

НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

УДК 616.381–007.43–089.843:615.324

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
НА ПОЛИПРОПИЛЕНОВОМ СЕТЧАТОМ ЭНДОПРОТЕЗЕВ. В. Берещенко¹, А. Н. Лызиков¹, А. Н. Кондрачук², М. Н. Данченко²,
Д. Р. Петренев¹, Е. В. Воропаев¹¹Гомельский государственный медицинский университет²Институт радиобиологии НАН Беларуси, г. Гомель

В статье описываются преимущества, технология выделения мезенхимальных стволовых клеток (МСК), их культивирование на полипропиленовом (ПП) сетчатом эндопротезе. Указывается на проблему способности к фиксации полученных стволовых клеток к полипропиленовому материалу.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, жировая ткань, имплант, полипропиленовый сетчатый эндопротез.

CULTIVATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS
IN POLYPROPYLENE MESH PROSTHESISV. V. Bereschenko¹, A. N. Lyzikov¹, A. N. Kondrachuk², M. N. Danchenko²,
D. R. Petrenev¹, E. V. Voropayev¹¹Gomel State Medical University²Institute of Radiobiology of NAS Belarus, Gomel

The article describes the advantages, technology of selection of mesenchymal stem cells, their cultivation on polypropylene mesh prosthesis. The problem of an ability to fix the derived stem cells to polypropylene materials is specified.

Key words: mesenchymal stem cells, adipose tissue, implant, polypropylene mesh implant.

Введение

Среди большого разнообразия типов стволовых клеток, которые предлагаются к использованию, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) жировой ткани заслуживают особого внимания. В течение длительного времени жировая ткань рассматривалась как пассивное депо энергетических субстратов. Однако к настоящему времени она получила статус эндокринного органа с разнообразными функциями. Жировая ткань сама секретирует целый спектр важных регуляторных факторов и чутко реагирует на смену условий в организме. Так что не удивительно, что в ней были обнаружены стволовые клетки [1].

Популяцию клеток, полученных из жировой ткани, принято называть стромально-васкулярной фракцией. Она включает в себя разные группы клеток: моноциты, макрофаги, Т-лимфоциты, фибробласты, перициты, гладкомышечные клетки, эндотелиоциты и преадипоциты. Впервые подобные клетки были выделены еще в 70-х годах, но к их практическому применению пришли только в последние годы, благодаря усовершенствованию технологий липосакции и клеточных технологий. Согласно рекомендациям Между-

народного общества по применению технологий с жировой тканью для МСК, выделенных из жировой ткани, принято определение «стволовые клетки жировой ткани» (Adipose-Derived Stem Cells — ASCs).

Адипоциты могут быть получены под местной анестезией при сравнительно малоболезненной косметической липосакции, липоаспирации подкожного жира или в ходе эксцизии жировых отложений. Кроме того, получение жировой ткани может являться сопутствующей процедурой при лапароскопических, лапаротомических и других хирургических вмешательствах. Количество клеток, полученных из липоасpirата, намного превышает объемы, которые могут быть получены из других источников, если сравнивать общую травматичность и длительность манипуляции. Оптимальный объем липоасpirата для эффективного выделения клеток — 200–250 мл. Возможность же последующего культивирования позволяет нарастить клеточную массу до необходимого количества и вовсе из малых количеств материала (от 5 мл липоасpirата). Немаловажен и тот факт, что в сравнении, например, с костным

мозгом, в котором только 0,01–0,001 % ядерных клеток имеют признаки МСК, в жировой ткани этот показатель на порядки выше [1].

Для многих пациентов значимым аргументом служит то, что полученные клетки жировой ткани являются аутологичными, и это сводит к минимуму вероятность реакции отторжения трансплантата. Наиболее перспективной является направленная дифференцировка ASCs в нужные для пациента типы клеток с помощью использования специальных условий культивирования и различных цитокинов. В экспериментальных работах на культурах клеток человека и животных показано, что кроме классической дифференцировки в жировые, хрящевые и клетки костной ткани, из ASCs ученым удавалось получить клетки сердечной мышцы, клетки сосудов, мышечные и нейронно-подобные клетки, эпителий сетчатки [1, 2].

Ежегодно в мире выполняется более 20 млн. операций грыжесечения, что составляет 10–15 % от всех оперативных вмешательств [3, 4, 5]. Вместе с тем количество больных с грыжей передней брюшной стенки продолжает оставаться высоким и доходит до 7 % взрослого населения планеты. Также от 3 до 19 % лапаротомий приводят в последующем к образованию послеоперационных вентральных грыж [6, 7, 8]. За последнее десятилетие наблюдается стремительное развитие использования синтетических материалов и отказ от традиционных методик в герниопластике. Во всем мире является «золотым» стандартом использование синтетических материалов сетчатой структуры при герниопластике. Это позволило уменьшить число рецидивов заболевания до 0,7–1,4 % [9]. Однако отдаленные результаты протезирующей герниопластики могут снижать качество жизни пациентов вследствие чувства «инородного» тела, хронического болевого синдрома от 1 до 30 % [10]. Развитие данных осложнений зависит от травматичности вмешательства, вида герниопластики, массы и плотности протеза, его физических и химических характеристик [11, 12].

Наиболее часто используются протезы из полипропилена (ПП) и политетрафторэтилена (ПТФЭ) из-за их относительной дешевизны, простоте изготовления и сохранения механической прочности.

ПП имплант из-за выраженной реакции организма вызывает формирование грубой соединительно-тканной капсулы, сморщивающей протез. Не решен вопрос о минимизации реакции на имплантацию ПП. Попытки создать более эластичный и более «легкий» протез за счет комбинации ПП с рассасывающимися материалами не только не улучшил, а даже ухудшил результаты лечения больных с послеоперационными вентральными грыжами [13].

Протез из ПТФЭ имеет ряд недостатков: он обладает низкой сопротивляемостью к инфекции и при развитии раневой инфекции его необходимо удалять. Размер пор 1–6 мкм не обеспечивает сквозное прорастание соединительной тканью, которая покрывает протез снаружи и не дает надежную фиксацию. Незначительный размер пор, высокая гидрофобность, отрицательный электрический заряд предотвращают клеточное внедрение, содействуют персистенции бактерий, так как они в ячейках защищены от уничтожения макрофагами [14].

Данные литературных источников указывают, что на сегодняшний день отсутствует оптимальный синтетический материал для протезирующих герниопластик.

Материалы и методы

Объектом исследования были МСК ЖТ белых беспородных лабораторных крыс-самцов (возраст 8 месяцев, масса тела 180–200 г), культивированные на сетчатом эндопротезе «Эсфил», применяемом для пластики грыжевых дефектов. Хирургическая сетка «Эсфил» («Линтекс», Россия) состояла из мононитей монофиламентного ПП. Диаметр нити 0,12 мм, толщина сетки 0,5 мм, поверхностная плотность 62 г/м², объемная пористость 85 %. Экспериментальные исследования проводились в соответствии с приказом Минвуза СССР № 742 от 13 ноября 1984 г. «Об утверждении правил работ с использованием экспериментальных животных», Конвенцией по защите животных, используемых в эксперименте и других научных целях, принятой Советом Европы в 1986 г., согласно «Положению о порядке использования лабораторных животных в научно-исследовательских работах и педагогическом процессе Гомельского государственного медицинского института и мерах по реализации требований биомедицинской этики», утвержденному Ученым Советом ГГМУ № 54-А от 23.05.2002 г., и требованиями, регламентирующими работу с экспериментальными животными.

Выделение МСК жировой ткани

Образцы жировой ткани размером 0,5–1 см³, полученные путем лапаротомии от участка большого сальника крыс-самцов, помещали в стерильный холодный (4 °С) раствор Хэнкса. Ткань гомогенизировали механически с помощью хирургических инструментов (ножницы, пинцеты). Фрагменты ткани энергично встряхивали на вортексе. Полученную суспензию смешивали с равным объемом раствора 0,075 % коллагеназы I типа (Sigma, США). Инкубировали в течение 45–60 мин при 37 °С (в термостате) при периодическом (каждые 10–15 мин) легком помешивании. Для нейтрализации фермента добавляли к смеси равный объем фосфатного буфера (р-р Хэнкса) с 10 % ФБС. Цен-

трифугировали при 1200 rpm (330 g) 10 мин. Отбирали и удаляли супернатант, оставляя примерно 1–2 мл осадка. Снова добавляли 8–10 мл фосфатного буфера (р-р Хэнкса) с 10 % ФБС с последующим центрифугированием в течение 10 с при 1200 rpm (330 g).

Полученную суспензию клеток осторожно собирали в стерильную пробирку и отмывали с 10–15 мл раствора Хэнкса с 2 % телячьей эмбриональной сывороткой путем центрифугирования в течение 7 мин при скорости 1000 rpm. Процедуру отмывки повторяли дважды. Полученный супернатант помещали в новую стерильную пробирку. Оставшийся осадок удаляли. Полученную клеточную суспензию отмывали добавлением 8–10 мл фосфатного буфера (р-р Хэнкса) с 10 % ФБС. После максимально возможного удаления супернатанта объем клеточной суспензии доводился до 1–2 мл.

Подсчитывали количество клеток и оценивали жизнеспособность, используя камеру Горяева.

Культивирование МСК жировой ткани

Клеточную суспензию для получения первого пассажа высевали в концентрации 1×10^4 клеток на 1 см^2 в культуральные флаконы. В качестве культуральной среды использовали Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), содержащей 10 % ЭТС, 1 % раствора глутамина и смеси антибиотиков: пенициллин — 100 U/ml, стрептомицин — 100 µg/ml, неомицин — 0,25 µg/ml («Sigma», США). Флаконы помещали в CO₂-инкубатор (37 °C, 5 % CO₂) и выдерживали для прикрепления клеток в течение 48 ч. Среду с неприкрепившимися клетками удаляли, культуры бережно отмывали D-PBS и заменяли среду культивирования на свежую. Дальнейшие смены среды проводили через 3–4 суток. Мониторинг культуры проводили с помощью инвертированного микроскопа. По ме-

ре роста и достижения субконфлюентного состояния (75 % конфлюэнтности) клетки снимали 0,25 % трипсином-ЭДТА («Sigma», США) и пересевали в новые флаконы с разведением 1:3–1:10. Для экспериментов использовали МСК второго пассажа.

Культивирование МСК совместно с сетчатым эндопротезом

Клетки отмывали D-PBS и помещали в лунки 6-луночного планшета («Sarstedt GmbH», Германия). Было использовано 10 сеток для опытной и 2 — для контрольной группы. В планшет с сетками засеивали МСК второго пассажа в количестве 2×10^4 клеток на см^2 в 1 мл полной культуральной среды DMEM. Сетки во избежание всплывания прижимали ко дну фрагментами стерильных наконечников дозаторов. Культивирование проводили в течение 7 суток.

По окончании культивирования среду в планшете осторожно заменяли на PBS, содержащий смесь ДНК-тропных флуоресцентных красителей: Hoechst 33258 (проникает через интактную плазматическую мембрану, окрашивает ядра живых и мертвых клеток, имеет голубую флуоресценцию) и пропидиум йодид (не проникает через интактную плазматическую мембрану, окрашивает ядра только мертвых клеток, имеет красную флуоресценцию). Инкубировали 10 минут, после чего микроскопировали. Флуоресцентный микроскоп — Люмам И1 («ЛЮМО» Россия).

Результаты и обсуждение

Основные стадии формирования первичных колоний и роста культур МСК не отличались от описанных в литературных источниках [15, 16, 17]. На 2 пассаже культуры были представлены морфологически гомогенной популяцией одноядерных фибробластоподобных веретеновидных клеток, иногда с небольшим количеством отростков (рисунок 1.)

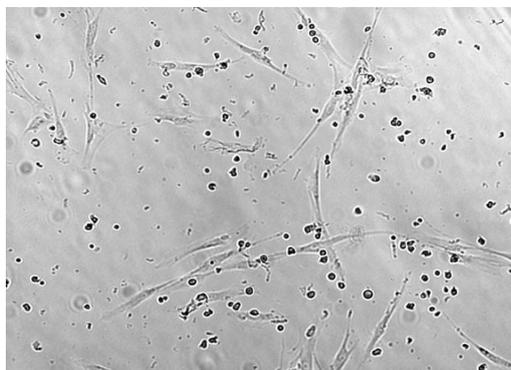


Рисунок 1 — Морфология нативной культуры МСК, 2 пассаж, 7 сутки культивирования. Объектив 30x

В логарифмической фазе роста среднее время удвоения клеточных популяций варьировало от 18 до 36 ч. Известно, что липоаспират превосходит костный мозг по выходу стро-

мальных клеток [15]. Это может быть связано с особенностями кровоснабжения жировой ткани и высокой плотностью капилляров. Однако среди эндотелиальных клеток, перицитов, тка-

невых фибробластов и некоторых других клеточных типов, попадающих в осадочную фракцию после центрифугирования и способных прикрепляться к поверхности культурального пластика, вероятно, только МСК находят необходимые условия для активного роста.

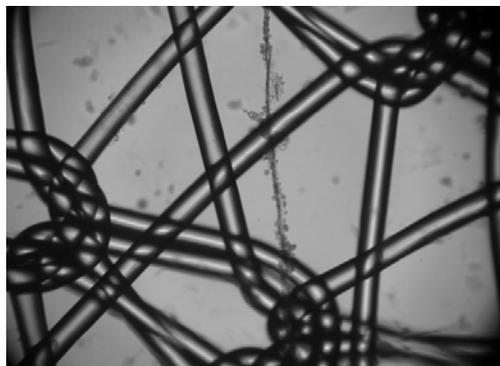


Рисунок 2 — Микроскопия культуры МСК под световым микроскопом. Фокусирование на поверхности сетки. Объектив 4x

Для мониторинга пролиферации культуру клеток микроскопировали под световым инвертированным микроскопом Leica DM IL (Leica Microsystems, Германия), увеличение 4x. Фокусировка объектива осуществлялась на разных уровнях: на поверхности сетки, на дне плашки (рисунки 2–3).

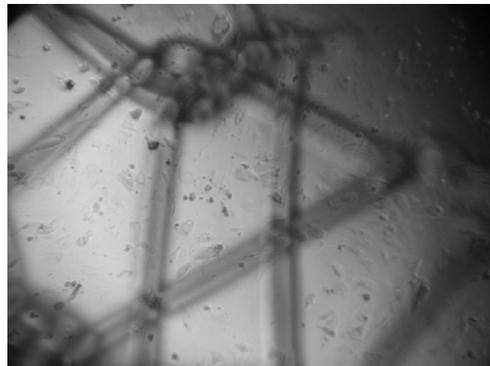


Рисунок 3 — Микроскопия культуры МСК под световым микроскопом. Фокусирование на клетках, прикрепленных на поверхности планшета. Объектив 4x

При проведении флуоресцентной микроскопии на хирургической сетке «Эсфил» были обнаружены редкие одиночно расположенные живые клетки, ядра которых окрасились в голубой цвет. Распределение клеток на синтетическом материале было неоднородным, как правило, только в участках переплетения нитей и узлах. В качестве контрольного образца использовали клетки костного мозга крыс, полученные за сутки до исследования (хранение при температуре 4 °С). К контрольному образцу добавляли 5 мл раствора Hoechst 33258 в PBS и 20 мкл пропидий йодида. Инкубировали 10 мин. Микроскопировали под флуоресцентным микроскопом, используя голубой фильтр-насадку, объектив 30x.

С целью исключения возможных потерь клеток при процедуре отмывки было проведено окрашивание сетчатого материала непосредственно в лунках планшета в культуральной среде и без нее.

Для этого в лунки планшета, содержащие фрагменты хирургической сетки и культуру

МСК, добавили 2 мл раствора Hoechst 33258 в PBS и 20 мкл пропидий йодида в концентрации 25 мкг/мл. Параллельно из других лунок отбирали культуральную среду и добавляли 2 мл раствора Hoechst 33258 в PBS и 20 мкл пропидий йодида (концентрация 25 мкг/мл). Проводили флуоресцентную микроскопию.

В данных вариантах экспериментов, к сожалению, не удалось получить удовлетворительное изображение, так как культуральная среда, содержащая индикатор феноловый красный, давала сильный аутофлуоресцентный фон, не позволяющий провести дифференцирование клеток, содержащих флуоресцентные красители.

Для подтверждения роста клеток лунки, из которых извлекли сетку, дважды отмыли рабочим раствором PBS и добавили 5 мл раствора Hoechst 33258 в PBS. Микроскопировали и находили поля зрения в проходящем свете, затем переключали на флуоресцентную микроскопию (рисунок 4).



Рисунок 4 — Микроскопия в проходящем свете культуры МСК, закрепленной на дне лунки планшета (стрелками указаны МСК). Объектив 30x

При подсчете МСК, закрепленных на поверхности планшета, число жизнеспособных клеток варьировало от 72 до 84 в поле зрения, в то время как количество клеток, фиксированных на ПП эндопротезе, было единичным — 2–4 в поле зрения.

Заключение

1. Адаптирован и апробирован оптимальный метод выделения МСК из жировой ткани лабораторных животных (крыс).

2. В экспериментальной модели на лабораторных животных проведен анализ возможности применения ПП сетчатого эндопротеза в качестве внеклеточной опорной матрицы для культивирования МСК жировой ткани *in vitro* при разработке биоинженерных трансплантатов.

3. Количество МСК жировой ткани, зафиксированных на сетке, было единичным, и они, как правило, располагались на пересечении волокон. Количество клеток недостаточно для использования их в составе биоинженерных конструкций с использованием ПП.

4. Для повышения эффективности адгезии МСК ЖТ необходимо модифицирование ПП эндопротезов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Comparison of multilineage cells from human adipose tissue and bone marrow / D. A. De Ugarte [et al.] // *Cells Tissues Organs*. — 2003. — 174. — P. 101–109.
2. Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update / L. Casteilla [et al.] // *World J Stem Cells*. — 2011. — № 3(4). — P. 25–33.
3. Саенко, В. Ф. Актуальные проблемы современной герниологии / В. Ф. Саенко, Л. С. Белянский // *Клиническая хирургия*. — 2003. — № 11. — С. 3–5.
4. Опыт реконструктивных операций при послеоперационных ventralных грыжах с применением аутопластических и протезирующих методов / В. В. Жебровский [и др.] // *Вестник герниологии*. — 2004. — С. 46–52.
5. Абасов, Б. Х. Герниопластика огромных рецидивных ventralных грыж по способу Б. Х. Абасова / Б. Х. Абасов, Д. Н. Гаджиев // *Матер. конф. «Современные технологии в общей хирургии»*. — М., 2001. — С. 79.
6. Майстренко, Н. А. Негативные последствия хирургического лечения послеоперационных ventralных грыж. Возможности прогноза и пути профилактики / Н. А. Майстренко, А. Н. Ткаченко // *Вестник хирургии*. — 1998. — Т. 157, № 4. — С. 130–135.
7. Ramirez abdominoplasty for large incisional hernia: personal experience / G. Giordano [et al.] // *Chir. Ital.* — 2006. — Vol. 58, № 3. — P. 53–60.
8. Тимошин, А. Д. Хирургическое лечение паховых и послеоперационных грыж брюшной стенки / А. Д. Тимошин, А. В. Юрасов, А. Л. Шестаков. — М: Триада-Х, 2003. — 144 с.
9. Оценка качества жизни у пациентов после хирургического лечения паховой грыжи / В. В. Власов [и др.] // *Вестник герниологии*. — 2008. — № 3. — С. 42–46.
10. Amid, P. K. How to avoid recurrence in Lichtenstein tension-free hernioplasty // *Am. J. Surg.* — 2002. — Vol. 184. — P. 259–260.
11. Amid, P. K. Critical scrutiny of the open «tension-free» hernioplasty / P. K. Amid, A. G. Shulman, I. L. Lichtenstein // *Am. J. Surg.* — 1993. — Vol. 165. — P. 369–371.
12. Ануров, М. В. Эффективность восстановления передней брюшной стенки легкими и стандартными хирургическими сетками с одинаковым трикотажным переплетением / М. В. Ануров, С. М. Титкова, А. П. Эттингер // VII конференция. Актуальные вопросы герниологии. — М.: ИКАР, 2010. — С. 23–25.
13. Сравнительный анализ результатов использования полипропиленового и поливинилиденфторидного сетчатых имплантатов при протезировании передней брюшной стенки в эксперименте / В. А. Жуковский [и др.] // *Клиническая патофизиология*. — 2008. — № 2. — С. 46–51.
14. Abnormal collagen I to III distribution in the skin of patients with incisional hernia / U. Klinge [et al.] // *Eur Surg Res*. — 2000. — 32. — P. 43–48.
15. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells / A. Miranville [et al.] // *Circulation* — 2004 — Vol. 110. — P. 349–355.
16. Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction / M. Mazo [et al.] // *Eur J Heart Fail*. — 2008. — Vol. 10. — P. 454–462.
17. Adipose-Derived Stromal Cell Autologous Transplantation Ameliorates Pulmonary Arterial Hypertension Induced by Shunt Flow in Rat Models / K. Liu [et al.] // *Stem Cells and Development*. — 2011. — Vol. 20(6). — P. 1001–1010.

Поступила 13.06.2011