

РЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ РЕГИОНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В ГЕЛЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КОМПРЕССИОННОЙ ТРАВМЕ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины
(Россия, 195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4)

Актуальность. При чрезвычайных ситуациях в результате нахождения пострадавших под завалами зданий, сооружений, горных пород, в поврежденном транспорте, шахтах и др. высока вероятность развития синдрома длительного сдавливания (краш-синдром) с ишемическим повреждением больших участков мягких тканей. Нерешенность проблемы оказания медицинской помощи пострадавшим с тяжелой компрессионной травмой обуславливает значимость исследований по разработке новых патогенетически обоснованных способов коррекции постишемических нарушений.

Известна позитивная роль мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) в процессе посттравматической регенерации скелетных мышц.

Цель исследования – выявить морфологические особенности скелетных мышц при тяжелой компрессионной травме после введения в поврежденные ткани ММСК в геле гиалуроновой кислоты.

Методика. Объект исследования составила экспериментальная модель продолжительной (в течение 7 ч) статической компрессии с помощью тисков (сила сдавливания 10–12 кг/см²) мягких тканей бедра тазовой конечности половозрелых белых беспородных крыс-самцов массой 300–340 г. Через 3 ч после снятия тисков крысам опытной группы в область компрессии однократно внутримышечно вверным обкалыванием имплантировали суспензию культивированных ММСК жировой ткани человека ($1,5 \cdot 10^6$ клеток) в 0,5 мл 1,75 % геля гиалуроновой кислоты (Aesthetic Dermal S.L., Испания) в качестве клеточного носителя. Животным контрольной группы в аналогичных условиях вводили 0,9 % раствор натрия хлорида. Для оценки показателей в норме использовали биоматериал интактных крыс. Через 7, 14 и 28 сут после декомпрессии светооптическим методом исследованы гистологические срезы биоматериала области сдавливания.

Результаты и их анализ. Установлено, что имплантация в поврежденные механической компрессией мягкие ткани культивированных ММСК способствует раннему уменьшению зоны некробиотических изменений в зоне компрессии мышц, ускоренному восстановлению микроциркуляции и репаративной регенерации мышечных волокон с активным новообразованием мышечной ткани. Через 7, 14 и 28 сут после травмирующего воздействия относительная площадь мышечных волокон была на 23,0–35,6 % ($p < 0,05$) выше, чем у контрольных животных, и достигала 62,4–85,6 %.

Заключение. Локальная пересадка в область повреждения культивированных ММСК в клеточном носителе может рассматриваться в качестве перспективного подхода к созданию эффективной концентрации внутритканевых факторов роста и цитокинов, регулирующих выраженность воспалительной реакции, ангиогенез и репаративные процессы при массивной механической компрессии мягких тканей.

Ключевые слова: компрессионная травма, краш-синдром, световая микроскопия, регенерация, скелетная мышца, мезенхимная стромальная клетка, гиалуроновая кислота.

Введение

При чрезвычайных ситуациях в результате нахождения людей под завалами зданий, сооружений, горных пород, в поврежденном транспорте, шахтах и др. высока вероятность развития синдрома длительного сдавливания (краш-синдром), обусловленного компресси-

онно-ишемическим повреждением больших участков мягких тканей и, в первую очередь, скелетных мышц [13]. Высокая частота жизнеугрожающих осложнений, неудовлетворительных анатомических и функциональных результатов лечения тяжелых компрессионных травм ставит в центр внимания вопросы

Шулепов Александр Васильевич – мл. науч. сотр., Гос. науч.-исслед. испытат. ин-т воен. медицины (Россия, 195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4);

Шперлинг Наталья Владимировна – д-р мед. наук, ст. науч. сотр., Гос. науч.-исслед. испытат. ин-т воен. медицины (Россия, 195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4);

Юркевич Юрий Васильевич – д-р мед. наук проф., ст. науч. сотр., Гос. науч.-исслед. испытат. ин-т воен. медицины (Россия, 195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4);

✉ Шперлинг Игорь Алексеевич – д-р мед. наук проф., нач. науч.-исслед. упр., Гос. науч.-исслед. испытат. ин-т воен. медицины (Россия, 195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4), e-mail: gniiivm_2@mil.ru

кардинального совершенствования способов коррекции как общих, так и местных механизмов постишемических нарушений [11].

Важную роль в посттравматической регенерации мышечной ткани играет камбиальный клеточный резерв, представленный миосателлитоцитами, пролиферация и дифференциация которых регулируются большим числом внеклеточных факторов [6]. В этой связи в качестве альтернативы существующей стратегии лечения скелетно-мышечных травм могут выступать мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК), способные обеспечивать регенеративное микроокружение и стимулировать собственные репаративные потенции организма [2]. Доказан вклад ММСК в процесс посттравматической регенерации и ревазуляризации поврежденных скелетных мышц [12].

Наибольшее значение в процессах регенерации придается паракринной активности ММСК [1]. В частности, ряд ростовых факторов, продуцируемых ММСК, играют ключевую роль в репаративном миогенезе путем активации миосателлитоцитов и ускоренного образования функционирующей сосудистой сети [9]. Известно, что ММСК присутствуют в организме в качестве тканевого резерва, участвуя в физиологической и репаративной регенерации путем дифференцировки в различные типы клеток мезенхимного происхождения и выработки паракринных факторов, которые способствуют повышению выживаемости поврежденных клеток и активации резидентных предшественников [8]. В этой связи практический интерес представляют эффекты ММСК в аспекте активации посттравматической регенерации в области компрессионно-ишемического повреждения.

Цель – выявить морфологические особенности скелетных мышц при тяжелой экспериментальной компрессионной травме после введения в поврежденные ткани ММСК человека в геле гиалуроновой кислоты.

Материал и методы

Исследование выполнили на 44 половозрелых белых беспородных крысах-самцах массой 300–340 г. Перед проведением эксперимента животных наркотизировали внутримышечным введением смеси кетамина и ксилазина из расчета 60 мг/кг и 10 мг/кг массы тела каждого препарата соответственно [14]. Механической компрессии подвергали правую тазовую конечность на уровне голени в течение 7 ч с силой сдавливания

10–12 кг/см² [7]. В предварительных экспериментах летальность животных после компрессионной травмы достигала 20–40% при средней продолжительности жизни (8 ± 2) сут, что соответствует критерию тяжелой травмы с развитием выраженных местных и системных реперфузионных нарушений [5].

В ходе эксперимента через 3 ч после снятия тисков в область компрессии однократно внутримышечно вверным обкалыванием имплантировали суспензию культивированных ММСК жировой ткани человека ($1,5 \cdot 10^6$ клеток) в 0,5 мл 1,75% геля гиалуроновой кислоты (Hyalift 3,5% Aesthetic Dermal S.L., Испания) в качестве клеточного носителя. Животным контрольной группы в аналогичных условиях вводили 0,9% раствор натрия хлорида. Каждая группа состояла из 18 животных. Для оценки показателей в норме использовали биоматериал 8 интактных крыс.

Культивирование клеток, их иммунофенотипирование и анализ кариотипа полученных культур ММСК проводили с использованием стандартных методик [15].

Эвтаназию с последующим взятием гистологического материала проводили через 7, 14 и 28 сут после декомпрессии конечности с учетом фаз воспаления, пролиферации и регенерации, отражающих этапы посттравматического миогенеза [3]. Для светооптического исследования использовали участки икроножной и камбаловидной мышц голени, которые фиксировали в 10% забуференном растворе формалина. Приготовление гистологических срезов осуществляли автоматизированным методом. Окрашивание готовых гистологических препаратов выполняли по стандартной методике гематоксилином и эозином, анилиновым синим, кислым фуксином по Маллори и трехцветной окраской по Массону. Полученные срезы изучали в световом микроскопе Opton (Германия).

Морфометрическую оценку посттравматической регенерации скелетных мышц проводили определением в 3 случайных полях зрения перинекротической области относительной площади мышечных волокон ($Sm, \%$), а также межмышечного интерстициального пространства ($Sis, \%$) [4]. Расчет площади межмышечного интерстициального пространства и площади мышечных волокон производили с помощью графического пакета ImageJ (НИН, открытая лицензия). Фотосъемку гистологических препаратов проводили с помощью модифицированной микрофотоустановки с использованием цифровой фотокамеры Canon.

Полученные в результате исследования данные обрабатывали с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel, 2013 с последующей обработкой в среде программы Statistica 10.0. Исследование проводили на базе Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Минобороны России в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1989) и требованиями этического комитета.

Результаты и их анализ

Светомикроскопическая характеристика посттравматической регенерации скелетной мышечной ткани. При тяжелой компрессионной травме мышц тазовой конечности крыс, которым в зону сдавления вводили 0,9% раствор хлорида натрия, через 7 сут после снятия тисков во всей толще мышц определялись зоны колликационного некроза с гибелью клеточных элементов вокруг поврежденных сосудов в виде лейкоцитарных и эритроцитарных инфильтратов (рис. 1, а). Значительные изменения наблюдались и в сосудах микроциркуляторного русла в виде набухания эндотелиоцитов и кариолизиса. Наблюдались фрагментация и разрушение мышечных волокон с исчезновением поперечной исчерченности. Эндомизий и перимизий мышечных волокон расширены за счет отека и набухания межучного вещества и коллагеновых волокон. Базальная мембрана мышечных волокон частично или полностью разрушена. Лейкоцитарный вал на границе зоны некроза сформирован из полиморфно-ядерных лейкоцитов. В этих участках визуализируются скопления макрофагов. Параллельно с процессами разрушения мышечных волокон выявляются отдельные фибробласты. Отмечаются начальные признаки регенерации мышечных волокон: миофибриллы отличаются малым диаметром, округленными и деформированными контурами. Имплантация в поврежденные ткани культивированных ММСК сопровождалась отличной динамикой восстановления полиморфно-ядерных лейкоцитов. В этих участках визуализируются скопления макрофагов. Параллельно с процессами разрушения мышечных волокон выявляются отдельные фибробласты. Отмечаются начальные признаки регенерации мышечных волокон: миофибриллы отличаются малым диаметром, округленными и деформированными контурами. Имплантация в поврежденные

ткани культивированных ММСК сопровождалась отличной динамикой восстановления морфофункциональной организации скелетных мышц, подвергнутых продолжительной механической компрессии.

Через 7 сут после травмы при использовании ММСК воспалительный отек в мышцах, подвергнутых компрессии, менее выражен, чем в контрольной группе. Четко различался лейкоцитарный вал из полиморфно-ядерных нейтрофилов на границе некротизированных и относительно слабо поврежденных мышечных волокон. Признаки колликационного некроза менее выражены по сравнению с морфологической картиной в группе контроля (см. рис. 1, б). Макрофагальная реакция незначительно увеличена. В эндомизии – немногочисленные фибробласты и коллагеновые волокна. Преобладают мышечные волокна в состоянии дегенерации или с различной степенью повреждения, что создает предпосылки для внутриклеточной и сателлитно-клеточной регенерации. Количество некротизированных мышечных волокон снижено по сравнению с контролем, что в меньшей степени способствует образованию рыхлой соединительной ткани.

К исходу 2-й недели после компрессионной травмы в поврежденных скелетных мышцах голени у животных контрольной группы сохранялись зоны деструкции в виде дискоидного некроза, которые чередовались с зонами мышечной регенерации. Количество макрофагов, утилизирующих детрит разрушенных мышечных волокон, увеличивалось. Мышечные пространства расширены, заполнены фибробластами и макрофагами. Среди молодых грануляций – секвестры погибших мышечных волокон, а также вновь образованные мышечные волокна. В местах полного разрушения мышечных волокон наблюдалось полное замещение пространства рыхлой соединительной тканью. В толще мышечно-соединительнотканного регенерата выявлялись новообразованные сосуды. Молодые мышечные волокна располагаются хаотично, их параллельный ход нарушен пучками коллагеновых волокон (см. рис. 1, в).

При внутримышечной имплантации суспензии ММСК по сравнению с показателями у крыс в контрольной группе наблюдались большая сохранность миосимпласта, меньшая плотность коллагеновых волокон в рыхлой соединительной ткани (см. рис. 1, г).

Поздний посткомпрессионный период (28 сут после декомпрессии) характеризовался

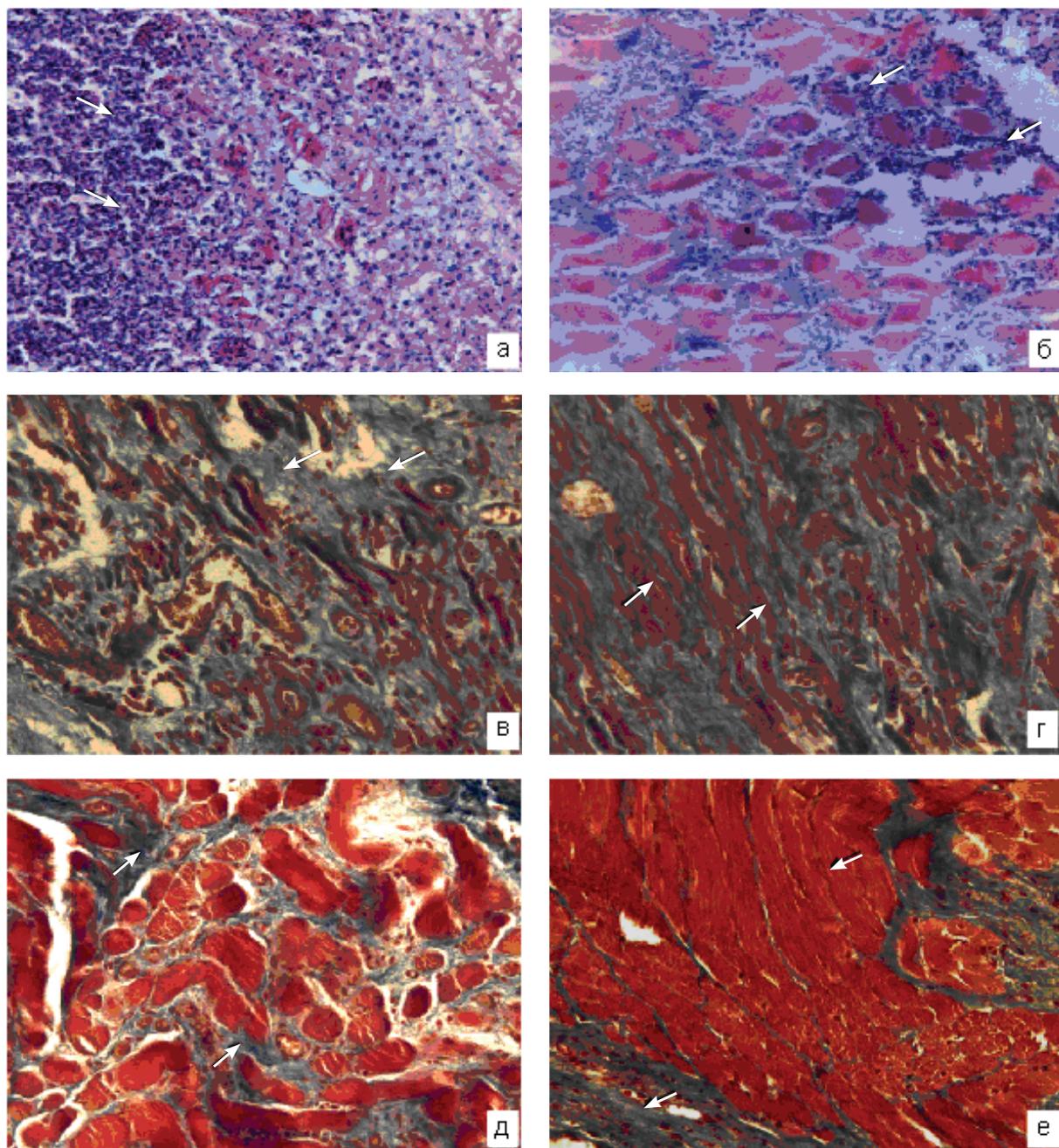


Рис. 1. Светомикроскопическая характеристика мягких тканей в области компрессии голени крыс после регионарного введения суспензии ММСК в геле гиалуроновой кислоты.

а – через 7 сут после компрессионной травмы, введение 0,9% раствора натрия хлорида; очаги некроза в мышечной ткани, лейкоцитарная инфильтрация (стрелки);

б – через 7 сут после компрессионной травмы, введение ММСК в геле гиалуроновой кислоты. Ограниченные участки дегенеративных изменений мышц перинекротической зоны (стрелки);

в – через 14 сут после компрессионной травмы, введение 0,9% раствора натрия хлорида. Рыхлая соединительная ткань в расширенных межмышечных пространствах, вариабельность мышечных волокон (стрелки);

г – через 14 сут после компрессионной травмы, введение ММСК в геле гиалуроновой кислоты. Удлинение и гипертрофия мышечных волокон (стрелки);

д – через 28 сут после компрессионной травмы, введение 0,9% раствора натрия хлорида. Обширные участки плотной волокнистой соединительной ткани; формирование мышечно-соединительнотканного регенерата (стрелки);

е – через 28 сут после компрессионной травмы, имплантация ММСК в геле гиалуроновой кислоты. Формирование мышечно-соединительнотканного регенерата; участки компактных зон рубцовой ткани; восстановление непрерывности мышечных волокон (стрелки).

Окраска: а, б – гематоксилином и эозином; в, г – по Маллори; д, е – по Массону. Ув. 200.

ся преимущественно процессами восстановления мышечных волокон за счет внутриклеточной и сателлитно-клеточной регенерации. Морфологические изменения поврежденных скелетных мышц в исследуемых группах животных имели различия. У крыс в контрольной группе, которым в зону сдавления вводили изотонический раствор хлорида натрия, сохранялись зоны дистрофически измененных мышечных волокон. Параллельно с процессами репаративного миогенеза происходило обильное разрастание рыхлой соединительной ткани, выявлялись деформация мышечных волокон с вплетенными коллагеновыми тяжами, расщепленные волокна миофибрилл с отеком межмиофибрилярного пространства. Мышечно-соединительнотканый регенерат формировался преимущественно за счет соединительнотканного компонента (см. рис. 1, д).

У животных в опытной группе, которым в область компрессионного повреждения производили внутримышечную имплантацию суспензии культивированных ММСК, морфологические изменения поврежденных мышц характеризовались активной дифференцировкой миогенных элементов. Отмечались обширные участки роста новых мышечных структур, отражающих пролиферативную фазу регенерационного гистогенеза, трансформация мышечно-соединительнотканого регенерата с формированием центральных участков соединительной ткани и фрагментами коротких симпластов, заключенных между пучками коллагеновых волокон по периферии, что обуславливает преобладание мышечного компонента в регенерате (см. рис. 1, е).

Морфометрическая оценка посттравматической регенерации скелетных мышц. До нанесения компрессионной травмы мягких тканей голени крысам мышечные волокна расположены компактно и при морфометрическом исследовании в поле зрения занимали площадь 92% (рис. 2).

Сдавление мягких тканей вызывало структурные изменения скелетных мышц в зоне воздействия. Спустя 7 сут после компрессии мягких тканей голени у крыс контрольной группы, которым в зону повреждения локально вводили изотонический солевой раствор, наблюдалось выраженное снижение относительной площади мышечных волокон до 39,5% ($p < 0,05$). В последующие сроки после воздействия (через 14 сут) у животных этой группы отмечалось незначительное (в среднем на 7,9%) повышение площади мышечных

волокон. К исходу наблюдения (через 28 сут) суммарная относительная площадь мышечных волокон составляла в среднем 50%, оставаясь на 42% ($p < 0,05$) ниже, чем у животных до компрессии.

Наиболее выраженное восстановление мышечных волокон отмечалось у травмированных животных после локальной пересадки в гелевом носителе суспензии ММСК человека. Уже к исходу 1-й недели после воздействия относительная площадь мышечных волокон составляла 62,4%, на 22,9% ($p < 0,05$) значительно превышая показатель у контрольных животных. В последующие сроки наблюдения (14-е и 28-е сутки) эти различия были еще более существенными и составляли 31,5% ($p < 0,05$) и 35,6% ($p < 0,05$) соответственно. Относительная площадь мышечных волокон при локальной пересадке клеточного трансплантата в эти сроки наблюдения достигала 78,9 и 85,6% и несущественно отличалась от значений у интактных животных.

Процессу посттравматической регенерации мышечных волокон сопутствовала положительная динамика сокращения зон межмышечных интерстициальных пространств под влиянием клеточного препарата (рис. 3).

Через 7 сут после травмирующего воздействия объем интерстициального пространства у животных с локальной пересадкой ММСК составлял 36,3%, что на 22,2%

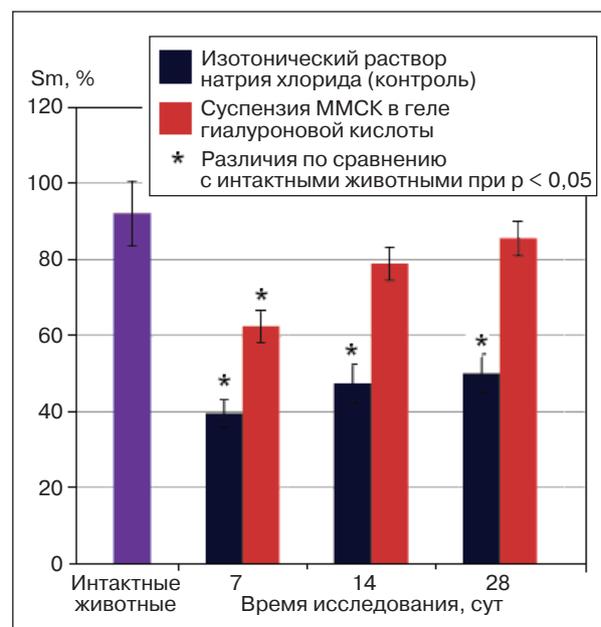


Рис. 2. Относительная площадь мышечных волокон (Sm, %) в области компрессии мягких тканей голени крыс после регионального введения суспензии ММСК в геле гиалуроновой кислоты.

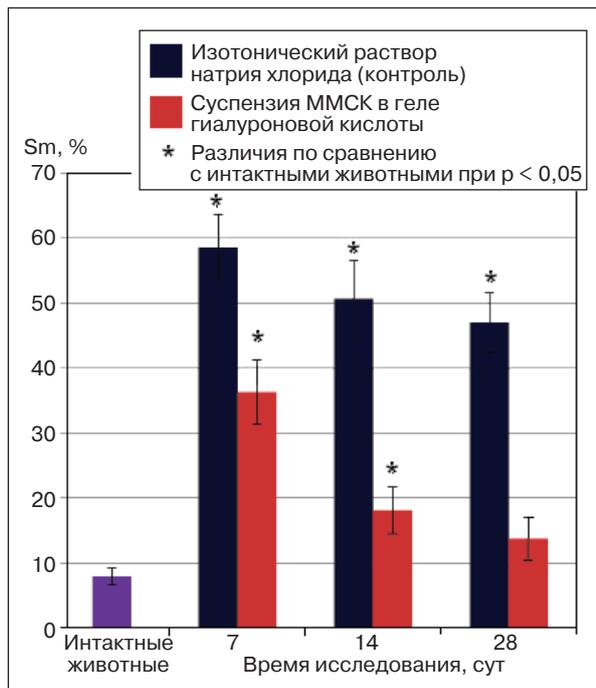


Рис. 3. Относительная площадь межмышечного интерстициального пространства (Sis, %) в области компрессии мягких тканей голени крыс после регионарного введения суспензии ММСК в геле гиалуроновой кислоты.

($p < 0,05$) меньше, чем у животных контрольной группы. Спустя 14 сут после травмы показатель межмышечного интерстициального пространства снижался на 32,5% ($p < 0,05$) по отношению к контролю и составлял 18%, отличаясь на 10% ($p < 0,05$) от исходных значений до нанесения травмы. К исходу 28 сут после компрессионной травмы внутримышечное обкалывание зоны повреждения суспензией ММСК сопровождалось дальнейшим снижением относительной площади интерстициального пространства (на 33,3%, $p < 0,05$) по отношению к контрольным животным, получавшим изотонический солевой раствор. Относительная площадь межмышечных интерстициальных пространств составляла 13,7%, недостоверно отличаясь от значений, установленных у интактных животных.

Таким образом, в ранние сроки после компрессии в мягких тканях образуются зоны колликационного некроза, в которых происходит последующее формирование мышечно-соединительнотканного регенерата с преимущественным развитием соединительной ткани. Имплантация в поврежденные механической компрессией мягкие ткани гелевого препарата на основе культивированных ММСК человека обеспечивает уменьшение зоны перитравматических нарушений, спо-

собствует ускоренному восстановлению микроциркуляции и репаративной регенерации поврежденных мышечных волокон с активным новообразованием мышечной ткани. Морфометрический анализ посткомпрессионных нарушений в скелетной мышце позволил выявить структурные перестройки, свидетельствующие о массивной посттравматической дегенерации мышечной ткани с существенным увеличением доли межмышечных интерстициальных пространств и их замещением соединительной тканью. Локальная клеточная инфильтрация поврежденных скелетных мышц суспензией ММСК приводила к увеличению доли мышечного компонента мышечно-соединительнотканного регенерата и снижению степени формирования фиброза.

Обсуждение. Выявленные морфологические изменения скелетных мышц при экспериментальной компрессионной травме свидетельствуют о возможности активации комплекса регенераторных процессов в модулях микроциркуляции и посттравматического миогистогенеза имплантацией в поврежденные ткани культивированных ММСК человека. Стимулирующее влияние ММСК в геле гиалуроновой кислоты на восстановление мышечной ткани после травмирующего воздействия формирует структурно-функциональную основу ремоделирования полноценного мышечно-соединительнотканного регенерата с преимущественным содержанием мышечного компонента. Известно, что ММСК при внутривенном введении мигрируют в зоны воспаления и фиброза, обуславливая снижение экссудации и раннего фиброза [10]. В наших экспериментах пересадка ММСК в область компрессионного повреждения также способствовала уменьшению проницаемости сосудистой стенки и выраженности интерстициального отека. При этом ММСК оказывали протективное действие на миосимпласт и активность клеток, формирующих лейкоцитарный вал вокруг зоны некроза, регулируя состояние водного баланса межклеточного пространства в мышечной ткани.

Важным фактором в восстановлении мышечной ткани после компрессионного воздействия является активность пролиферативных процессов. При повреждении мышц и сохранении камбиального резерва мышечной ткани наблюдаются гиперплазия миосателлитов с последующей миобластной трансформацией, активация и рост миобластов в обход некротических тканей и формирование незрелых мышечных волокон [6].

В условиях значительных повреждений мышечных волокон регенераторная способность мышечной ткани снижена, и на месте дефекта преимущественно формируется рыхлая грануляционная ткань [7]. Под влиянием препарата на основе ММСК наблюдалась активная регенерация мышц в области компрессионной травмы. В рассматриваемой нами ксенотрансплантационной системе клеточной трансплантации механизм повышения регенеративной активности в области повреждения может объясняться паракринными эффектами ММСК, опосредующими восстановление микроциркуляции, уменьшение зон вторичного некроза, усиление гистогенеза скелетной мышечной ткани.

Заключение

Локальная пересадка в область повреждения культивированных ММСК в клеточном носителе может рассматриваться в качестве перспективного подхода к созданию эффективной концентрации внутритканевых факторов роста и цитокинов, регулирующих выраженность воспалительной реакции, ангиогенез и репаративные процессы при массивной механической компрессии мягких тканей.

Литература

1. Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б. Паракринная активность мультитипотентных мезенхимальных стромальных клеток и ее особенности в условиях гипоксии // Физиология человека. 2013. Т. 39, № 3. С. 104–113.
2. Домарацкая Е.И., Шевелева О.Н., Ромазанова С.Г. Участие мезенхимных стромальных клеток в регенерации мышечной ткани // 2-й Национальный конгресс по регенеративной медицине: материалы конгр. (3–5 декабря 2015 г., Москва). М., 2015. С. 63–64.
3. Лебедева А.И. Аллогенный губчатый биоматериал – ингибитор фиброза поврежденной скелетной мышечной ткани // Рос. биотерапевт. журн. 2014. Т. 13, № 4. С. 37–44.
4. Мавликеев М.О., Плотников М.В., Максимов А.В. [и др.]. Патогистологическая оценка состояния скелетной мышцы после прямой генной терапии vegf165 пациентов с хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей // Гены и клетки. 2014. Т. 9, № 3. С. 105–111.

5. Магомедов К.К., Эмирбеков Э.З., Бакуев М.М., Шахбанов Р.К. Влияние перфторана на антиоксидантные системы в крови крыс при синдроме длительного сдавливания // Фундаментальные исслед. 2013. № 10. С. 781–784.
6. Одинцова И.А., Чепурненко М.Н., Комарова А.С. Миосателлитоциты – камбиальный резерв поперечнополосатой мышечной ткани // Гены и клетки. 2014. Т. 9, № 1. С. 2–14.
7. Трухан А.П., Жидков С.А., Корик В.Е. [и др.]. Влияние силы компрессии конечности на выраженность морфологических изменений при синдроме длительного сдавливания // Новости хирургии. 2013. Т. 21, № 5. С. 18–23.
8. Buravkova L., Andreeva T., Gogvadze V., Zhivotovsky B. Mesenchymal stem cells and hypoxia: where are we? // Mitochondrion. 2014. N 19, Pt A. P. 105–112.
9. Merritt E.K., Cannon M.V., Hammers D.W. [et al.]. Repair of Traumatic Skeletal Muscle Injury with Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Seeded on Extracellular Matrix // Tissue eng. 2010. Vol. 16, N 9. P. 2871–2881.
10. Moodley Y., Atienza D., Manuelpillai U. [et al.]. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce fibrosis of bleomycin-induced lung injury // Am. J. Pathol. 2009. Vol. 175, N 1. P. 303–313.
11. Murata I., Goto M., Komiya M. [et al.]. Early Therapeutic Intervention for Crush Syndrome: Characterization of Intramuscular Administration of Dexamethasone by Pharmacokinetic and Biochemical Parameters in Rats // Biol. Pharm. Bull. 2016. Vol. 39, N 9. P. 1424–1431.
12. Quintero A.J., Wright V.J., Fu F.H., Huard J. Stem cells for the treatment of skeletal muscle injury // Clin. Sports Med. 2009. Vol. 28, N 1. P. 1–11.
13. Reis N.D., Better O.S. Mechanical muscle-crush injury and acute muscle-crush compartment syndrome: with special reference to earthquake casualties // J. Bone Joint Surg. Br. 2005. Vol. 87, N 4. P. 450–453.
14. Shi M., Ishikawa M., Kamei N. [et al.]. Acceleration of skeletal muscle regeneration in a rat skeletal muscle injury model by local injection of human peripheral blood-derived CD133-positive cells // Stem Cells. 2009. Vol. 27, N 4. P. 949–960.
15. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. [et al.]. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies // Tissue eng. 2001. Vol. 7, N 2. P. 211–228.

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Поступила 20.02.2018 г.

Для цитирования. Шулепов А.В., Шперлинг Н.В., Юркевич Ю.В., Шперлинг И.А. Регенеративные эффекты регионального применения мезенхимных стромальных клеток человека в геле гиалуроновой кислоты при экспериментальной компрессионной травме мягких тканей // Мед.-биол. и соц.-психол. пробл. безопасности в чрезв. ситуациях. 2018. № 1. С. 75–83. DOI 10.25016/2541-7487-2018-0-1-75-83.

Regenerative effects of regional introduction of mesenchymal stromal human cells in hyaluronic acid gel under experimental compression trauma of soft tissues

Shulepov A.V., Shperling N.V., Yurkevich Yu.V., Shperling I.A.

State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine
(Lesoparkovaya Str., 4, St. Petersburg, 195043, Russia)

✉ Alexander Vasilevich Shulepov – Junior Research Associate, State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine (Lesoparkovaya Str., 4, St. Petersburg, 195043, Russia), e-mail: gniiivm_2@mil.ru;
Natalia Vladimirovna Shperling – Dr. Med. Sci., Senior Research Associate, State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine (Lesoparkovaya Str., 4, St. Petersburg, 195043, Russia), e-mail: gniiivm_2@mil.ru;
Yuri Vasilyevich Yurkevich – Dr. Med. Sci. Prof., Senior Research Associate, State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine (Lesoparkovaya Str., 4, St. Petersburg, 195043, Russia), e-mail: gniiivm_2@mil.ru;
Igor' Alekseevich Shperling – Dr. Med. Sci. Prof., Chief of the Research Department, State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine (Lesoparkovaya Str., 4, St. Petersburg, 195043, Russia), e-mail: gniiivm_2@mil.ru

Abstract

Relevance. In emergency situations, cases of crush syndrome with extensive ischemic damage of soft tissues often occur due to prolonged compression from damaged buildings, structures, rocks, damaged transport, mines, etc. Unmet medical need for providing care to victims with severe compression trauma determines the importance of research on the development of new pathogenetically justified treatments of postischemic disorders. The positive role of multipotent mesenchymal stromal cells has been proved in the process of posttraumatic regeneration of skeletal muscles.

Intention. To reveal morphological features of skeletal muscles in severe compression trauma after the introduction of multipotent mesenchymal stromal cells in the hyaluronic acid gel into the damaged tissues.

Methods. The object of the study was an experimental model of a continuous (7-hour) static compression (squeezing force 10–12 kg/cm²) of the soft tissues of the hip by metal vices in sexually mature white outbred male rats with body mass of 300–340 g. Three hours after the vices removal, rats in the experimental group received a single fan-shaped injection of suspended cultured multipotent mesenchymal stromal cells of human adipose tissue ($1.5 \cdot 10^6$ cells) in 0.5 ml of 1.75% hyaluronic gel solution (Aesthetic Dermal S.L., Spain) intramuscularly into the compression region. Control animals under similar conditions were injected with an 0.9% solution of sodium chloride. For reference parameters, biomaterial from intact rats was used. In 7, 14 and 28 days after decompression by the light-optical method, the histological sections of the biomaterial from the compression region were examined.

Results and Discussion. It has been established that implantation of cultured multipotent mesenchymal stromal cells in soft tissues damaged by mechanical compression contributes to an early reduction of necrobiotic changes in the zone of muscle compression, accelerated recovery of microcirculation and reparative regeneration of muscle fibers with an active new growth of muscle tissue. Seven, 14 and 28 days after exposure, the relative area of muscle fibers was 23 35.6% ($p < 0.05$) higher than in control animals and achieved 62.4–85.6%.

Conclusion. It has been suggested that cultured multipotent mesenchymal stromal cells in a cellular carrier locally transplanted into the lesion region can be considered as a fruitful way to create effective concentrations of interstitial growth factors and cytokines that regulate severity of the inflammatory reaction, angiogenesis and reparative processes resulted from massive mechanical compression of soft tissues.

Keywords: compression trauma, crush syndrome, light microscopy, regeneration, skeletal muscle, mesenchymal stromal cell, hyaluronic acid.

References

1. Andreeva E.R., Buravkova L.B. Parakrinnaya aktivnost' mul'tipotentnyh mezenhimal'nyh stromal'nyh kletok i ee osobennosti v usloviyah gipoksi [Paracrine activity of multipotent mesenchymal stromal cells and its modulation in hypoxia]. *Fiziologiya cheloveka* [Human Physiology]. 2013. Vol. 39, N. 3. Pp. 315–322. (In Russ.)
2. Domarackaja E.I., Sheveleva O.N., Romazanova S.G. Uchastie mezenhimnyh stromal'nyh kletok v regeneracii myshechnoj tkani [The involvement of mesenchymal stromal cells in the regeneration of muscle tissue]. *2 Nacional'nyj kongress po regenerativnoj medicene* : Scientific. Conf. Proceedings [2nd National Congress of Regenerative Medicine]. Moskva. 2015. Pp. 63–64. (In Russ.)
3. Lebedeva A.I. Allogennyj gubchatyj biomaterial – ingibitor fibroza povrezhdennoj skeletnoj myshechnoj tkani [Allogeneic spongiform biomaterial – inhibitor of fibrosis in damaged skeletal muscular tissue] *Rossijskij bioterapevticheskij zhurnal* [Russian Journal of bioterapy]. 2014. Vol. 13, N 4. Pp. 37–44. (In Russ.)
4. Mavlikeev M.O., Plotnikov M.V., Maksimov A.V. [et al.]. Patogistologicheskaya ocenka sostoyaniya skeletnoj myshcy posle pryamoj gennoj terapii vegf165 pacientov s hronicheskimi obliteriruyushchimi zabolevaniyami arterij nizhnih konechnostej [Pathohistological assessment of skeletal muscles after direct gene therapy with vegf165 in patients with peripheral arterial diseases]. *Geny i kletki* [Genes & Cells]. 2014. Vol. 9, N 3. Pp. 105–111. (In Russ.)
5. Magomedov K.K., Emirbekov E.Z., Bakuev M.M., Shakhbanov R.K. Vliyanie perftorana na antioksidantnye sistemy v krovi krys pri sindrome dlitel'nogo sdavlivaniya [Influence of perftoran on antioxidant enzymes in the blood of rats during prolonged compression syndrome]. *Fundamental'nye issledovaniya* [Fundamental Research]. 2013. N 10. Pp. 781–784. (In Russ.)
6. Odintsova I.A., Chepurnenko M.N., Komarova A.S. Miosatellitocity-kambial'nyj rezerv poperechnopolosatoj myshechnoj tkani [Myogenic satellite cells as a cambial reserve of muscle tissue]. *Geny i kletki* [Genes & Cells]. 2014. Vol. 9, N 1. Pp. 2–14. (In Russ.)

7. Trukhan A.P., Zhidkov S.A., Korik V.E. [et al.]. Vliyanie sily kompressii konechnosti na vyrazhennost' morfologicheskikh izmenenij pri sindrome dlitel'nogo sdavleniya [The influence of limb compression force on intensity of morphological changes during crush syndrome. *Novosti Khirurgii* [Surgery news]. 2013. Vol. 21, N 5. Pp. 18–23. (In Russ.)

8. Buravkova L., Andreeva T., Gogvadze V., Zhivotovsky B. Mesenchymal stem cells and hypoxia: where are we? *Mitochondrion*. 2014. N 19, Pt A. Pp. 105–112.

9. Merritt E.K., Cannon M.V., Hammers D.W. [et al.]. Repair of Traumatic Skeletal Muscle Injury with Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Seeded on Extracellular Matrix. *Tissue eng*. 2010. Vol. 16, N 9. Pp. 2871–2881.

10. Moodley Y., Atienza D., Manuelpillai U. [et al.]. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce fibrosis of bleomycin-induced lung injury. *Am. J. Pathol*. 2009. Vol. 175, N 1. Pp. 303–313.

11. Murata I., Goto M., Komiya M. [et al.]. Early Therapeutic Intervention for Crush Syndrome: Characterization of Intramuscular Administration of Dexamethasone by Pharmacokinetic and Biochemical Parameters in Rats. *Biol. Pharm. Bull*. 2016. Vol. 39, N 9. Pp. 1424–1431.

12. Quintero A.J., Wright V.J., Fu F.H., Huard J. Stem cells for the treatment of skeletal muscle injury. *Clin. Sports Med*. 2009. Vol. 28, N 1. Pp. 1–11. DOI 10.1155/2012/282348.

13. Reis N.D., Better O.S. Mechanical muscle-crush injury and acute muscle-crush compartment syndrome: with special reference to earthquake casualties. *J. Bone Joint Surg. Br*. 2005. Vol. 87, N 4. Pp. 450–453.

14. Shi M., Ishikawa M., Kamei N. [et al.]. Acceleration of skeletal muscle regeneration in a rat skeletal muscle injury model by local injection of human peripheral blood-derived CD133-positive cells. *Stem Cells*. 2009. Vol. 27, N 4. Pp. 949–960.

15. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. [et al.]. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue eng*. 2001. Vol. 7, N 2. Pp. 211–228. DOI 10.1089/107632701300062859.

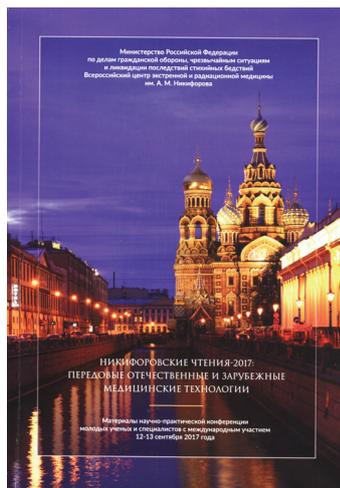
Received 20.02.2018

For citing: Shulepov A.V., Shperling N.V., Yurkevich Yu.V., Shperling I.A. Regenerativnye efekty regionalnogo primeneniya mezenkhimnykh stromal'nykh kletok cheloveka v gele gialuronovoi kisloty pri eksperimental'noi kompressionnoi travme myagkikh tkanei *Mediko-biologicheskie i sotsial'no-psikhologicheskie problemy bezopasnosti v chrezvychaynykh situatsiyakh*. 2018. N 1. Pp. 75–83. (In Russ.)

Shulepov A.V., Shperling N.V., Yurkevich Yu.V., Shperling I.A. Regenerative effects of regional introduction of mesenchymal stromal human cells in hyaluronic acid gel under experimental compression trauma of soft tissues. *Medico-Biological and Socio-Psychological Problems of Safety in Emergency Situations*. 2018. N 1. Pp. 75–83. DOI 10.25016/2541-7487-2018-0-1-75-83.



Вышла в свет книга



Никифоровские чтения-2017: передовые отечественные и зарубежные медицинские технологии : материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов с международным участием / под ред. С.С. Алексанина ; Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России. СПб., 2017. 130 с.

Представлены материалы 43 докладов конференции по актуальным проблемам безопасности жизнедеятельности человека, организации здравоохранения и медицины, прошедшей 12–13 сентября 2017 г. во Всероссийском центре экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России (Санкт-Петербург).