

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Барыш, А. Е. Конечно-элементное бисегментарное моделирование позвоночных двигательных сегментов CIV–CVI / А. Е. Барыш // Ортоп., травм. и протезир. — 2005. — № 1. — С. 41–49.
2. Верстак, В. А. 3DS Max 8. Секреты мастерства / В. А. Верстак. — СПб.: Питер, 2006. — 672 с.
3. Верстак, В. А. 3DS Max 8 на 100 % / В. А. Верстак, С. В. Бондаренко, М. Ю. Бондаренко. — СПб.: Питер, 2006. — 416 с.
4. Кузнецов, В. С. Вертеброневрология: клиника, диагностика, лечение заболеваний позвоночника / В. С. Кузнецов. — Минск: Книжный дом, 2004. — С. 180–191.
5. Никифоров, А. С. Остеохондроз позвоночника: патогенез, неврологические проявления и современные подходы к лечению / А. С. Никифоров, О. И. Мендель // Укр. мед. часопис. — 2009. — Т. 5–6, № 3 (71). — С. 29–35.
6. Парфенов, В. А. Диагноз и лечение при острых болях в нижней части спины / В. А. Парфенов // Рос. мед. журн. — 2007. — № 4. — С. 17–21.
7. Ширишов, А. В. Поясничный остеохондроз: клиника, диагностика, лечение / А. В. Ширишов, М. А. Пирадов // Рос. мед. журн. — 2004. — № 4. — С. 212–213.
8. 3D modeling and deformation analysis of the vertebra with spherical harmonics / G. Lefaix [et al.] // Engineering in Medicine and Biology Society, 1997. Proceedings of the 19th Ann. International Conf. of the IEEE. — 1997. — Vol. 1. — P. 422–425.

Поступила 29.01.2013

УДК 579:606+620.3:546.57

БИОСОВМЕСТИМЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПОКРЫТИЯ
ДЛЯ ЗАЩИТЫ ИМПЛАНТАТОВ ОТ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК¹Д. В. Тапальский, ¹В. А. Осипов, ¹Г. Н. Сухая,
²М. А. Ярмоленко, ²А. А. Рогачев, ²А. В. Рогачев¹Гомельский государственный медицинский университет
²Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины

Цель: оценить эффективность предотвращения формирования микробных биопленок на титановых поверхностях, содержащих антибактериальные покрытия различного состава, и выбрать оптимальный метод стерилизации имплантатов с антибактериальным покрытием.

Материалы и методы. Для семи типов полимерных покрытий оценена способность предотвращать формирование микробных биопленок *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Изучена эффективность физических методов стерилизации имплантатов с антибактериальными покрытиями.

Результаты. Выявлена способность полного предотвращения формирования микробных биопленок композиционными покрытиями полиуретан – ципрофлоксацин, полилактид – ципрофлоксацин и полиуретан – полилактид – серебро – ципрофлоксацин. Показано, что режимы паровой и воздушной стерилизации имплантатов с полимерными покрытиями позволяют достичь стерильности.

Заключение. Показана высокая микробиологическая эффективность антибактериальных покрытий. Выбран оптимальный режим паровой стерилизации (127 °С, 30 мин), не влияющий на бактерицидную активность образцов.

Ключевые слова: антибактериальные покрытия, наночастицы, серебро, ципрофлоксацин, полимеры, микробные биопленки, стерилизация.

BIOCOMPATIBLE COMPOSITE ANTIBACTERIAL COATINGS
FOR PROTECTION OF IMPLANTS AGAINST MICROBIAL BIOFILMS¹D. V. Tapalskiy, ¹V. A. Osipov, ¹G. N. Sukhaya,
²M. A. Yarmolenko, ²A. A. Rogachiov, ²A. V. Rogachiov¹Gomel State Medical University
²Gomel State University named after F. Skorina

Aim: to estimate efficacy of prevention of microbial biofilm formation on titanium surfaces containing antibacterial coatings with different components, and to choose the optimum method of sterilization for implants with antibacterial coating.

Materials and methods. The ability to prevent the formation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* microbial biofilms was estimated for seven types of polymeric coatings. The sterilization efficacy of the physical methods for implants with antibacterial coatings was studied.

Results. The study revealed the ability of complete prevention against microbial biofilm formation by composite coatings of polyurethane-ciprofloxacin, polylactide-ciprofloxacin and polyurethane-polylactide-silver-ciprofloxacin. It was shown, that the regimens of steam and air sterilization of the implants with polymeric coatings make it possible to reach sterility.

Conclusion. The study showed the increased microbiological efficacy of the antibacterial coatings. The optimal regimen of steam sterilization (127 °C, 30 minutes) not influencing the bactericidal activity of samples was chosen.

Key words: antibacterial coatings, nanoparticles, silver, ciprofloxacin, polymers, microbial biofilms, sterilization.

Бактериальные инфекции являются серьезными осложнениями при использовании катетеров и имплантатов. Инфекции, связанные с их

применением, являются результатом адгезии бактерий и последующего формирования микробных биопленок в месте имплантации. В боль-

шинстве случаев из-за отсутствия доступных эффективных средств воздействия на микробные биопленки единственным способом лечения имплантат-ассоциированных инфекций является извлечение контаминированных имплантатов [1].

Известно, что 99 % бактерий существуют в природных экосистемах в виде не свободно плавающих клеток, а специфически организованных, прикрепленных к субстрату биопленок. Причем сами бактерии составляют лишь 5–35 % массы биопленки, остальная часть — это межбактериальный матрикс [2, 3]. Микрофлора биопленки более устойчива к воздействию неблагоприятных факторов физической, химической и биологической природы по сравнению со свободно плавающими бактериями [4]. Биопленки устойчивы к высоким концентрациям антибиотиков, которые в 100–1000 раз превышают концентрации, подавляющие обычные клетки в культуральной среде [5–7].

Перспективным направлением в травматологии и ортопедии является создание таких свойств имплантата, при которых не будет происходить образование биопленки. В настоящее время ряд исследователей пытается решить эту проблему при помощи нанесения на поверхности имплантатов покрытий с различными антибиотиками либо напылением серебра [8]. Одним из вариантов решения проблемы имплантат-ассоциированных инфекций является нанесение на ортопедические (травматологические) имплантаты специальных покрытий, обеспечивающих локальное длительное по времени высвобождение антибактериальных веществ в непосредственной близости от имплантата. Важным требованием является программируемая длительность и интенсивность высвобождения активного вещества, которые должны препятствовать возникновению устойчивых штаммов бактерий [9, 10].

С учетом высокой частоты инфекционных осложнений, наблюдающихся при проведении внешней фиксации переломов (стержневые аппараты внешней фиксации), для апробации разрабатываемых покрытий было предложено модифицировать стержневой аппарат внешней фиксации переломов с нанесением антибактериального покрытия на винты Шанца. Ком-

плексное наноструктурное покрытие, наносимое на поверхность имплантата, должно состоять из антибактериального химиопрепарата и биодеструктурируемого полимера, содержащего бактерицидные нанокластеры серебра. Данное покрытие должно: обладать выраженным универсальным бактерицидным действием в раннем послеоперационном периоде (1–2 недели) в отношении всех клинически значимых микроорганизмов, включая полиантибиотикорезистентные изоляты; сохранять антибактериальный эффект в отношении микроорганизмов-возбудителей раневых инфекций в течение всего срока нахождения имплантата в организме (не менее 6–12 недель) и препятствовать формированию бактериальных биопленок на поверхности имплантированного изделия; являться биосовместимым и не оказывать раздражающего действия на ткани в месте имплантации, не оказывать системного действия на организм, связанного с высвобождением антибактериальных факторов.

Одним из критериев использования биодеструктурируемых полимеров в ортопедии является их устойчивость к стерилизации [11]. Воздействие стерилизующих факторов может вызвать деструкцию полимерной цепи, что приводит к снижению молекулярной массы полимера, которое, в свою очередь, отрицательно сказывается на механических свойствах и времени биодеградации.

Цель исследования

Оценить эффективность предотвращения формирования микробных биопленок на титановых поверхностях, содержащих антибактериальные покрытия различного состава, и выбрать оптимальный метод стерилизации титановых имплантатов с антибактериальным покрытием.

Материалы и методы

Методом электронно-лучевого осаждения из активной газовой фазы сформированы моноконпонентные и композиционные покрытия, содержащие наночастицы серебра. Схема осаждения покрытий представлена на рисунке 1. Покрытия формировались на титановых образцах (пластины $12,5 \times 40$ мм из титана марки ВТ-1), наносились на обе стороны образцов. Состав антибактериальных покрытий приведен в таблице 1.

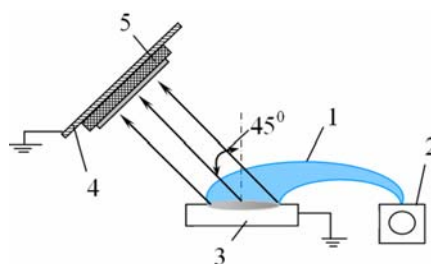


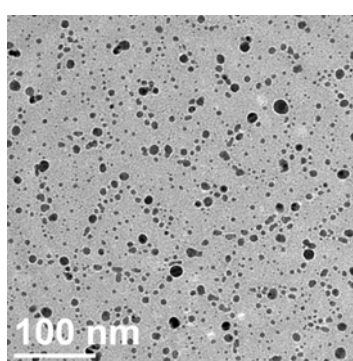
Рисунок 1 — Схема осаждения покрытий из активной газовой фазы:
1 — электронный луч; 2 — электронно-лучевой прожектор с поворотом луча на 180°;
3 — тигель со смесью диспергируемых веществ; 4 — подложкодержатель; 5 — подложка

Таблица 1 — Состав полимерных композиционных антибактериальных покрытий

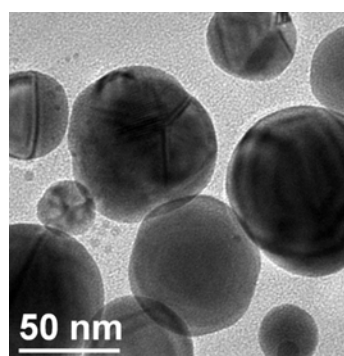
№ п/п	Обозначение	Состав покрытия
1.	ПУ	Монокомпонентное покрытие на основе полиуретана
2.	ПЛ	Монокомпонентное покрытие на основе полилактида
3.	ПУ – Ц	Двухкомпонентное композиционное покрытие полиуретан-ципрофлоксацин
4.	ПЛ – Ц	Двухкомпонентное композиционное покрытие полилактид-ципрофлоксацин
5.	ПУ – Ag	Наноконпозиционное покрытие полиуретан-серебро
6.	ПЛ – Ag	Наноконпозиционное покрытие полилактид-серебро
7.	ПУ – ПЛ – Ag – Ц	Наноконпозиционное покрытие полиуретан-полилактид-серебро-ципрофлоксацин

Ранее было показано, что наноконпозиционные слои представляют собой полимерную матрицу с распределенными внутри нее частицами серебра со средним размером около 20

нм [12]. Результаты электронной просвечивающей микроскопии комплексных покрытий на основе полимеров и наночастиц серебра представлены на рисунке 2.



а



б

Рисунок 2 – Результаты электронной просвечивающей микроскопии покрытий на основе полиуретана и наночастиц серебра (а) и на основе поли-L-лактида и наночастиц серебра (б)

Для изучения эффективности предотвращения формирования микробных биопленок на поверхностях, содержащих покрытия различного состава, использовались две референсные антибиотикочувствительные культуры Американской коллекции типовых культур (АТСС) и один клинический полиантибиотикорезистентный изолят, выделенный от больного с посттравматическим остеомиелитом:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (антибиотикочувствительный);
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (антибиотикочувствительный);
- *Pseudomonas aeruginosa* 50127 MBL (полиантибиотикорезистентный: устойчивый к пиперациллину, пиперацillin/тазобактаму, цефоперазону, цефоперазон/сульбактаму, цефтазидиму, цефепиму, имипенему, меропенему, доприпенему, азтреонаму, азтреонам/тазобактаму, ципрофлоксацину, левофлоксацину, гентамицину, нетилимицину, амикацину, фосфомицину; продуцирующий метало-β-лактамазу).

Стерильные опытные и контрольные образцы (титановые пластины 12,5 × 40 мм) помещали в центрифужные пробирки с 8 мл питательного бульона, содержащего 106 клеток/мл тест-

культуры. Покрытия всех типов тестировались в отношении каждой из бактериальных культур трижды. Дополнительно серия из трех образцов каждого типа исследовалась как «контроль стерильности» (тест-культуры в бульон не вносились).

Пробирки с образцами инкубировались на шейкере при 37 °С 24 ч. Для количественной оценки толщины сформированных биопленок после инкубации проводили окрашивание титановых образцов 0,1 % водным раствором кристаллического фиолетового (30 мин, 37 °С). После окраски образцы ополаскивали дистиллированной водой и обесцвечивали в течение 1 часа 96-процентным этанолом (8 мл на образец). Полученные в результате отмывки спиртовые растворы и стандартные спиртовые растворы кристаллического фиолетового вносили в лунки плоскодонного 96-луночного полистиролового планшета, измерение концентрации кристаллического фиолетового проводили на анализаторе иммуноферментном АИФ-М/340, длина волны 540 нм. Считали, что биомасса сформированной на поверхности образцов биопленки прямо пропорциональна концентрации кристаллического фиолетового в отмывочном растворе. Массу биопленки представляли как

массу красителя, поглощенного биопленкой при окрашивании, и рассчитывали по формуле:

$$m = V(C_1 + C_2 + C_3 - F_1 - F_2 - F_3) / 3,$$

где m — масса кристаллического фиолетового, поглощенного биопленкой, мкг;

V — объем отмывочного раствора для одного образца, мл;

C_1, C_2 и C_3 — концентрации красителя в отмывочных растворах серии опытных образцов, мкг/мл;

F_1, F_2 и F_3 — концентрации красителя в отмывочных растворах серии образцов «контроль стерильности», мкг/мл.

Для выбора оптимального режима стерилизации в качестве тест-образцов использовали титановые имплантанты (винты Шанца) и титановые пластины $12,5 \times 40$ мм с нанесенным антибактериальным покрытием (нанокпозиционное покрытие на основе ципрофлоксацина, хло-

рида серебра, полиуретана и поли-L-лактида с массовым соотношением компонент в исходной смеси 1:2:4:2). Вместе с тест-образцами исследовали контрольные образцы без покрытий. Режимы стерилизации приведены в таблице 2.

Для контроля эффективности стерилизации титановых имплантантов с антибактериальными покрытиями проведен микробиологический контроль их стерильности в соответствии с инструкцией 4.2.10-22-1-2006 «Методы микробиологического контроля санитарно-гигиенического состояния помещений в организациях здравоохранения и стерильности изделий медицинского назначения». Контроль стерильности проводили путем полного погружения контрольных и опытных образцов в питательные среды с последующей инкубацией в течение 14 суток (сахарный бульон и тиогликолевая среда — при температуре 35°C , бульон Сабуро — при температуре 25°C).

Таблица 2 — Режимы стерилизации титановых образцов

№ серии образцов	Метод стерилизации	Температура, $^\circ\text{C}$	Давление, атм.	Экспозиция, мин
1	Паровой	121	1,1	30
2	Паровой	127	1,5	30
3	Воздушный	160	—	60

Для оценки влияния различных методов стерилизации на антибактериальную активность тест-образцов проведено изучение интенсивности формирования микробных биопленок на титановых пластинах $12,5 \times 40$ мм с нанесенным антибактериальным покрытием (нанокпозиционное покрытие на основе ципрофлоксацина, хлорида серебра, полиуретана и поли-L-лактида с массовым соотношением компонент в исходной смеси 1:2:4:2), стерилизованных в трех различных режимах. В качестве контрольных образцов использовали стерильные титановые пластины $12,5 \times 40$ мм без антибактериального покрытия. Исследование выполнено с культурами *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* 50127 MBL по вышеописанной методике. Интенсивность формирования микробных биопленок на титановых пластинах оценивали визуально после окрашивания кристаллическим фиолетовым по четырехкестрной системе.

Результаты

Результаты определения интенсивности формирования микробных биопленок на поверхности образцов представлены в таблице 3. Для двухкомпонентных покрытий полиуретан-ципрофлоксацин, полилактид-ципрофлоксацин отмечено полное подавление роста всех тест-культур микроорганизмов не только на поверхности образцов, но и во всем объеме бульонной питательной среды. Нанокпозиционное покрытие полиуретан-полилактид-серебро-ципро-флоксацин полностью подавляло рост *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *S. aureus* ATCC 25923 в бульонной питательной среде. Биопленки

на поверхности образцов с данными типами покрытий не обнаруживались. Выявлен рост микробных биопленок на поверхности контрольных образцов (без покрытий) и на поверхности образцов с нанесенными монокомпонентными полимерными покрытиями без антибактериальных факторов (монокомпонентные покрытия на основе полиуретана и полилактида). На поверхности образцов, содержащих нанокпозиционные покрытия ПУ-Аг и ПЛ-Аг, толщина биопленок для различных тест-культур составила от 4,8 до 22,3 % по отношению к толщине биопленок на поверхности контрольных образцов, что свидетельствует о выраженной антибактериальной активности данного типа покрытий.

Таким образом, выявлена способность полного предотвращения формирования микробных биопленок как для двухкомпонентных композиционных покрытий полиуретан – ципрофлоксацин, полилактид – ципрофлоксацин, так и для нанокпозиционного покрытия полиуретан – полилактид – серебро – ципрофлоксацин.

При проведении контроля стерильности опытных (с покрытиями) и контрольных титановых образцов, стерилизованных в различных режимах, показано отсутствие роста во всех пробирках. Таким образом, все выбранные режимы стерилизации изделий с комплексными полимерными антибактериальными покрытиями позволяют достичь стерильности.

Результаты определения интенсивности формирования микробных биопленок на поверхности контрольных и опытных образцов, стерилизованных в различных режимах, представлены в таблице 4.

Таблица 3 — Интенсивность формирования микробных биопленок на поверхности образцов

Состав покрытия	Масса красителя, сорбированная биопленкой, мкг		
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i> 50127 MBL	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Монокомпонентное покрытие ПУ	6,04	3,96	4,84
Монокомпонентное покрытие Пл	9,51	5,50	7,61
Двухкомпонентное композиционное покрытие ПУ – Ц	0*	0*	0*
Двухкомпонентное композиционное покрытие Пл – Ц	0*	0*	0*
Нанокоспозиционное покрытие ПУ – Ag	0,23	0,86	0,31
Нанокоспозиционное покрытие Пл – Ag	1,08	1,39	0,46
Нанокоспозиционное покрытие ПУ – Пл – Ag – Ц	0*	0,22	0*
Контроль (без покрытия)	4,84	9,73	2,95

* Отсутствие видимого роста микроорганизмов в объеме бульонной питательной среды

Таблица 4 — Интенсивность формирования микробных биопленок на поверхности опытных и контрольных образцов, стерилизованных в различных режимах

Метод стерилизации	№ серии	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i> 50127 MBL
Паровой, 121 °С, 30 мин	1а (с покрытием)	–	–	+/-
	1б (контрольный)	++++	++++	++++
Паровой, 127 °С, 30 мин	2а (с покрытием)	–	–	–
	2б (контрольный)	++++	++++	++++
Воздушный, 160°С, 60 мин	3а (с покрытием)	–	+/-	++
	3б (контрольный)	++++	++++	++++

Для контрольных образцов (стерильные титановые пластины без антибактериальных покрытий) отмечен интенсивный рост культур микроорганизмов в объеме питательной среды и интенсивное формирование микробных биопленок на поверхности образцов. Для опытных образцов с комплексным антибактериальным покрытием полиуретан – полилактид – ципрофлоксацин – серебро, стерилизованных паровым методом, отмечено полное подавление видимого роста антибиотикочувствительных культур *S.aureus* ATCC 25923 и *P.aeruginosa* ATCC 27853 во всем объеме питательной среды. Образцы, стерилизованные воздушным методом (160°, 60 мин), полностью подавляли видимый рост *S.aureus* ATCC 25923. Интенсивный рост полиантибиотикорезистентного штамма *P.aeruginosa* 50127 MBL наблюдался в объеме питательной среды с образцами, стерилизованными во всех трех режимах, что может быть связано с высокой минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) ципрофлоксацина для данного изолята, которая в 128–256 раз превышает МИК ципрофлоксацина для *P. aeruginosa* ATCC 27853 и в 512 раз — для *S. aureus* ATCC 25923. Тем не менее, даже при наличии видимого роста в объеме питательной среды микробные биопленки *P. aeruginosa* 50127 MBL полностью отсутствовали на поверхности образцов с покрытиями, стерилизованными паровым методом при 127 °С. Интенсивность формирования микробной биопленки *P. aeruginosa* 50127

MBL на поверхности опытных образцов, стерилизованных при 121 °С, была значительно ниже (1+ по четырехкестной системе) по сравнению с контрольными образцами без покрытий.

Стерилизация воздушным методом при 160 °С несколько снижала антибактериальную активность покрытий (интенсивность пленкообразования штаммом *P. aeruginosa* 50127 MBL – 2+, *P. aeruginosa* ATCC 27853 – 1+, рост *S. aureus* ATCC 25923 отсутствовал как на поверхности опытных образцов, так и в объеме питательной среды).

Таким образом, оптимальным методом в плане предотвращения выраженной деструкции биодegradуемого полимера и сохранения поверхностной бактерицидной активности покрытия является паровая стерилизация в режиме 127°С – 1,5 атм. – 30 мин.

Заключение

Выявлена способность полного предотвращения формирования микробных биопленок двухкомпонентными композиционными покрытиями полиуретан-ципрофлоксацин, полилактид-ципрофлоксацин и нанокоспозиционным покрытием полиуретан-полилактид-серебро-ципрофлоксацин.

Проведенное изучение эффективности физических методов стерилизации имплантатов с антибактериальными покрытиями позволило выбрать оптимальный режим паровой стерилизации (127 °С, 30 мин), который не оказывает существенного влияния на молекулярную структуру по-

лимеров и после проведения которого полностью сохраняется бактерицидная активность образцов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Infections associated with medical devices / C. Von Eiff [et al.] // *Drugs*. — 2005. — Vol. 65. — P. 179–214.
2. *Watnick, P.* Biofilm, city of microbes / P. Watnick, R. Kolter // *J Bacteriology*. — 2000. — Vol. 182. — P. 2675–2679.
3. *Costerton, J. W.* Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections / J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg // *Science*. — 1999. — Vol. 284. — P. 1318–1322.
4. *Тец, В. В.* Бактериальные сообщества. В кн.: Клеточные сообщества / В. В. Тец; под ред. В. Теца. — СПб.: Изд-во СПбГМУ, 1998. — С. 15–73.
5. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections / W. Costerton [et al.] // *Clinical Investigation*. — 2003. — Vol. 112. — P. 1466–1477.
6. *O'Toole, G. A.* Biofilm formation as microbial development / G. A. O'Toole, H. B. Kaplan, R. Kolter // *Ann. Rev. Microbiol.* — 2000. — Vol. 54. — P. 49–79.
7. *Davies, D.* Understanding biofilm resistance to antibacterial agents / D. Davies // *Nat Rev Drug Discov* 2003. — Vol. 2. — P. 114–122.
8. *Knetsch, M. L.* New strategies in the development of antimicrobial coatings the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles / M. L. Knetsch, L. H. Koole // *Polymers*. — 2011. — Vol 3. — P. 340–366.
9. Биосовместимые полимерные антибактериальные покрытия с пролонгированным высвобождением ципрофлоксацина / М. А. Ярмоленко [и др.] // *Антибиотики и химиотерапия*. — 2007. — Т. 52. — С. 3–7.
10. *Hetrick, E. M.* Reducing implant-related infections: active release strategies / E. M. Hetrick, M. H. Schoenfisch // *Chemical Society Reviews*. — 2006. — Vol. 35. — P. 780–789.
11. *Middleton, J. C.* Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices / J. C. Middleton, A. J. Tipton // *Biomaterials*. — 2000. — Vol. 21, № 23. — P. 2335–2346.
12. Биосовместимые полимерные антибактериальные покрытия с пролонгированным высвобождением ципрофлоксацина / М. А. Ярмоленко [и др.] // *Антибиотики и химиотерапия*. — 2007. — Т. 52, № 11–12. — С. 3–7.

Поступила 07.02.2013

УДК 616.36: 611.018.26: 602.9

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ В ГЕПАТОЦИТАРНОМ НАПРАВЛЕНИИ

А. Г. Скуратов, Д. Р. Петренев, А. Н. Кондрачук, Е. В. Воропаев

Гомельский государственный медицинский университет

Цель работы: оценить фенотипические изменения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) при их дифференцировке в гепатоцитарном направлении.

Материалы и методы. Костномозговые МСК; изолированные гепатоциты, выделенные методом ферментативной перфузии печени; направленная гепатогенная дифференцировка МСК согласно имеющимся и адаптированным протоколам; световая микроскопия; оценка функциональной способности гепатоцит-подобных клеток синтезировать и накапливать гликоген.

Результаты. Наблюдаемые изменения в фенотипе на протяжении этапов дифференцировки свидетельствуют о присутствии в культуре клеток, дифференцированных в гепатоцитарном направлении. МСК приобретали сначала веретенообразный фенотип, который затем сменялся полигональным с многочисленными выростами мембраны. Обнаружены кластеры гепатоцит-подобных клеток с положительной реакцией на гликоген. Наличие ростовых факторов дифференцировочных сред и выделяемых первичными гепатоцитами оказывало «стабилизирующее» влияние на культуру МСК.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, изолированные гепатоциты, гепатогенная дифференцировка.

PHENOTYPIC CHANGES OF MESENCHYMAL STEM CELL IN THEIR DIFFERENTIATION IN HEPATOCYTIC DIRECTION

A. G. Skuratov, D. R. Petrenyov, A. N. Kondrachuk, Y. V. Voropayev

Gomel State Medical University

Objective: to evaluate the phenotypic changes of mesenchymal stem cells (MSCs) in their differentiation in hepatocytic direction.

Materials and methods. Bone-marrow MSCs; hepatocytes isolated by enzymatic perfusion of the liver; directed hepatocytic differentiation of MSCs according to the available and adapted protocols, light microscopy, evaluation of the functional capacity of hepatocyte-like cells to synthesize and accumulate glycogen.

Results. The changes observed in the phenotype during differentiation stages indicate the presence of cells differentiated in hepatocytic direction in the culture. MSCs first gained a spindle-shaped phenotype, which then changed to a polygonal membrane with numerous appendages. The clusters of hepatocyte-like cells positive for glycogen were found. The presence of growth factors, differentiation media and allocated primary hepatocytes had a «stabilizing» effect on the culture of MSCs.

Key words: mesenchymal stem cells, isolated hepatocytes, differentiation in hepatocytic direction.

Введение

В последние годы бурно развиваются технологии по индукции дифференцировки МСК в клетки, которые обладают функциями печени

(гепатоцит-подобные клетки) Мировые научные исследования показали, что определенные комбинации ростовых факторов, а также совместное культивирование МСК как с гепато-