

# МОДИФИКАЦИЯ КОЛЛАГЕНООБРАЗОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ И ПРИ АУТОТРАНСПЛАНТАЦИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ ГРЫЖ ЖИВОТА

В.Г.Богдан, М.М.Зафранская\*, Ю.М.Гаин\*, Ю.Е.Демидчик\*, С.С.Багатка\*, Г.И.Иванчик\*

Военно-медицинский факультет в УО “Белорусский государственный медицинский университет”;  
\*ГУО Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск

---

Мезенхимальные стволовые клетки из жировой ткани пациентов с послеоперационными грыжами избыточно продуцируют коллаген III типа, с изменением соотношения коллагена III и I типа. Предложенный способ предтрансплантационной подготовки позволяет *in vitro* активировать процессы коллагенообразования с усилением синтеза коллагена I типа и нивелированием нарушения соотношения коллагенов. Применение для пластики передней брюшной стенки полипропиленовой хирургической сетки в сочетании с аутоотрансплантацией мезенхимальных стволовых клеток приводит к уменьшению соотношения коллагена III и I типа за счет повышения содержания коллагена I типа и снижения продукции коллагена III типа, что положительно влияет на структуру синтезируемой *in vivo* соединительной ткани.

---

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, послеоперационная грыжа, коллаген, аутоотрансплантация

В последние десятилетия было подтверждено и обосновано многообразие патогенеза грыж живота, в том числе и послеоперационных вентральных грыж (ПОВГ). В основе биохимической концепции развития и рецидивирования грыж лежит изменение метаболизма коллагена, приводящее к уменьшению механической прочности соединительной ткани [1,3,6,19,22].

Выделяют наследственные нарушения соединительной ткани (ННСТ), которые представляют собой гетерогенную группу заболеваний, обусловленных генетическими дефектами синтеза и/или распада белков внеклеточного матрикса или нарушением морфогенеза соединительной ткани в качестве одного из факторов, способствующих развитию грыж передней брюшной стенки. В первую очередь это касается коллагенов разных типов и матричных металлопротеиназ [8,9,13].

В многочисленных исследованиях установлено значительное снижение соотношения коллагена I и III типа в фасциально-апоневротических образованиях, грыжевом мешке, коже и крови у пациентов с первичными, рецидивными паховыми грыжами и ПОВГ, связанное с относитель-

ным увеличением содержания коллагена III типа, который характеризуется тонким диаметром волокон. Выявленные нарушения могут являться ведущей причиной образования грыж [1,3,6,17,19,21].

По данным экспериментальных исследований установлена зависимость относительного количества коллагена I и III типа от состава и структуры хирургической сетки [20]. Выявлено снижение соотношения коллагена I и III типа у пациентов с рецидивирующей грыжей после ранее проведенной аллопластики с ухудшением качества ткани, сформированной в области трансплантата [18].

Перспективным направлением для решения проблемы устранения негативного влияния хирургической сетки в сочетании с синтезом полноценной соединительной ткани с достаточной прочностью является создание композиционных биологических трансплантатов с включением алло- или аутогенных клеток, культивированных *in vitro*.

В экспериментальных исследованиях оценена возможность покрытия культурами фибробластов разных вариантов полипропиленовых сеток. Доказано, что трансплантация аллогенных эмбриональных фибробластов в зону пластики

---

Адрес для корреспонденции: bogdan-5@mail.ru. Богдан В.Г.



изолированно и при имплантации с сетками приводит к ускорению купирования воспалительной реакции. При этом стимулируются процессы регенерации и осуществляется модифицирующее воздействие на динамику образования коллагена I типа [4,5,7,10,11,14,15].

Учитывая этические проблемы, связанные с использованием эмбриональных тканей, а также опасность их применения из-за высокого риска малигнизации и инфицирования, клетки постнатального происхождения рассматриваются как наиболее адекватный материал для клеточной трансплантации.

В литературе имеются данные единичных исследований, в которых в качестве клеточной составляющей используются мезенхимальные стволовые (стромальные) клетки (МСК) костного мозга, при трансплантации которых у лабораторных животных наблюдалась морфологическая картина стимуляции ангиогенеза и увеличения общего количества коллагена в тканях брюшной стенки [16,23].

Наиболее пригодными для этого, по нашему мнению, являются МСК, выделенные из жировой ткани (ЖТ), к дополнительным преимуществам которых можно отнести малоинвазивный способ получения, большой выход клеток при выделении, высокий пролиферативный потенциал, морфологическое и фенотипическое единство с культурами фибробластов, возможность изменения функциональных характеристик клеток [2,14,24].

Вместе с тем остаются неизученными особенности образования основных типов коллагенов при пассировании культур МСК ЖТ пациентов с ПОВГ. Также не разработаны способы модификации коллагенообразования МСК ЖТ при их культивировании *in vitro*. В доступной нам литературе нет данных о влиянии полипропиленовой хирургической сетки на синтез коллагена *in vivo* и возможности улучшения структуры соединительной ткани в области пластики послеоперационного дефекта брюшной стенки.

Цель исследования — оценить характер коллагенообразования МСК ЖТ у пациентов с ПОВГ *in vitro* и *in vivo*.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Клиническое исследование проведено по согласованию с Комитетом по этике на базе городского Центра герниологии и бариатрической хирургии 4-й Городской клинической больницы им. Н.Е.Савченко (Минск) с оформлением информированного согласия пациента на получение ЖТ и выполнение трансплантации аутологических МСК ЖТ.

Биологический материал получали от пациентов с послеоперационной грыжей ( $N=7$ ) и здоровых доноров ( $N=5$ ) при проведении абдоминопластики инцизионным способом. Фрагмент подкожной жировой клетчатки (до 10 мл) помещали в герметичный контейнер с транспортной средой, который в течение 2 ч доставляли в специализированную лабораторию для выделения и культивирования МСК ЖТ.

Для выделения МСК ЖТ промывали, гомогенизировали и инкубировали с 0.075% раствором коллагеназы I типа в объемном соотношении 1:1 в фосфатном буферном растворе при 37°C. Нейтрализацию фермента проводили равным объемом ФСБ, содержавшего 10% ЭТС (“HyClone”). Полученные клетки отмывали, клеточный осадок ресуспензировали в культуральной среде DMEM с пониженным содержанием глюкозы (“Sigma”) с добавлением 10% ЭТС, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин и высевали в культуральные чашки в концентрации  $5 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup> [24].

Предтрансплантационная подготовка МСК ЖТ состояла из двух этапов. На этапе пролиферации культивирование МСК проводили в среде DMEM-LG, содержавшей 20% обогатщенной тромбоцитами аутоплазмы, 2 мМ L-глутамин, 50 ЕД/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 100 мкг/мл неомицина. По достижении культурами 50% конфлюэнтности проводили дифференцировочный этап. Для этого дозатором удаляли полную питательную среду и добавляли среду для дифференцировки в фибробластном направлении, состоявшую из DMEM-LG, 0.9% аутосыворотки, 10 нг/мл bFGF, 10 нг/мл EGF, 10 нг/мл трансформирующего фактора роста  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), 5 нг/мл TGF- $\beta 3$ , 2 мМ L-глутамин, антибиотика (50 ЕД/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 100 мкг/мл неомицина), и культивировали до достижения культурами 80-90% конфлюэнтности.

Подсчитывали количество МСК ЖТ, дифференцированных в фибробластном направлении, и оценивали их жизнеспособность в культуре, которая составила 98%. Оценку фенотипа клеток выполняли, исследуя экспрессию поверхностных маркеров на проточном цитофлуориметре FC 500 (“Beckman Coulter”). Культуру МСК ЖТ, дифференцированных в фибробластном направлении, считали прошедшей фенотипический контроль при наличии относительного числа клеток, экспрессирующих следующие маркеры: CD90 — 40.2 (8.4±72.2)%, CD105 — 85.5 (77.8±90.0)%, CD31, CD34 и CD45 — менее 1%.

Критериями включения пациентов в клиническое исследование являлись ПОВГ любой



локализации, грыжевое выпячивание диаметром более 15 см, полностью занимающее более одной анатомической области передней брюшной стенки, ширина грыжевых ворот более 10 см, длительность грыжевого анамнеза не менее 1 год.

В основной группе пациентам ( $N=5$ ) выполняли пластику передней брюшной стенки с использованием полипропиленовой хирургической сетки “Эргомэш” (“Ergon Est”) совместно с многокомпонентным биологическим трансплантатом с аутологичными МСК ЖТ, дифференцированными в фибробластном направлении. Для получения многокомпонентного биологического трансплантата с культурой аутологичных МСК ЖТ, дифференцированных в фибробластном направлении, к 10% раствору желатина, нагретому на водяной бане при 37°C до полного растворения, добавляли физиологический раствор в равном объеме. Культуру МСК ЖТ, прошедшую предтрансплантационную подготовку, разводили обогащенной тромбоцитами аутоплазмой в объеме, составлявшем 20% от конечного объема геля, и добавляли к 5% раствору желатина. Полученный гель разводили физиологическим раствором до концентрации желатина 2.5% (по объему). Концентрация клеток в геле составляла не менее  $1.5 \times 10^5$ /мл. Полученный биологический трансплантат в транспортном контейнере доставляли в клинику и в течение 2 ч проводили трансплантацию. Бактериологический контроль стерильности культуры МСК ЖТ осуществляли в специализированной микробиологической лаборатории, аттестованной для проведения исследований медико-биологических препаратов.

В контрольной группе ( $N=7$ ) пластику передней брюшной стенки проводили с применением только полипропиленовой хирургической сетки.

Во всех случаях имплантат располагали под мышечно-апоневротическим слоем брюшной стенки с отграничением его от органов брюшной полости большим сальником и(или) брюшиной.

Оперативные вмешательства завершали сшиванием краев дефекта апоневроза непрерывным швом с дренированием надсеточного пространства и подкожной клетчатки.

Исследуемые группы достоверно не отличались по возрасту и полу, сопутствующей патологии, величине грыжевого выпячивания, размерам грыжевых ворот.

Количественное определение концентрации коллагена I и III типов методом твердофазного ИФА с использованием тест-систем “USCN Life Science Inc.” проводили в 6-дневных супернатантах первичных культур МСК ЖТ доноров ( $N=5$ ), пациентов с послеоперационными грыжами ( $N=7$ ) и прошедших предтрансплантационную подготовку ( $N=7$ ), рассчитывая содержание в пг/мл на  $10^5$  клеток, а также в раневом экссудате ( $N=24$ ), полученном из области пластики дефекта на 3-и и 7-е сутки после операции у пациентов исследуемых групп с оценкой соотношения коллагена III и I типа. Результаты регистрировали на спектрофотометре “BRIO-SIRIO” (“SEAC”), оптическую плотность измеряли при  $\lambda=450$  нм.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы “Statistica 6.0”. Результаты представлены как медиана и 25-75-й процентиля. Для сравнения динамики изменения показателя использовали критерий Вилкоксона для парных сравнений. При сравнении показателей в независимых группах применяли  $U$  тест Манна—Уитни. Различия считали достоверными при  $p < 0.05$  [12].

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Продукция коллагена первичными культурами МСК ЖТ у пациентов с ПОВГ отличалась от культур МСК ЖТ доноров значительно повышенным уровнем коллагена III типа ( $p < 0.05$ ), преобладание которого при сопоставимых ( $p > 0.05$ ) значениях коллагена I типа приводило к увеличению соотношения коллагена III и I типа ( $p < 0.05$ ; табл. 1).

**Таблица 1.** Концентрация (пг/мл) коллагена I и III типа в культурах МСК ЖТ человека

Виды культур МСК ЖТ	Коллаген		Отношение коллагена III/I типа
	I тип	III тип	
ПК доноров ( $N=5$ )	2.1 (1.02-2.60)	0.96 (0.59-2.40)	1.68 (0.44-2.35)
ПК пациентов с ПОВГ ( $N=7$ )	0.78 (0.49-1.66)	35.1* (27.20-45.90)	43.9* (27.65-110.28)
ПК пациентов с ПОВГ после ПТП ( $N=7$ )	54.5+ (1.84-59.70)	174*+ (35.90-551.0)	9.23*+ (3.19-17.94)

**Примечание.** ПК – первичная культура, ПТП – предтрансплантационная подготовка.  $p < 0.05$  по сравнению \*с ПК доноров, +с ПК пациентов с ПОВГ.



Представленные результаты согласуются с выводами предыдущих исследований, согласно которым первичные культуры МСК ЖТ, фибробластов кожи и апоневроза пациентов с ПОВГ имели более высокий уровень экспрессии мРНК коллагена III типа ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контрольной культурой, что подтверждало возможное наличие ННСТ [1,3,6,17,19,21]. Предтрансплантационная подготовка МСК ЖТ пациентов с ПОВГ, заключающаяся в культивировании МСК в присутствии факторов роста (FGFb, EGF, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3 и 0.9% аутосыворотки), приводила к значительному изменению содержания коллагена I и III типа по сравнению с первичными культурами МСК ЖТ доноров и пациентов с ПОВГ. Установлена выраженная положительная динамика накопления коллагена I типа с 0.78 (0.49 $\pm$ 1.66) до 54.5 (1.84 $\pm$ 59.70) пг/мл ( $p < 0.05$ ), по интенсивности превосходящая увеличение концентрации коллагена III типа (35.1 (27.20 $\pm$ 45.90) и 174 (35.90 $\pm$ 551.0) пг/мл;  $p < 0.05$ ), что явилось результатом уменьшения величины отношения коллагена III/I типа в 4.8 раза ( $p < 0.05$ ) относительно уровня первичной культуры при сохранении более высоких значений ( $p < 0.05$ ), чем в культурах доноров.

Для определения характера коллагенообразования при аутоперитрансплантации МСК ЖТ у пациентов с послеоперационными грыжами на 3-и и 7-е сутки после пластики передней брюшной стенки исследовали раневую экссудат (табл. 2). Уровни изучаемых коллагенов в раневом отделяемом у пациентов основной группы и группы сравнения на 3-и сутки после операции достоверно не отличались. Не было установлено достоверных различий и в значениях отношений коллагена III/I типа. На 7-е сутки наблюдения выявлены существенные изменения в концентрации коллагена I и III типов. Применение полипропиленовой сетки сопровождалось достоверным повышением концентрации коллагена III типа по

сравнению со значением на 3-и сутки, что приводило к незначительному ( $p > 0.05$ ) увеличению соотношения коллагена III/I типа. МСК ЖТ в зоне аллопластики обуславливали изменение общей картины коллагенообразования. На фоне более выраженного увеличения количества коллагена I типа (в 1.4 раза по сравнению с 3-ми сутками;  $p < 0.05$ ) отмечено недостоверное уменьшение уровня коллагена III типа, который, однако, был в 1.3 раза ниже, чем в группе сравнения ( $p < 0.05$ ), что предопределило и снижение в 1.5 раза отношения коллагена III/I типа.

Таким образом, можно сделать следующие выводы. Первичные культуры МСК ЖТ пациентов ПОВГ характеризуются патологической способностью продуцировать избыточные концентрации коллагена III типа, превосходящие уровень в культурах клеток здоровых доноров, что приводит к изменению физиологического соотношения коллагена III и I типа с синтезом незрелой и малопрочной соединительной ткани. Полученные данные являются дополнительным обоснованием функционального единства МСК ЖТ с клетками фибропластического дифферона и возможным подтверждением биохимической концепции образования ПОВГ. Разработанный нами двухэтапный способ предтрансплантационной подготовки позволяет *in vitro* активировать процессы коллагенообразования МСК ЖТ с преимущественным усилением синтеза коллагена I типа и снижением отношения коллагена III/I типа.

Использование для аллогерниопластики полипропиленовой хирургической сетки усугубляет имеющиеся нарушения с накоплением избыточной концентрации коллагена III типа и образование неполноценной соединительной ткани. Применение полипропиленового материала в сочетании с аутоперитрансплантацией МСК ЖТ приводит к более благоприятному исходу: снижению в 1.5 раза соотношения коллагена III и I типа за счет повышения в динамике в 1.4 раза содержания

**Таблица 2.** Концентрация (пг/мл) коллагена I и III типа в раневом экссудате при разных вариантах пластики передней брюшной стенки

Группа	Сроки наблюдения, сут	Коллаген		Отношение коллагена III/I типа
		I тип	III тип	
Основная (N=5)	3-и	83.0 (81.0-98.0)	1812.0 (1252.0-1968.0)	21.83 (12.64-24.06)
	7-е	113.0* (112.0-130.0)	1611.0* (1342.0-1974.0)	14.52* (10.22-19.81)
Контрольная (N=7)	3-и	98.0 (70.0-157.0)	1131.0 (1038.0-2358.0)	15.41 (10.44-17.40)
	7-е	118.0 (81.0-160.0)	2251.0* (1975.0-2347.0)	18.27 (14.67-20.46)

**Примечание.**  $p < 0.05$  по сравнению \*с 3-ми сутками, \*с контрольной группой.



коллагена I типа и уменьшения продукции коллагена III типа. Выявленные изменения указывают на положительное влияние МСК ЖТ на метаболизм и структуру синтезируемой *in vivo* соединительной ткани и обосновывают эффективность клинического применения предложенного нами многокомпонентного биологического трансплантата с аутологичными стволовыми клетками для пластики передней брюшной стенки при послеоперационной грыже живота.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Богдан В.Г., Гаин Ю.М. // Новости хир. 2011. Т. 19, № 6. С. 29-35.
2. Богдан В.Г., Зафранская М.М., Багатка С.С. и др. // Здравоохранение. 2012. № 4. С. 19-25.
3. Гостевской А.А. // Вестн. хир. 2007. Т. 166, № 6. С. 93-95.
4. Гостевской А.А., Седов В.М., Хамид А.Х. и др. // Мед. акад. журн. 2007. Т. 7, № 3. С. 135-136.
5. Дубова Е.А. // Вестн. РГМУ. 2006. № 2. С. 363-364.
6. Егиев В.Н. // Герниология. 2006. № 2. С. 5-10.
7. Егиев В.Н., Сологуб В.К., Чижов Д.В. и др. // Герниология. 2006. № 2. С. 37-41.
8. Земцовский Э.В. // Дисплазия соединительной ткани. 2008. № 1. С. 105-109.
9. Земцовский Э.В. // Кардиоваск. тер. и проф. 2009. Т. 8, № 6, Прил. 5.
10. Иванов И.С., Иванов С.В., Горяинова Г.Н. и др. // Новости хир. 2012. Т. 20, № 4. С. 3-8.
11. Иванов С.В., Должиков А.А., Мартынецев А.А. и др. // Человек и его здоровье. 2009. № 4. С. 61-68.
12. Реброва О.Ю. // Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М., 2002.
13. Трусветова Е.Л. // Здравоохранение. 2007. № 4. С. 46-49.
14. Bellows C., Smith A., Hodde J., Hiles M. // Minerva Chir. 2011. Vol. 66, N 2. P. 129-143.
15. Drewa T., Galazka P., Prokurat A. et al. // J. Pediatr. Surg. 2005. Vol. 40, N 2. P. 317-321.
16. Heffner J.J., Holmes J.W., Ferrari J.P. et al. // Hernia. 2012. Vol. 16, N 6. P. 677-687.
17. Henriksen N.A., Yadete D.H., Sorensen L.T. et al. // Br. J. Surg. 2011. Vol. 98, N 2. P. 210-219.
18. Junge K., Klinge U., Rosch R. et al. // Langenbecks Arch. Surg. 2004. Vol. 389, N 1. P. 17-22.
19. Klinge U., Si Z.Y., Zheng H. et al. // Eur. Surg. Res. 2000. Vol. 32, N 1. P. 43-48.
20. Pascual G., Rodriguez M., Gomez-Gil V. et al. // Surgery. 2008. Vol. 144, N 3. P. 427-435.
21. Salameh J.R., Talbott L.M., May W. et al. // Am. Surg. 2007. Vol. 73, N 6. P. 561-568.
22. White B., Osier C., Gletsu N. et al. // Am. Surg. 2007. Vol. 73, N 12. P. 1254-1258.
23. Zhao Y., Zhang Z., Wang J. et al. // Artif. Organs. 2012. Vol. 36, N 3. P. 247-255.
24. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. et al. // Tissue Eng. 2001. Vol. 7, N 2. P. 211-228.

Получено 01.10.12