

В.Г. Богдан¹, Ю.М. Гаин², Ю.Е. Демидчик², К.В. Лазнев², М.М. Зафранская²
Культивирование мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани *in vitro* на хирургических сетчатых эндопротезах «Prolene», «Vypro», «Ultrapro», «Vicryl», «Proceed»

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

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, жировая ткань, хирургическая сетка, биоинженерный трансплантат, герниопластика.

Проведен анализ возможности применения хирургических сетчатых эндопротезов «Prolene», «Vypro», «Ultrapro», «Vicryl», «Proceed» в качестве внеклеточной опорной матрицы для культивирования мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани *in vitro* при разработке биоинженерных трансплантатов. Установлено, что исследованные образцы сеток «Prolene», «Ultrapro», «Vypro», «Vicryl» в той или иной степени обладают способностью обеспечивать адгезию и рост стволовых клеток, которые определяются свойствами самого сетчатого имплантата, его составом и структурой. Выявлена зависимость между количеством фиксированных клеток и содержанием в хирургической сетке рассасывающихся мультифиламентных полилактиновых волокон.

Введение.

Применение сетчатых имплантатов в хирургической герниологии лишь в определенной степени позволило решить проблему послеоперационных вентральных грыж: повысить эффективность пластики и снизить уровень рецидивов заболевания [1-5]. Вместе с тем, являясь синтетическим материалом, хирургическая сетка вызывает активную и длительную (хроническую) воспалительную реакцию в окружающих тканях, которая лежит в основе развития местных ретенционных и инфекционных раневых послеоперационных осложнений вплоть до отторжения эндопротеза, приводит к развитию деформации (сморщиванию и уплотнению) имплантата, ограничению подвижности передней брюшной стенки и, как следствие, значительному снижению качества жизни пациента вследствие выраженного болевого синдрома [2-6].

Вынужденная необходимость нахождения нерассасывающегося инородного материала сетки в зоне пластики - ведущая причина существования постоянной реакции воспаления и чрезмерного новообразования коллагена с формированием мощного, избыточно прочного и малоподвижного фиброзного слоя [5-6].

Предполагаемая концепция по решению данной проблемы сводится к следующим положениям:

1. снижение выраженности и уменьшение длительности воспалительной реакции;
2. стимуляция репаративных процессов в зоне герниопластики;
3. быстрый синтез полноценной (зрелой) соединительной ткани;
4. образование эластичного рубца.

Разработка и первые результаты клинического использования композиционных («облегченных», частично рассасывающихся) сетчатых материалов со сниженным содержанием нерассасывающегося компонента является позитивным примером совершенствования хирургических сеток [5].

Эффективная комплексная реализация представленной концепции, на наш взгляд, невозможна без активного изучения возможностей клеточной трансплантологии и тканевой инженерии в герниологии [5-6].

Наиболее перспективным и быстроразвивающимся направлением реконструктивно-восстановительной хирургии в современных условиях является разработка и клиническое применение композиционных биологических трансплантатов, состоящих из внеклеточной матрицы с фиксированными на ней алло- или аутогенными клетками, культивированными вне организма *in vitro* [5-11]. Теоретической основой этого инновационного метода клеточной биологии являются экспериментальные исследования по изучению возможности культивирования эмбриональных и постнатальных стволовых клеток (СК), обладающих необходимыми свойствами, на различных имплантируемых материалах [6-7, 9-11]. Учитывая этические проблемы использования для получения эмбриональных СК фетальных тканей, а также опасность их применения из-за высокого риска малигнизации и инфицирования вирусными и иными агентами, развития иммунных осложнений и реакции отторжения, СК постнатального происхождения рассматриваются как наиболее адекватный материал для клеточной трансплантации [12-13].

В настоящее время самыми изученными постнатальными мультипотентными СК считаются мезенхимальные стволовые клетки (МСК), которые можно выделять из разных источников: костного мозга, жировой, мышечной, костной, хрящевой и др. тканей [12, 14-15]. В то же время, практическое значение для клинического применения имеют ткани, которые содержат достаточное количество МСК – это костный мозг и жировая ткань (ЖТ). Преимущества ЖТ, в соединительнотканых междольковых перегородках которой и содержатся фибробластоподобные МСК, определяются малоинвазивным способом её получения и низкой контаминированностью другими видами клеток [15-20]. Кроме того, по фенотипической характеристике и способности к мультилинейной дифференцировке МСК ЖТ аналогичны МСК костного мозга [21-23].

Обладая способностью дифференцироваться в фибробласты с последующей экспрессией коллагенов I и II типов, МСК представляют собой активный резерв для регенерирующей *de novo* полноценной соединительной ткани, что весьма важно в процессе образования эластичного рубца при герниопластике [5, 11, 14-15].

Вместе с тем, в единичных экспериментальных работах, посвященных проблеме применения в герниологии различных по происхождению (человека и животных) и источникам (дермальные, эмбриональные) клеточных культур фибробластов, не найдено данных о фибробластоподобных МСК ЖТ [6, 7, 9, 10, 11, 24]. Кроме того, возможность использования в качестве опорного субстрата для фибробластов хирургических сетчатых эндопротезов представлена в ряде экспериментальных исследований иностранных и русскоязычных авторов не полно, а порой и противоречиво, отсутствует комплексный подход к анализу этого вопроса [6, 7, 11, 24].

Таким образом, всё вышеперечисленное указывает на важность и высокую актуальность представленной проблемы, которая нуждается в дополнительном и всестороннем изучении и, в первую очередь, на доклиническом (экспериментальном) уровне.

Цель исследования: Изучить возможность культивирования мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крысы на хирургических сетках «Prolene», «Vypro», «Ultrapro», «Vicryl», «Proceed».

Материалы и методы

1. Объекты.

Объектом исследования явились МСК ЖТ 10 белых беспородных лабораторных крыс-самцов (возраст 6 месяцев, масса тела 206,3±11,4 г.), культивированные на хирургических сетчатых эндопротезах «Prolene», «Vypro», «Ultrapro», «Vicryl», «Proceed» («Ethicon»), применяемых для пластики грыжевых и фасциальных дефектов.

Хирургическая сетка «Prolene» состоит из нерассасывающихся мононитей, изготовленных из изотактического кристаллического стереоизомера полипропилена, синтетического линейного полиолефина (СЗнб)п. Диаметр нити 0,15 мм, толщина сетки 0,6 мм, поверхностная плотность 95,9 г/м².

Сетка «Vypro» представляет собой частично рассасывающуюся облегченную композиционную мультифиламентную сетку, состоящую из равных частей ПРОЛЕНА – нерассасывающихся монофиламентных полипропиленовых волокон и ВИКРИЛА – рассасывающихся мультифиламентных полилактиновых волокон со сроком ферментативного гидролиза 56-70 суток.

Сетка «Ultrapro» является частично рассасывающейся облегченной композиционной монофиламентной сеткой, состоящей из равных частей ПРОЛЕНА и МОНОКРИЛА – рассасывающихся монофиламентных полиглекапроновых волокон со сроком рассасывания путем ферментативного гидролиза в течение 90-120 дней.

Отдельные физические свойства хирургических сеток «Prolene», «Vypro», «Ultrapro» приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика хирургических сеток «Prolene», «Vypro», «Ultrapro»

Вид сетчатого эндопротеза	Удельный вес, г/см ²	Толщина, мм	Размер пор, мм	Максимальное давление, мм. рт. ст	Растяжение при нагрузке 16 Н/см, %
«Prolene»	80-85	0,6	1-2	1650	8
«Vypro»	25	0,39	4-5	338	31
«Ultrapro»	28	0,5	3-4	525	17,5

Полностью рассасывающаяся в течение 56-70 суток сетка «Vicryl» состоит из полиглактина 910, который является синтетическим рассасывающимся кополимером, состоящим на 90% из гликолида и на 10% из L-лактида.

В состав многослойной неадгезивной хирургической сетки «Proceed» входит плетеный материал из окисленной регенерированной целлюлозы и нерассасывающаяся полипропиленовая сетка, инкапсулированная полидиоксаном. Слой из окисленной регенерированной целлюлозы рассасывается в течение 28 суток, часть имплантата из полидиоксанона – в течение 6 месяцев.

2. Методы.

2.1. Выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крысы

В стерильных условиях производили забор ЖТ из внутрибрюшинного пространства. После промывания стерильным раствором Хенкса, ЖТ инкубировали в течение 45 минут с 0,075% раствором коллагеназы I типа (Sigma) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). Нейтрализацию фермента проводили равным объемом ФСБ, содержащего 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (НИИ ЭИМ, РБ). Полученные в результате обработки коллагеназой клетки отмывали 2 раза центрифугированием, клеточный осадок

ресуспендировали в культуральной среде и высевали в концентрации $5 \cdot 10^4$ клеток на 1 см^2 в культуральные чашки диаметром 60 мм.

Через 24 часа производили смену культуральной среды для удаления неприкрепившихся клеток. В дальнейшем смену среды производили каждые четвертые 75% конfluenceности клетки снимали с поверхности \approx сутки. По достижении культурами культурального пластика с помощью 0,25% р-ра трипсина/ЭДТА, затем трипсин ингибировали добавлением PBS, содержащего 10% ЭТС; после двукратного отмывания центрифугированием клетки засеивали в культуральные чашки в концентрации $1 \cdot 10^4$ клеток на см^2 для получения первого пассажа [18].

75% \approx Аналогично получали второй пассаж по достижении предыдущим пассажем конfluenceности. Клетки культивировали в среде Dulbecco's modified Eagle's medium (DME) (Sigma), содержащей 10% ЭТС, 1% раствора глутамина 100-кратной концентрации для клеточных культур (Sigma) и 1% смеси антибиотиков 100-кратной концентрации для клеточных культур (Sigma). Для экспериментов использовали МСК второго пассажа.

2.2. Культивирование МСК в контакте с сетками для исследования адгезии и роста.

$1,8 \text{ см}^2$) промывали ФСБ и помещали в лунки ≈ 15 мм (\varnothing образцы сеток 24-луночного планшета. В планшет с сетками засеивали МСК второго пассажа в количестве $2 \cdot 10^4$ клеток на см^2 в 1 мл питательной среды (состав среды, как в п.2.1). Сетки «Prolene» и «Proceed» прижимали к дну полипропиленовыми грузиками в форме трубки (фрагментами наконечников дозаторов) во избежание всплывания. Инкубировали 3 суток. Опыты ставили в дуплетах.

2.3. 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.

2.4. Подсчет клеток

Сетку извлекали из лунки, ополаскивали в чашке с PBS для удаления неприкрепленных клеток и помещали в лунку с 1 мл 0,25% раствора трипсина/ЭДТА на 10 минут. По окончании трипсинизации клетки снимали с сетки пипетированием и подсчитывали в камере Горяева.

2.5. 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. Проверка статистических гипотез о виде распределения количественных признаков осуществлялась на основании критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's W test). По данным проведенных исследований рассчитаны медиана (Me) и интерквартильный размах (25-й; 75-й процентиля). Результаты представлены в формате Me (25-й; 75-й процентиля). Оценку достоверности различий выполняли непараметрическим методом с использованием рангового анализа вариаций критерия ANOVA по Краскелу-Уоллису (Kruskal-Wallis ANOVA). При парном сравнении групп применяли U тест Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test). Для установления связи двух

признаков определяли коэффициент корреляции по Спирмену (Spearman rank R). Различия считали достоверными при $p < 0,05$ [25].

Результаты и обсуждение

При проведении люминесцентной микроскопии на хирургических сетках «Vipro», «Ultrapro», «Prolene» были обнаружено большое количество одиночно расположенных живых клеток, ядра которых окрасились в голубой цвет (рисунки 1-4). Распределение клеток на синтетических материалах было неоднородным, со скоплениями их в участках переплетения нитей и узлах.

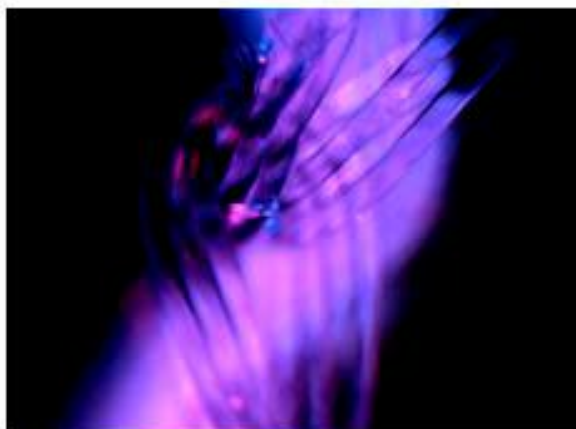


Рисунок 1 – Одиночные живые клетки на сетчатом эндопротезе «Vicryl». Ув. $\times 100$



Рисунок 2 – Одиночные живые клетки на сетчатом эндопротезе «Ultrapro». Ув. $\times 100$

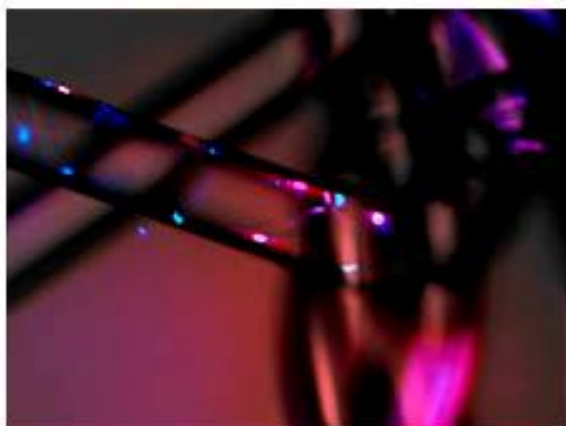


Рисунок 3 – Одиночные живые клетки на сетчатом эндопротезе «Prolene». Ув. $\times 100$

Рисунок 3 – Одиночные живые клетки на сетчатом эндопротезе «Prolene». Ув. $\times 100$

На образцах сеток «Vicryl» выявлены многочисленные группы распластаных живых клеток (рисунки 4а и 4б).

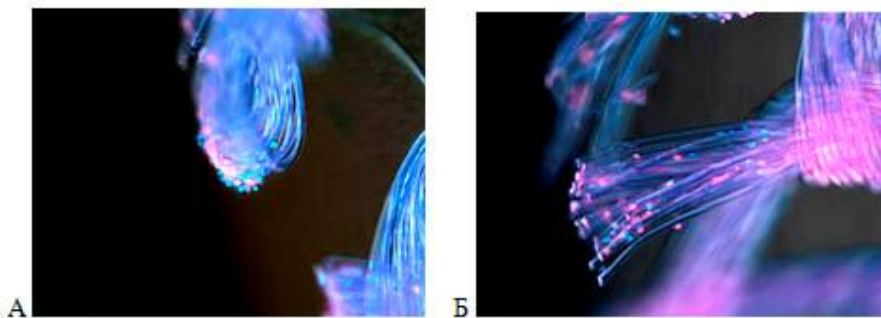


Рисунок 4 – Группы живых клеток на сетчатом эндопротезе «Vicryl». Ув. $\times 100$

Более того, фрагменты волокон сетки «Vicryl», попавшие на дно лунок, покрытое клетками, были прикреплены ко дну, оставались неподвижными при встряхивании планшета, что свидетельствует о хорошей адгезии клеток к материалу волокон (рисунок 5).



Рисунок 5 – Волокна сетчатого эндопротеза «Vicryl», прикрепленные к слою клеток на дне лунки. Ув. $\times 100$

В лунках с многослойной неадгезивной сеткой «Proseed» реакция среды была кислой, клетки погибли, не прикрепившись к матричной основе.

Результаты подсчета числа клеток на 1 см² различных вариантов хирургических сеток, проведенные после трипсинизации, показали достоверное преобладание количества МСК ЖТ на сетчатом эндопротезе «Vicryl» (Kruskal-Wallis test $KW-H(3,30)=21,0156285$, $p=0,0001$) [Рисунок 6].

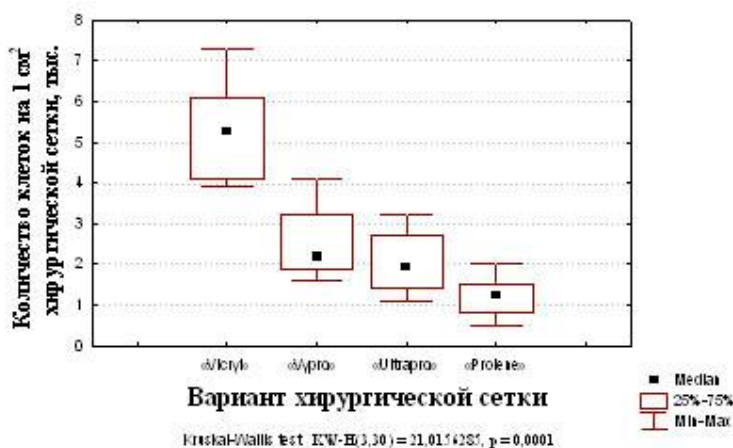


Рисунок 6 – Количество клеток на 1 см² различных вариантов хирургических сеток

Данные по числу и процентной доле жизнеспособных клеток на 1 см² различных вариантов хирургических сеток приведены в таблице 2.

Таблица 2 - Количество и удельный вес жизнеспособных МСК ЖТ снятых с 1 см² хирургической сетки

Вариант хирургической сетки	Количество клеток снятых с 1 см ² сетки, тыс., Me (25-й; 75-й процентиля)	Удельный вес жизнеспособных клеток, %
«Vicryl»(n=6)	5,25 (4,1; 6,1)*	> 95
«Vypro»(n=6)	2,20 (1,9; 3,2) **	> 95
«Ultrapro» (n=6)	1,95 (1,4; 2,7) **	> 95
«Prolene»(n=8)	1,25 (0,8; 1,5)	> 95
«Proceed»(n=6)	0	-

Примечание: * - достоверность различий (p<0,05) по сравнению с другими вариантами хирургических сеток; ** - достоверность различий (p<0,05) по сравнению с хирургической сеткой «Prolene».

Из таблицы видно, что большая часть нежизнеспособных клеток, видимых на сетке при микроскопии, удаляется при ополаскивании сетки в ФСБ перед трипсинизацией, в том время как основная часть прикрепленных клеток (более 95%) является живыми.

При парном сравнении (Mann-Whitney U-test) достоверно установлено, что среди всех исследованных образцов сеток наибольшей способностью обеспечивать адгезию и рост клеток обладает полностью рассасывающаяся сетка «Vicryl», как по отношению к частично рассасывающимся облегченным композиционным сетчатым имплантатам «Vypro» (Z=2,642; p=0,008) и «Ultrapro» (Z=2,882; p=0,004), так и в сравнении с нерассасывающимся «Prolene» (Z=3,372; p=0,0008).

Хирургические сетки «Vypro» и «Ultrapro» в качестве внеклеточного матрикса для МСК ЖТ имеют схожие показатели (Z=0,961; p=0,337), превосходя «Prolene» (Z=3,091; p=0,002 и Z=2,201; p=0,028 соответственно).

В ходе корреляционного анализа выявлена статистически значимая прямая зависимость количества фиксированных стволовых клеток от состава хирургической сетки - содержания в ней рассасывающихся мультифиламентных полилактиновых волокон –

ВИКРИЛа: «Prolene» - 0%, «Vypro» - 50%, «Vicryl» - 100% ($r=0,89$; $p=0,000000008$) [Рисунок 7].

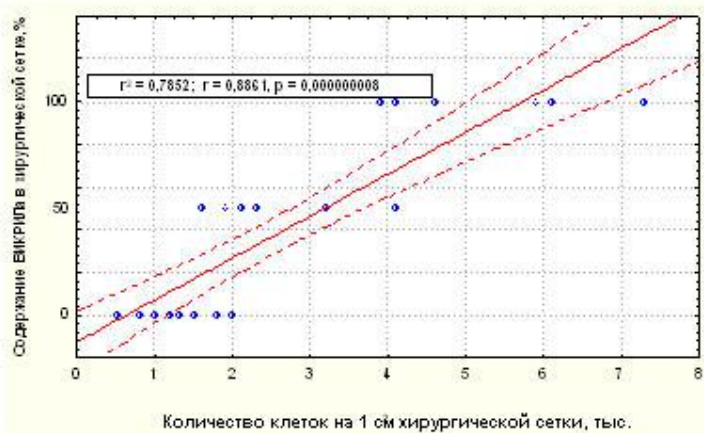


Рисунок 7 – График рассеяния при анализе корреляционной связи между количеством клеток на 1 см² хирургической сетки и содержанием в ней ВИКРИЛа, %

Вместе с тем, число МСК ЖТ, фиксированных на всех изучаемых сетках, меньше необходимого количества клеток, которое обычно применяется при трансплантациях с репаративной или иммуномодулирующей целью.

Выводы:

1. Впервые в экспериментальных условиях проведен комплексный анализ возможности применения основных видов хирургических сетчатых эндопротезов «Prolene», «Vypro», «Ultrapro», «Vicryl» и «Proceed» в качестве внеклеточной опорной матрицы для культивирования мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани *in vitro* при разработке биоинженерных трансплантатов.

2. Установлено, что исследованные образцы сеток «Prolene», «Ultrapro», «Vypro», «Vicryl» в той или иной степени обладают способностью обеспечивать адгезию и рост стволовых клеток (в указанном ряду по возрастанию). Многослойная неадгезивная сетка «Proceed» не пригодна для культивирования МСК ЖТ.

3. Доказано, что способность к адгезии МСК ЖТ во многом определяется свойствами самого сетчатого имплантата, его составом и структурой. Выявлена прямая корреляционная зависимость между количеством фиксированных клеток и содержанием в хирургической сетке ВИКРИЛа – рассасывающихся мультифиламентных полиглактиновых волокон со сроком ферментативного гидролиза 56-70 суток, которые предположительно являются основным механическим субстратом для клеток.

4. Предложенная методика культивирования МСК ЖТ на синтетических материалах является моделью, позволяющей прогнозировать морфологические закономерности развития биологических процессов, в том числе формирование соединительной ткани в зоне имплантации хирургических сеток.

5. Для повышения эффективности трансплантации МСК ЖТ на хирургических сетках необходим поиск новых дополнительных компонентов биотрансплантатов.

Литература

1. Жебровский, В. В. Хирургия грыж живота / В. В. Жебровский. М., 2005. 368 с.

2. 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.
3. 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.
4. Натяжная герниопластика / В. Н. Егиев [и др.]; под общ. ред. В. Н. Егиева. М.: Медпрактика-М, 2002. 148 с.
5. Егиев, В. Н. Современное состояние и перспективы герниологии / В. Н. Егиев // *Герниология*. 2006. № 2(10). С. 5–10.
6. 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.
7. Сравнительный анализ полипропиленового и биологического сетчатых имплантатов в эксперименте / А. А. Гостевской [и др.] // *Медицинский академический журнал*. 2007. Т. 7, № 3. С. 135–136.
8. Экспериментальная модель реконструкции кости путем остеогенной трансформации аутотрансплантированных свежесыводенных стромальных клеток жировой ткани / В. Б. Карпюк [и др.] // *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. 2007. № 4. С. 14–18.
9. Isolation of fibroblasts for coating of meshes for reconstructive surgery: differences between mesh types / С. E. Skala [et al.] // *Regen. Med*. 2009. Vol. 4, № 2. P. 197–204.
10. In vitro study of Human Dermal Fibroblasts seeded on two kinds of surgical meshes: monofilamented Polypropylene and multifilamented Polyester / М. А. Continenza [et al.] // *Ital. J. Anat. Embryol*. 2003. № 108(4). P. 231–239.
11. Биоматрица на основе полипропиленовой сетки и эмбриональных фибробластов / Н. В. Мальцева [и др.] // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2008. № 3. С. 128–131.
12. Стволовые клетки в современной медицине: настоящее и будущее / М. А. Пальцев [и др.] // *Молекулярная медицина*. 2006. № 2. С. 5–9.
13. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential applications / P. Bianco [et al.] // *Stem Cells*. 2001. Vol. 19. P. 180–192.
14. Гольдберг, Е. Д. Современные взгляды на проблему стволовых клеток и возможности их использования в медицине / Е. Д. Гольдберг, А. М. Дыгай, В. В. Жданов // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2005. № 4. С. 184–189.
15. Культивирование и характеристика негемопоетических постнатальных стволовых клеток из жировой ткани человека / Н. С. Сергеева [и др.] // *Молекулярная медицина*. 2006. № 2. С. 23–29.
16. Yield of human adipose derived adult stem cells from liposuction aspirates / L. Aust [et al.] // *Cytottherapy*. 2004. Vol. 6, № 1. P. 7–14.
17. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / P. A. Zuk [et al.] // *Mol. Biol. Cell*. 2002. Vol. 13. P. 4279–4295.
18. 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.
19. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue / A. M. Rodriguez [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004. Vol. 315, № 2. P. 255–263.

20. The expansion and biological characteristics of human mesenchymal stem cells / D.H. Zhou [et al.] // *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2003. Vol. 41, № 8. P. 607–610.
21. 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.
22. Stem cells in clinical practice / В. М. Evers [et al.] // *J. Am. Coll. Surg.* 2003. Vol. 197. P. 458–478.
23. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation / В. А. Bunnell [et al.] // *Methods*. 2008. Vol. 45, № 2. P. 115–120.
24. In-vitro study of the cellular response of human fibroblasts cultured on alloplastic hernia meshes. Influence of mesh material and structure / С. Langer [et al.] // *Chirurg*. 2005. № 76(9). P. 876–885.
25. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. М.: МедиаСфера, 2002. 312 с