol.* 2015; 7(8): 454-65.
9. Benoit E., O'Donnell T.F., Patel A.N. Safety and efficacy of autologous cell therapy in critical limb ischemia: a systematic review. *Cell Transplant.* 2013; 22(3): 545-62.
10. Hoefler I.E., van Royen N., Buschmann I.R. et al. Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit. *Cardiovasc Res.* 2001; 49(3): 609-17.
11. Karoubi G., Ormiston M.L., Stewart D.J. et al. Single-cell hydrogel encapsulation for enhanced survival of human marrow stromal cells. *Biomaterials* 2009; 30(29): 5445-55.
12. Aguado B.A., Mulyasmita W., Su J. et al., Improving viability of stem cells during syringe needle flow through the design of hydrogel cell carriers. *Tissue Eng. Part A* 2012; 18(7-8): 806-15.
13. Liu X.H., Bai C.G., Xu Z.Y. et al. Therapeutic potential of angiogenin modified mesenchymal stem cells: angiogenin improves mesenchymal stem cells survival under hypoxia and enhances vasculogenesis in myocardial infarction. *Microvasc. Res.* 2008; 76(1): 23-30.
14. Zubkova E.S., Beloglazova I.B., Makarevich P.I. et al. Regulation of Adipose Tissue Stem Cells Angiogenic Potential by Tumor Necrosis Factor-Alpha. *J. Cell Biochem.* 2015; doi: 10.1002/jcb.25263.
15. Eloumi-Hannachi I., Yamato M., Okano T. Cell sheet engineering: a unique nanotechnology for scaffold-free tissue reconstruction with clinical applications in regenerative medicine. *J. Intern. Med.* 2010; 267(1): 54-70.
16. Yamato M., Utsumi M., Kushida A. et al. Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without disperse by reducing temperature. *Tissue Eng.* 2001; 7(4): 473-80.
17. Yeh T.S., Fang Y.H., Lu C.H. et al. Baculovirus-transduced, VEGF-expressing adipose-derived stem cell sheet for the treatment of myocardium infarction. *Biomaterials* 2014; 35(1): 174-84.
18. Makarevich P., Tsokolaeva Z., Shevelev A. et al. Combined transfer of human VEGF165 and HGF genes renders potent angiogenic effect in ischemic skeletal muscle. *PLoS One* 2012; 7(6): e38776.
19. Boldyreva M.A., Makarevich P.I., Rafieva L.M. et al. Delivery of nerve growth factor (NGF) gene via recombinant plasmid vector induces angiogenesis in murine ischemic hind limb. *Genes and Cells* 2014; 9(4): 81-87.
20. Shevchenko E.K., Makarevich P.I., Tsokolaeva Z.I. et al. Transplantation of modified human adipose derived stromal cells expressing VEGF165 results in more efficient angiogenic response in ischemic skeletal muscle. *J. Transl. Med.* 2013; 11: 138.
21. Sanchez P.L., Fernandez-Santos M.E., Costanza S. et al. Acellular human heart matrix: A critical step toward whole heart grafts. *Biomaterials* 2015; 61: 279-89.
22. Gubareva E.A., Sjoqvist S., Gilevich I.V. et al. Orthotopic transplantation of a tissue engineered diaphragm in rats. *Biomaterials* 2015; 77: 320-35.
23. Sekine H., Shimizu T., Dobashi I. et al. Cardiac cell sheet transplantation improves damaged heart function via superior cell survival in comparison with dissociated cell injection. *Tissue Eng. Part A* 2011; 17(23-24): 2973-80.
24. Makarevich P.I., Dergilev K.V., Tsokolaeva Z.I. et al. Delivery of Genetically Engineered Adipose-Derived Cell Sheets for Treatment of Ischemic Disorders-Development of Application in Animal Models. In *Molecular therapy.* 2015. Nature publishing group, NY 10013-1917 USA.
25. Tatsumi K., Sugimoto M., Lillicrap D. et al. A novel cell-sheet technology that achieves durable factor VIII delivery in a mouse model of hemophilia A. *PLoS One* 2013; 8(12): e83280.
26. Lin C.Y., Lin K.J., Li K.C. et al. Immune responses during healing of massive segmental femoral bone defects mediated by hybrid baculovirus-engineered ASCs. *Biomaterials* 2012; 33(30): 7422-34.
27. Asakawa N., Shimizu T., Tsuda Y. et al. Pre-vascularization of in vitro three-dimensional tissues created by cell sheet engineering. *Biomaterials* 2010; 31(14): 3903-9.
28. Sekiya S., Shimizu T., Yamato M. et al. Bioengineered cardiac cell sheet grafts have intrinsic angiogenic potential. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 341(2): 573-82.
29. Badyaluk S.F. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl. Immunol.* 2004; 12(3-4): 367-77.
30. Zhang M., Guo R., Shi S. et al. Baculovirus vector-mediated transfer of sodium iodide symporter and plasminogen kringle 5 genes for tumor radioiodide therapy. *PLoS One* 2014; 9(3): e92326.
31. Lopatina T., Kalinina N., Karagyaur M. et al. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. *PLoS One* 2011; 6(3): e17899.
32. Shireman P.K., Quinones M.P. Differential necrosis despite similar perfusion in mouse strains after ischemia. *J. Surg. Res.* 2005; 129(2): 242-50.
33. Asahara T., Bauters C., Zheng L.P. et al. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 1995; 92(9 Suppl): II365-71.
34. Weber M.A., Krakowski-Roosen H., Delorme S. et al. Relationship of skeletal muscle perfusion measured by contrast-enhanced ultrasonography to histologic microvascular density. *J. Ultrasound Med.* 2006; 25(5): 583-91.

Поступила: 14.09.2015