

*В. Г. Богдан¹, С. С. Багатка², М. Ю. Юркевич², М. М. Зафранская²,
Ю. М. Гаин²*

**Влияние обогащенной тромбоцитами плазмы на
жизнеспособность, скорость роста, морфо-фенотипические и
секреторные особенности мезенхимальных стромальных клеток
жировой ткани человека**

*Кафедра военно-полевой хирургии военно-медицинского факультета
в УО «Белорусский государственный медицинский университет»,¹
ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»²*

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани, обогащенная тромбоцитами плазма, эмбриональная телячья сыворотка.

Key words: tissue adipose-derived mesenchymal stromal cells, platelet-rich plasma, fetal bovine serum

Резюме. В результате проведенных исследований установлено, что культивирование мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в среде с 20% обогащенной тромбоцитами аутоплазмы, не влияет на морфо-фенотипические особенности стволовых клеток и продукцию ими ангиогенного фактора роста, ускоряет темп роста культуры клеток, сохраняя при этом высокую жизнеспособность при длительном культивировании. Полученные данные позволяют рассматривать обогащенную тромбоцитами аутоплазму в качестве сапплементы культуральной среды при предтрансплантационной подготовке клеточного материала.

Введение.

Обогащенная тромбоцитами плазма (ОТП) – PRP (Platelet-Rich Plasma) представляет собой биологический продукт, получаемый из аутологичной крови человека и содержащий высокое число тромбоцитов в небольшом количестве плазмы [1,2]. Доказано, что стимулирующий эффект ОТП проявляется при

концентрации тромбоцитов в ней равно или более 1 000 000/мкл [2]. Огромное внимание к использованию ОТП в качестве субстанции, способствующей активации метаболических и репаративных процессов, обусловлено высоким содержанием ростовых факторов (PDGF, IGF, EGF, TGF, HGF), которые высвобождаются при активации тромбоцитов из альфа-гранул, при этом аутологичное происхождение ОТП исключает риск возникновения аллергических реакций и осложнений, а также трансмиссивных заболеваний [1].

Уникальность и специфичность ОТП (в отличие от рекомбинантных ростовых факторов) определяется локальным многофакторным воздействием высококонцентрированного комплекса биологических медиаторов - факторов роста, которые находятся в естественных соотношениях и активном взаимодействии, на аутологичные ткани путем сложного и многоступенчатого регулирования каскада ключевых клеточных реакций (хемотаксиса, миграции, митогенеза, дифференцировки и др.), направленных на регуляцию и стимуляцию процессов естественной регенерации [1,2].

Тромбоцитарные факторы применяют в лечении раневых повреждений начиная с 1985г [3]. В клинической практике описаны случаи успешного применения ОТП для репарации ожоговых ран [4], трофических язв нижних конечностей [5], мышечно-костных повреждений [6], а также в косметической хирургии [7] и стоматологии [8]. Ряд исследований установили, что использование костного трансплантата для восстановления дефектов костной ткани наиболее эффективно при использовании совместно с ОТП [9-11]. Согласно литературным данным, *in vitro*, ОТП оказывает положительное влияние на способность МСК к дифференцировке в остео-, хондро- и адипоциты, увеличивает пролиферативную активность МСК [12-14].

Вместе с тем, в доступных нам литературных источниках отсутствовала информация о комплексной оценке влияния обогащенной тромбоцитами плазмы человека на культуру мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека.

Цель работы – оценить влияния обогащенной тромбоцитами плазмы на жизнеспособность, морфо-фенотипические и секреторные особенности мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека.

Материалы и методы исследования.

Материалом для исследования служили мезенхимальные стромальные клетки (МСК), выделенные из жировой ткани (ЖТ) 5-ти пациентов с послеоперационными вентральными грыжами больших размеров.

Забор биологического материала для выделения МСК ЖТ у больного с послеоперационной вентральной грыжей больших размеров проводили под местной инфильтрационной или комбинированной анестезией инцизионным способом с помещением фрагмента подкожной жировой клетчатки в объеме до 10 см³ в герметичный контейнер со стерильным физиологическим раствором.

Выделение и культивирование МСК ЖТ человека.

Для выделения МСК ЖТ, гомогенизированную ЖТ промывали стерильным раствором Хенкса и инкубировали в течение 45 минут с 0,075% раствором коллагеназы I типа (Sigma) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) при 370С. Нейтрализацию фермента проводили равным объемом ФСБ, содержащего 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (НИИ ЭиМ, РБ). Полученные клетки отмывали, клеточный осадок ресуспендировали в культуральной среде DMEM с пониженным содержанием глюкозы 1000 мг/мл («Sigma», США) с добавлением 10% ЭТС, 100 U/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамина и высевали в концентрации $5 \cdot 10^4$ клеток на 1 см² в культуральные чашки диаметром 60 мм [15].

Через 24 часа производили смену культуральной среды для удаления неприкрепившихся клеток. В дальнейшем смену среды производили каждые четвертые 75% конфлюэнтности клетки снимали с поверхности≈сутки. По достижении культурами культурального пластика с помощью 0,25% р-ра трипсина/ЭДТА и засевали в культуральные чашки в концентрации $1 \cdot 10^4$ клеток

на см² для получения первого пассажа с целью наращивания необходимой биомассы клеток и криоконсервации.

Получение обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП).

Получение богатой тромбоцитами плазмы из периферической крови (20 мл), взятой с антикоагулянтом – цитратом натрия в соотношении 9:1, осуществлялось в 2 этапа. На первом этапе после центрифугирования при 1300об/мин в течение 10 минут, плазму, содержащую тромбоциты, отделяли от эритроцитов и лейкоцитов. Вторичное центрифугирование при 4000об/мин 10 минут приводило к агрегации тромбоцитов на дне пробирки. После удаления бедной тромбоцитами плазмы осадок, включающий тромбоциты и незначительную примесь эритроцитов и лейкоцитов, разводили в необходимом количестве плазмы.

Микроскопия и мониторинг клеточных культур.

Культуры исследовали на универсальном инвертированном микроскопе Carl Zeiss Axiovert 200 (Германия) с применением методов светлого поля, бокового освещения, фазового и Varel- контрастов.

Иммунофенотипирование клеточных культур методом проточной цитометрии.

Для изучения экспрессии поверхностных маркеров культурами МСК человека использовали мышинные моноклональные антитела (МАТ) к антигенам CD90-FITC, CD71-FITC, CD44-FITC, CD31-FITC/PE, CD105-PE, HLA-DR-PE, CD119-PE, CD34-APC, CD45-PC7 (Beckman Coulter, США). Клетки в концентрации 1×10^5 клеток/200 мкл ФСБ инкубировали с моноклональными антителами в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре. Измерения проводили с использованием проточного цитометра FC 500 (Beckman Coulter, США).

Анализ секреции сосудистого эндотелиального фактора роста культурами МСК жировой ткани человека

Образцы кондиционированной среды (супернатанты) от всех культур клеток собирали в пробирки и замораживали при температуре -20 °C (-70 °C для

хранения более трех месяцев) для последующего анализа содержания в них сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для анализа секреции сосудистого эндотелиального фактора роста культурами МСК жировой ткани использовали набор для ИФА VEGF человека (R&D Systems, Канада) в соответствии с рекомендациями изготовителя.

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). Результаты представлены в формате Me (25-й ÷ 75-й процентиля). Оценку достоверности различий выполняли непараметрическим методом с использованием U теста Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test) [16].

Результаты и обсуждение.

Для оценки влияния ОТП на морфо-фенотипические особенности клеток использовались клеточные культуры МСК жировой ткани человека 2-3-го пассажей, культивируемые в присутствии 20% ОТП. В качестве контроля рассматривались аналогичные культуры клеток, культивируемые в условиях 10% ЭТС. На рисунке 1 представлена морфология МСК 2-го пассажа, культивируемых с добавлением различных сывороточных белков.

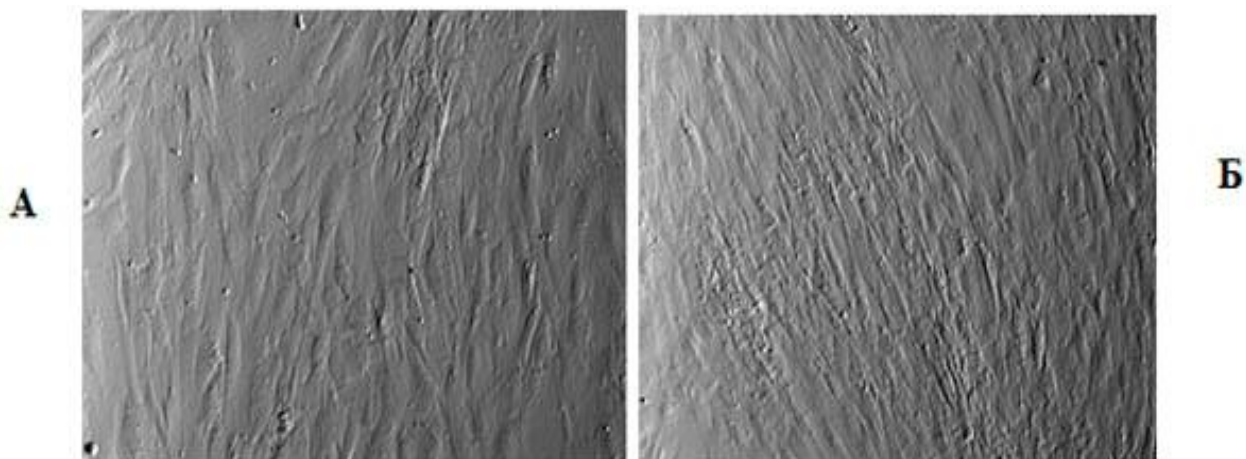


Рисунок 1 – Морфология МСК ЖТ 4-го пассажа, культивируемых в присутствии 10% эмбриональной телячьей сыворотки (А) и в 20% обогащенной тромбоцитами плазме человека (Б). Ув.х100.

Добавление в культуральную среду обогащенной тромбоцитами плазмы человека не влияло на изменение морфологии полученных культур клеток. Данные клеточные культуры характеризовались сходными морфологическими особенностями и были представлены фибробластоподобным веретеновидными клетками (рисунок 1А и 1Б).

Жизнеспособность культур стромальных клеток в течение всего процесса культивирования как в 10% ЭТС, так и в 20% ОТП составляла порядка 98,0% (97,3% ÷ 99,2%).

Иммунофенотипический анализ показал, что абсолютное большинство клеток, культивируемых с различным составом сывороточных/плазменных белков, характеризовались специфичным для МСК фенотипом поверхностных антигенов CD90+/CD105+/CD44+/CD119+/CD34-CD45-CD31- (Таблица 1) .

Таблица 1 - Фенотипические особенности МСК, культивируемых в условиях 10% эмбриональной телячьей сыворотки и в присутствии 20% обогащенной тромбоцитами плазмы человека (%)

Маркер	Условия культивирования МСК	
	10% ЭТС	20% ОТП
CD90	90,1 (87,1 ÷ 95,3)	92,2 (89,3 ÷ 96,4)
CD44	94,8 (92,1 ÷ 96,8)	96,5 (93,2 ÷ 98,7)
CD105	93,7 (86,7 ÷ 97,1)	97,1 (95,2 ÷ 99,3%)
CD119	92 (89,1 ÷ 94,2)	90,2 (87,1 ÷ 91,4)
CD31	0,3 (0,1 ÷ 0,5)	-
CD45	0,5 (0,2 ÷ 1,1)	-
CD34	-	-
CD71	89,7 (82,1 ÷ 93,4)	89,0 (82,0 ÷ 92,8)
HLA-DR	3,2 (1,5 ÷ 4,2)	1,2 (0,1 ÷ 1,9)

Следует отметить, что высокий уровень экспрессии CD71 свидетельствует о пролиферативной активности клеток, культивируемых как в присутствии 10% ЭТС, так при содержании в культуральной среде 20% обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП). В то же время, практически отсутствие HLA-DR-положительных МСК подтверждает их неспособность выступать в роли антиген-презентирующих клеток и инициировать развитие специфических иммунных реакций.

Учитывая, что васкуляризация трансплантатов одно из необходимых условий их приживления, нами была определена продукция сосудистого фактора роста VEGF (vascular endothelial growth factor) МСК, культивируемых в присутствии 20% ОТП и в 10% ЭТС.

Анализ динамики продукции сосудистого фактора роста свидетельствует о способности МСК продуцировать ангиогенный фактор на протяжении длительного времени, при этом концентрация VEGF в супернатантах клеточных культур оставалась постоянной (Рисунок 2). Так, уровень продукции VEGF,

культурами МСК жировой ткани в присутствии 10% ЭТС, составил 8456,6 (8100,0 ÷ 8800,1) пг/мл на 4-й день культивирования и 8122,7 (7800,5 ÷ 8750,6) пг/мл на 12 день культивирования, тогда как в присутствии ОТП концентрация VEGF в супернатантах конфлюэнтных культур МСК составила 9017,1 (8900,5 ÷ 9200,1) пг/мл и 8897,3 (8700,3 ÷ 9120,1) пг/мл, соответственно.

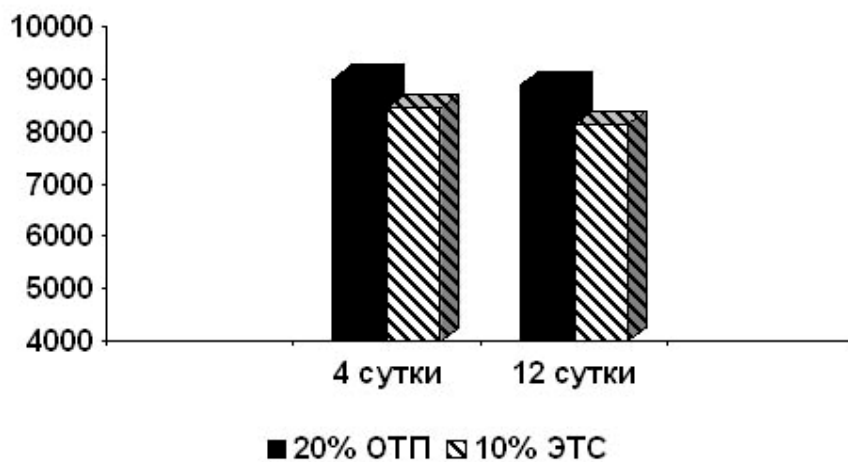


Рисунок 2 - Продукция VEGF МСК (пг/мл), в присутствии 20% обогатщенной тромбоцитами плазме человека (ОТП) и в 10% эмбриональной телячьей сыворотке (ЭТС) на 4 и 12 сутки культивирования

Для оценки влияния условий культивирования на темп роста клеточных культур МСК, предварительно посаженные в одинаковой концентрации, были сняты на 7-е сутки с поверхности культурального пластика с помощью 0,25% трипсина-ЭДТА и была посчитана их концентрация на мл среды. Число удвоений клеточных популяций рассчитывалось как \log_{10} отношения числа клеток, полученных после трипсинизации, к числу посаженных клеток, умноженные на 3,33 [17]. Более высокий прирост клеток отмечен при культивировании МСК в среде, содержащей 20% ОТП (коэффициент прироста – 4,9), по сравнению с культивированием с 10% ЭТС (коэффициент прироста – 2,5).

Выводы:

1. Длительное культивирование мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в обогатщенной тромбоцитами плазме сохраняет

стабильность фенотипа и высокую жизнеспособность МСК ЖТ человека, что свидетельствует о пролонгированной продукции тромбоцитами ростовых факторов.

2. Использование обогащенной тромбоцитами плазмы при культивировании мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека позволяет более быстро получать необходимое количество клеток, а также отказаться от использования ксеногенных компонентов.

3. Положительное влияние обогащенной тромбоцитами плазмы на скорость роста культуры МСК ЖТ человека, пролиферацию, продукцию ангиогенного фактора роста и жизнеспособность стромальных клеток, в сочетании с высоким содержанием естественных ростовых факторов (PDGF, IGF, EGF, TGF, HGF и др.) и аутологичным происхождением, позволяет рассматривать ОТП в качестве сапплементы культуральной среды для предтрансплантационной подготовки клеточного материала.

Литература

1. Marx, R. E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP / R. E. Marx // *Implant dentistry*. 2001. Vol. 10, № 4. P. 225–228.

2. Flow cytometric and morphological characterization of platelet-rich plasma gel / J. E. Fernandez-Barbero [et al.] // *Clin. Oral Implants Res*. 2006. Vol. 17, № 6. P. 687–693.

3. A prospective, randomized, controlled trial of autologous platelet-rich plasma gel for the treatment of diabetic foot ulcers / V. R. Driver [et al.] // *Ostomy Wound Manage*. 2006. Vol. 52, № 6. P. 68–70, 72, 74 passim.

4. Platelet-Rich Plasma combined with skin substitute for chronic wound healing: a case report / R. L. Knox [et al.] // *J. of the American Society of Extra-Corporeal Technology*. 2006. Vol. 38. P. 260–264.

5. Андреев, Д. Ю. Взвесь аутогенных тромбоцитов в местном лечении ишемических трофических язв нижних конечностей / Д. Ю. Андреев [и др.] // *Вестник хирургии*. 2009. Т. 168. № 6. С. 45–48.

6. Platelet-rich plasma injection graft for musculoskeletal injures: a review / S. Sampson [et al.] // *Cur Rev Musculoskelet Med*. 2008. Vol. 1. P. 165–174.
7. Use autologous platelet-rich plasma and autolodous platelet-poor plasma in cosmetic surgery / D. Man [et al.] // *Plastic&Reconstructive Surgery*. 2001. Vol. 107, № 1. P. 239–249.
8. Carlson, N. E. Platelet-rich plasma. Clinical application in dentistry / N. E. Carlson, R. B. Roach // *Dentistry&Medicine*. 2002. Vol. 133. P. 1383–1386.
9. Результаты применения богатой тромбоцитами аутоплазмы в хирургическом лечении больных с дефектами костной ткани / В. Г. Самодай [и др.] // *Журнал теоретической и практической медицины*. 2006. Т. 4, № 2. С. 173–175.
10. Wrotniak, M. Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery / M. Wrotniak, T. Bielecki, T. S. Gazdzik // *Ortop Traumatol Rehabil*. 2007. Vol. 9, № 3. P. 227–238.
11. Mishra, A. Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma / A. Mishra, J Jr. Woodall, A. Vieira // *Clin Sports Med*. 2009. Vol. 28, № 1. P. 113–125.
12. Preliminary separation of the growth factors in platelet-rich plasma: effects on the proliferation of human marrow-derived mesenchymal stem cells / Q. Huang [et al.] // *Chinese Medical Journal*. 2008. Vol. 122, № 1. P. 83–87.
13. Effect of platelet-rich plasma on the in vitro proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on distinct calcium phosphate scaffolds: the specific surface area makes a difference / P. Kasten [et al.] // *J of Biomat. Application*. 2008. Vol. 23. P. 169–188.
14. Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics / J. P. Vogel [et al.] // *J of Biomat. Application*. 2006. Vol. 17, № 7. P. 462–469.
15. 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.

16. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. М.: МедиаСфера, 2002. 312 с.

17. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlation with donor age, sex, and platelet count / G. Weibrich [et al.] // J of Cranio-Maxillofacial Surgery. 2002. Vol. 30. P. 97–102.