

Экспериментальная оценка возможности адгезии и роста мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани на полипропиленовом сетчатом имплантате, применяемом для герниопластики

*1 Военно-медицинский факультет в УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
2 ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» Минск, Беларусь*

Впервые в эксперименте *in vitro* доказана возможность адгезии и роста мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани на полипропиленовом сетчатом имплантате, применяемом для аллопластических методов герниопластики. Установлено, что исследованный вариант полипропиленовой сетки (эндопротез-сетка «Линтекс-эсфил тяжелый») не обеспечивает высокую степень фиксации стволовых клеток. Присутствие полипропиленового сетчатого имплантата оказывало стимулирующее влияние на рост культуры мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани. Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, жировая ткань, полипропиленовый сетчатый имплантат, аллотрансплантация, герниопластика.

Хирургическое лечение вентральных грыж является чрезвычайно важной и актуальной проблемой реконструктивной и пластической хирургии [1, 2, 8, 9, 13]. Ежегодно в мире выполняется более 20 миллионов операций по поводу наружных грыж живота, в том числе несколько миллионов сочетается с имплантацией аллогенных сетчатых протезов [1, 14, 22].

Широкое использование синтетических материалов для укрепления зоны пластики при грыжах брюшной полости (в частности, полипропиленовой сетки) в течение уже более чем полувека подтверждает актуальность высказывания великого австрийского хирурга Ch.A.Th. Billroth (1829-1894) о том, что «если можно было бы искусственно создать ткань, по плотности и крепости равную фасции и сухожилию, то секрет радикального излечения грыж был бы найден», продолжая определять главный девиз современной хирургической герниологии [11, 31]. К сожалению, все созданные к сегодняшнему дню эндопротезы обладают как положительными, так и отрицательными характеристиками [1, 7, 15, 21, 26, 27, 30].

Разработка кардинально новых материалов и методов хирургического лечения грыж живота напрямую связана с экспериментальными исследованиями, основная задача которых заключается в снижении активности и продолжительности процесса хронического воспаления в окружающих сетчатый имплантат тканях, с одновременным формированием морфологически и функционально полноценной соединительной ткани в зоне пластики [1, 5, 12, 21]. Инновационными в этом направлении являются работы, выполненные на стыке хирургии и клеточных технологий, авторы которых изучают возможность применения культуры фибробластов в качестве активной составляющей композиционных синтетических имплантатов [12, 17, 19-21, 25, 28]. Так, S. Kyzer с соавт. (1997) в условиях эксперимента установил положительное влияние на процессы регенерации тканей сетки на основе полигликолевой кислоты с фиксированными на них фибробластами [28].

Поиск, проведенный в библиографической базе данных MEDLINE, по запросу (polypropylene mesh cultured with fibroblasts) определил в этом плане наличие основных пяти литературных источников. Исследованиями M.A. Continenza с соавт. (2003) и M. Kapischke с соавт. (2005) доказана возможность покрытия дермальными человеческими фибробластами различных вариантов полипропиленовых сеток *in vitro* с вероятностью их клинического использования в будущем [19, 25]. По данным C. Langer с соавт. (2005), изучавших *in vitro* возможность роста человеческих фибробластов, культивированных на

трех различных вариантах полипропиленовых сеток, поверхность полимера и его структура имеет существенное значение для клеточной биосовместимости сеток. Человеческие фибробласты предпочтительно растут на сетках с низким содержанием полипропилена, тонкими волокнами, и на сетчатых узлах [20]. D. Weyhe с соавт. (2007) на основании анализа изменения уровня трансформирующего фактора роста - β 1 (TGF-beta1), определяющего чужеродную реакцию на аллопластические материалы, в культуре крысиных фибробластов, культивированных в присутствии 4 вариантов полипропиленовых сеток, применяемых для пластики наружных грыж живота, обнаружили, что ранняя биологическая клеточная реакция фибробластов в большей степени зависит от состава и типа материала [29]. В работе R. Rosch с соавт. (2006) изучен синтез металлопротеиназы-2 (ММР-2) культурой фибробластов кожи пациентов с рецидивными послеоперационными грыжами после инкубации их с сетчатыми материалами. Установлено, что в результате контакта культуры фибробластов с полипропиленовым имплантатом происходит снижение синтеза и активности ММР-2 [17].

Среди русскоязычных источников, касающихся данного вопроса, заслуживает внимание исследование В.Н. Егиева с соавт. (2006), которые провели экспериментальное изучение возможности и степени фиксации фибробластов, полученных из биопсийного материала кожи, на различных синтетических протезах (полиэфирных и полипропиленовых сетках), используемых для пластики дефектов передней брюшной стенки [12]. Вместе с тем в представленном материале, в отличие от работ, выявленных с помощью MEDLINE, в которых оценка количества фибробластов проводится с использованием электронной микроскопии, о количестве клеток, выросших на сетчатых имплантатах, российские авторы судили опосредованно (по концентрации белка, определяемой спектрофотометрическим методом).

Таким образом, проблема хирургического лечения наружных грыж живота к настоящему времени вышла за рамки традиционных (аутопластических) оперативных методов и в настоящее время требует комплексного (в том числе, и тканеинженерного) подхода, основу которого составляют положения из области клеточной биологии:

- во-первых, это учение о мезенхимальных стволовых клетках (МСК), неотъемлемым свойством которых является способность к пролиферации и мультилинейной дифференцировке;
- во-вторых, данные и том, что наиболее доступным источником МСК является жировая ткань (ЖТ);
- в-третьих, МСК обладают высоким пролиферативным потенциалом, низкой иммуногенностью, способностью дифференцироваться в разные типы клеток соединительной ткани [3, 6, 16, 18, 23, 24].

Отсутствие работ о результатах применения МСК из жировой аутокани для реализации комплексного тканеинженерного подхода в герниологии явилось основанием для проведения пилотного экспериментального исследования, целью которого явилось изучение *in vitro* возможности адгезии и роста МСК ЖТ на полипропиленовом сетчатом имплантате, применяемом для аллопластических методов герниопластики.

Материалы и методы

1. Объекты.

Объектом исследования явились МСК ЖТ белой беспородной крысы (возраст 6 месяцев, масса тела 215 г.), культивированные на полимерном эндопротезе-сетке «Линтекс-эсфил тяжелый» (Россия, г. Санкт-Петербург).

Сетка «Линтекс-эсфил тяжелый» состоит из нерассасывающихся полипропиленовых мононитей диаметром 0,14 мм (рисунок 1). Толщина сетки 0,65 мм, поверхностная плотность 95 г/м², объемная пористость 80%. Использование этого вида полипропиленовой сетки показано для хирургического лечения грыж различных локализаций в тех случаях, когда ткани испытывают повышенные нагрузки. Она рекомендуется для хирургического лечения гигантских вентральных грыж у тучных пациентов [4].

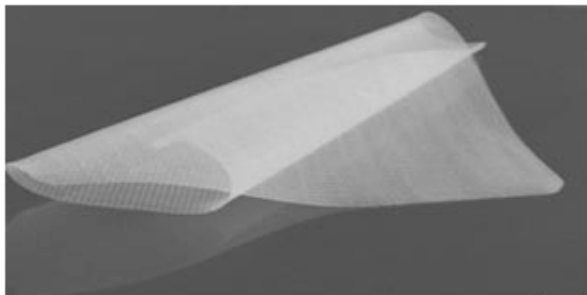


Рисунок 1 – Эндопротез-сетка «Линтекс-эсфил тяжелый»

Выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани крысы.

2. Методы.

В стерильных условиях под внутрибрюшным тиопенталовым наркозом (40 мг/кг массы животного) производили забор ЖТ из внутрибрюшинного пространства. После промывания стерильным раствором Хенкса ЖТ инкубировали в течение 45 минут с 0,075%-ым раствором коллагеназы I типа («Sigma», Германия) в фосфатнобуферном физиологическом растворе (PBS). Нейтрализацию фермента проводили равным объемом PBS, содержащего 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (НИИ ЭиМ, РБ). Полученные в результате обработки коллагеназой клетки отмывали 2 раза центрифугированием, клеточный осадок ресуспензировали в культуральной среде и высевали в концентрации $3-4 \cdot 10^5$ клеток на см² в культуральные чашки диаметром 60 мм. Через 24 часа производили смену культуральной среды для удаления неприкрепившихся клеток. В дальнейшем смена среды производилась каждые четвертые сутки. По достижении культурами $\gg 75\%$ конфлюэнтности, клетки снимались с поверхности культурального пластика с помощью 0,25% р-ра трипсина/ЭДТА, затем активность трипсина ингибировалась добавлением PBS, содержащего 10% ЭТС; после двукратного отмывания центрифугированием клетки засеивались в культуральные чашки в концентрации $2,5 \cdot 10^4$ клеток на см² для получения первого пассажа [24]. Аналогично получали 2-й и 3-й пассажи по достижении предыдущим пассажем $\gg 75\%$ конфлюэнтности. Клетки культивировали в среде Mesencult Murine (StemCell Technologies, Canada), содержащей 10% Murine Supplement (StemCell Technologies, Canada), 1% смеси антибиотика и 1% глутамина (Sigma). Для экспериментов с сетками использовали МСК 2-3 пассажей.

Культивирование МСК в контакте с сеткой.

Образцы сетки размером 20×20 мм (4 см²) помещали в культуральные чашки Петри Æ 30 мм (площадь дна 8 см²) и прижимали к дну полипропиленовыми грузиками во избежание всплывания. В контрольные чашки сетки не помещали. Опыты ставились в триплетах.

Вариант 1:

Дно чашек было покрыто пленкой Parafilm с целью уменьшения адгезии клеток к дну чашки. МСК 2-го пассажа засеивали в количестве $5 \cdot 10^4$ (50 000) клеток на чашку в 3 мл питательной среды MesenCult Murine. При посеве содержимое чашки осторожно

перемешивали в течение 5 минут круговыми движениями чашки. Ожидалось, что при условии хорошей адгезии клеток к сетке такой способ посева и культивирования мог изменить распределение клеток между дном и сеткой в пользу сетки. Инкубировали 7 суток.

Вариант 2:

Дно чашек не было закрыто. Перед посевом сетки дважды промывали PBS, т.к. при работе по варианту 1 было замечено, что при инкубации с сеток в среду смываются неустановленные ПАВ, образующие пленки на поверхности. МСК 3-го пассажа заседали в количестве $1 \cdot 10^5$ (100 000) клеток на чашку в 3 мл питательной среды Mesencult Murine. Инкубировали 7 суток.

Люминесцентная микроскопия.

По окончании инкубации среду в чашке осторожно заменяли на PBS, содержащий смесь ДНК-тропных люминесцентных красителей: Хехст-33342 (проникает через интактную плазматическую мембрану (ПМ), окрашивает ядра живых и мертвых клеток, имеет голубую флуоресценцию) и йодистый пропидий (не проникает через интактную ПМ, окрашивает ядра только мертвых клеток, имеет красную флуоресценцию). Инкубировали 10 минут, после чего микроскопировали в режиме эпифлуоресценции, сфокусировав микроскоп так, чтобы в поле зрения не было слоя клеток на дне чашки.

Подсчет клеток.

По окончании инкубации сетку извлекали, ополаскивали в PBS для удаления неприкрепленных клеток и помещали в культуральную чашку с 1 мл 0,25% р-ра трипсина/ЭДТА. Из чашки, в которой проходила инкубация, удаляли среду, ополаскивали PBS, после чего чашку трипсинизировали. В камере Горяева подсчитывали количество клеток, снятых с сетки и со дна культурального пластика.

Статистическая обработка полученных результатов.

Статистическая обработка данных осуществлена с применением прикладного программного пакета «STATISTICA 6,0» (Version 6-Index, StatSoft Inc., США), адаптированного для медико-биологических исследований. [10]. Оценку достоверности различий выполняли непараметрическим методом с использованием критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test) [10].

Результаты и обсуждение

При микроскопии на сетках были обнаружены единичные клетки и небольшие группы клеток, в основном в местах переплетения нитей (рисунки 2-4). Прикрепленные к сетке клетки были живыми (при этом отмечалась голубая флуоресценция ядер) и распластанными.

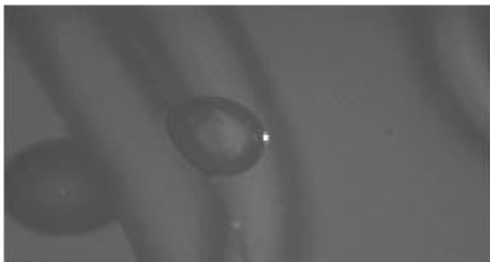


Рисунок 2 - Единичная клетка на сетке, вариант с неадгезивным покрытием дна чашки. Ув. $\times 100$

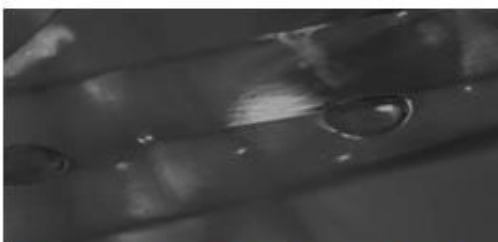
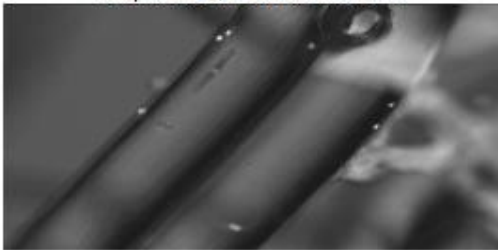


Рисунок 3, 4 - Группы клеток на сетке, вариант с адгезивным дном чашки. Ув. $\times 100$

Кроме клеток, узнаваемых по наличию ядер, на сетках было много флуоресцирующего материала невыясненной природы.

Результаты подсчета клеток, снятых трипсином с сетчатого имплантата и со дна чашки при различных вариантах культивирования МСК приведены в таблице.

Таблица. Количество клеток, снятых трипсином с сетчатого имплантата и со дна культурального пластика при различных вариантах культивирования МСК

Вариант	Снято трипсином со дна чашки, $m \pm m$	Снято трипсином с сетки, $m \pm m$
Адгезивное дно, сетка (n=12)	2 516 667 \pm 584 523*	4 833 \pm 1 749
Адгезивное дно, контроль (n=6)	1 875 000 \pm 488 714	-
Неадгезивное дно, сетка (n=12)	121 667 \pm 20 412	1 333 + 1 154
Неадгезивное дно, контроль (n=6)	110 000 \pm 21 602	-

Примечание - * - достоверность различий ($p < 0,05$) по сравнению с вариантом неадгезивное дно, сетка.

Таким образом, способность исследованной сетки обеспечивать адгезию МСК была невысокой. В варианте с неадгезивным дном чашки подавляющее большинство клеток не прикреплялось ни к дну чашки, ни к сетке и гибло (претерпевало апоптоз, судя по наличию в среде к 4-му дню культивирования ДНК-содержащих фрагментов, которые могут быть классифицированы как апоптотические тельца). В варианте с адгезивным дном на чашке происходил нормальный рост культуры, однако заселение сетки было медленным.

Среди двух гипотез, объясняющих наличие прикрепленных клеток на сетке: 1) наличием на неадгезивной для МСК поверхности небольшого количества сайтов, обеспечивающих адгезию любых МСК и 2) наличием среди МСК небольшой популяции клеток, способных прикрепляться к гидрофобной поверхности, не поддерживающей адгезию других МСК – более вероятной представляется вторая, с учетом обнаруженных групп клеток, которые могут представлять колонии, произошедшие каждая от одной прикрепившейся клетки.

Оригинальная статья

Дополнительным фактором, ограничивающим скорость заселения сетки, могло стать ограниченное количество мест, в которых сетка контактировала с дном или была удалена от него на расстояние, не превышающее толщину клетки (из-за несовершенства системы придавливания сетки к дну чашки).

Превышение общего количества МСК по окончании инкубации в варианте с адгезивным дном в чашках при наличии сетки по сравнению с теми, где сетки не было, может объясняться как непосредственным стимулирующим действием контакта МСК с сеткой, так и тем, что при перемещениях чашек сетка способствовала перераспределению клеток по дну чашки, уменьшая влияние контактного торможения роста.

Выводы

1. Впервые в эксперименте *in vitro* доказана возможность адгезии и роста мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани на полипропиленовом сетчатом имплантате, применяемом для аллопластической герниопластики.

2. Исследованный вариант полипропиленовой сетки (эндопротез-сетка «Линтекс-эсфил тяжелый») не обеспечивает высокую степень фиксации стволовых клеток. Необходим поиск нового оптимального аллопластического материала для клеточной матрицы мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани.

3. Существует необходимость дальнейшего изучения, в том числе и *in vivo*, популяционного состава стволовых клеток, прикрепляющихся к сетке, а также характера происходящих цитологических изменений в тканях в зоне аллопластики.

4. Присутствие полипропиленового сетчатого имплантата оказывало стимулирующее влияние на рост культуры мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани.

Литература

1. Егиев, В. Н. Современное состояние и перспективы герниологии / В.Н. Егиев // Герниология. 2006. № 2. С. 5–10.

2. Жебровский, В. В. Хирургия грыж живота и эвентраций / В. В. Жебровский, Мохаммед Том Эльбашир. Симферополь: Бизнес-Информ. 2002. 440 с.

3. Карпюк, В. Б. Сравнительная характеристика мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани / В. Б. Карпюк, С.В. Коченова, М. Г. Шубич // Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии. 2005. № 2. С. 46–51.

4. ЛИНТЕКС – разработчик и производитель хирургических материалов [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://lintex.ru/page41.html> – Дата доступа: 10.01.2009.
5. Лядов, В. К. Экспериментальные аспекты размещения синтетических и композиционных материалов в интраперитонеальной позиции / В. К. Лядов, В. Н. Егиев // *Герниология*. 2006. № 2. С. 43–47.
6. Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани: характеристика и аспекты использования при трансплантации гемопоэтических клеток / Е. С. Рябцева и др. // *Известия НАН Беларуси*. 2006. № 1. С. 15–21.
7. Морфологические изменения в зоне имплантации сетчатых эндопротезов «Prolen» и «Эсфил» / Е. А. Дубова [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2006. № 5. С. 590–595.
8. Нелюбин, П. С. Хирургическое лечение больных с послеоперационными и рецидивными вентральными грыжами / П. С. Нелюбин, Е.А. Галота, А. Д. Тимошин // *Хирургия*. 2007. № 7. С. 69–74.
9. Натяжная герниопластика / В. Н. Егиев [и др.]; под общ. ред. В.Н. Егиева. М.: Медпрактика-М. 2002. 148 с.
10. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. М.: МедиаСфера, 2002. 312 с.
11. Самойлов, А. В. Протезирующая вентропластика в onlay технике / А.В. Самойлов, А. Н. Овчарников // *Герниология*. 2006. № 2. С. 11–13.
12. Сравнительная оценка степени фиксации фибробластов на синтетических эндопротезах, используемых для пластики дефектов передней брюшной стенки / В. Н. Егиев и др. // *Герниология*. 2006. № 2. С. 37–41.
13. Тимошин, А. Д. Хирургическое лечение паховых и послеоперационных грыж брюшной стенки / А. Д. Тимошин, А. В. Юрасов, А. Л. Шестаков. М.: Издательство «Триада-Х», 2003. 144 с.
14. Федоров, В. Д. Лечение больших и гигантских послеоперационных вентральных грыж / В. Д. Федоров, А. А. Адамян, Б. Ш. Гогия // *Хирургия*. 2000. № 1. С. 11–14.
15. Федоров, В. Д. Отторжение эндопротеза при герниопластике / В. Д. Федоров, Л. Е. Славин, А. В. Воронин // *Герниология*. 2004. № 2. С. 36–37.
16. Экспериментальная модель реконструкции кости путем остеогенной трансформации аутотрансплантированных свежесывороточных стромальных клеток жировой ткани / В. Б. Карпюк и др. // *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. 2007. № 4. С. 14–18.
17. Biomaterial-dependent MMP-2 expression in fibroblasts from patients with recurrent incisional hernias / R. Rosch [et al.] // *Hernia*. 2006. № 10(2). P. 125–130.
18. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / P.A. Zuk [et al.] // *Mol. Biol. Cell*. 2002. Vol. 12. P. 4279–4295.
19. In vitro study of Human Dermal Fibroblasts seeded on two kinds of surgical meshes: monofilamented Polypropylene and multifilamented Polyester / M.A. Continenza [et al.] // *Ital. J. Anat. Embryol.* 2003. № 108(4). P. 231–239.
20. In vitro study of the cellular response of human fibroblasts cultured on alloplastic hernia meshes. Influence of mesh material and structure / C. Langer [et al.] // *Chirurg*. 2005. № 76(9). P. 876–885.
21. Influence of implantation interval on the long-term biocompatibility of surgical mesh / V. Klosterhafen [et al.] // *Br. J. Surg.* 2002. Vol. 89. P. 1043–1048.

22. Meshes in der Baucnwand / V. Schumpelick [et al.] // Chirurg. 1999. Vol. 70. P. 876–887.
23. Mizuno, H. Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells / H. Mizuno, H. Hyakusoku // J. Nippon. Med. Sch. 2003. № 70(4). P. 300–306.
24. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies / P.A. Zuk [et al.] // Tissue Engineering. 2001. Vol. 7. № 2. P. 211–228.
25. Precoating of alloplastic materials with living human fibroblasts-a feasibility study / M. Kapischke [et al.] // Surg. Endosc. 2005. № 19. P. 791–797.
26. Prevention of adhesion formation to polypropylene mesh by collagen coating / M. Van ,t Riet [et al.] // Surg. Endosc. 2004. № 18. P. 681–685.
27. Prevention of adhesions to polypropylene meshes in a traumatized bowel model / R.C. Dinsmore [et al.] // J. Amer. Coll. Surg. 2000. Vol. 191. P. 131–136.
28. Repair of fascia with polyglycolic acid mesh cultured with fibroblasts-experimental study / S. Kyzer [et al.] // Eur. Surg. Res. 1997. № 29(2). P. 84–92.
29. The role of TGF-beta1 as a determinant of foreign body reaction to alloplastic materials in rat fibroblast cultures: comparison of different commercially available polypropylene meshes for hernia repair / D. Weyhe [et al.] // Regul. Pept. 2007. № 138(1). P. 10–14.
30. Trevira mesh: a promising new implant for the treatment of abdominal hernias / J. Zieren [et al.] // Langenbeck, s. Arch. Surg. 2002. Vol. 387. P. 8–13.
31. Usher, F.C. Hernia repair with knitted polypropylene mesh / F.C. Usher // Surg. Gynecol. Obstet. 1963. Vol. 117. P. 239–240