

УДК 616-002.44-009.85-018.26-089.844

*И. Б. ВАСИЛЕВИЧ¹, Е. В. БАРАНОВ², Е. С. ЛОБАНОВ¹, С. В. ПИНЧУК¹,
С. И. ТРЕТЬЯК², И. Д. ВОЛОТОВСКИЙ¹*

ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ С ПОЛИМЕРНЫМИ НОСИТЕЛЯМИ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТРАНСПЛАНТАТОВ

¹Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, e-mail: ibp@basnet.by,

²Белорусский государственный медицинский университет, Минск

(Поступила в редакцию 27.12.2012)

Введение. Проблема восстановления целостности кожных покровов при обширных раневых дефектах, а также при лечении ожогов, декубитальных и трофических язв различной этиологии в современной хирургии занимает особое место. Применение традиционных подходов с использованием большого арсенала лекарственных средств системного и локального воздействия, физиотерапевтического лечения и других методов, в том числе и применение аутодермопластики для их восстановления не всегда приводит к желаемому клиническому эффекту. Одной из причин замедления регенерации ткани при формировании рубца является снижение репаративного потенциала клеток в ране.

Несмотря на то что история вопроса лечения хронических дефектов кожи насчитывает не одно десятилетие и к настоящему времени предложено большое количество (более 200) различных методик, проблема эффективности и быстроты получения результатов остается до конца не решенной [1].

В совокупности это привело к необходимости поиска восстановления целостности кожных покровов с использованием дополнительных синтетических или биологических материалов [2, 3]. В настоящее время новые методы терапии с применением клеточных, тканевых трансплантатов, а также биоинженерных клеточно-тканевых конструкций оформилось в перспективное направление – реконструктивно-восстановительную хирургию [4].

Во многих странах мира ведутся работы по лечению ран, трофических язв и ожогов с помощью стволовых клеток. Большинство исследований проводится пока на экспериментальных животных [5, 6]. Однако в настоящее время уже получены обнадеживающие результаты при единичных случаях лечения пациентов с трофическими дефектами путем непосредственного нанесения клеточной культуры в виде суспензии на подготовленную поверхность раны.

Разработано много методик выделения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из жировой ткани [5, 6]. Не все из них обеспечивают экспрессное получение необходимой биомассы клеток и создание оптимальных условий для их функционирования при использовании в лечебной практике. Известно, что для более полной реализации функции МСК в ткани они должны сохранять высокую жизнеспособность и делиться с той же скоростью, как и на пластике культурального флакона.

В последнее время на рынке изделий медицинского назначения появилось большое число искусственных материалов, используемых в хирургической практике, различающихся по химической природе основы и входящим в их состав лекарственным веществам [7]. Вместе с тем они имеют определенные недостатки, в частности, слабо фиксируются в тканях, что сопровождается смещением трансплантата и рецидивом заболевания. Остается нерешенным вопрос и о том, какой материал может быть использован в качестве биологически совместимого носителя для МСК.

Цель работы – разработка конструкций из МСК жировой ткани крысы и человека и искусственных носителей для изготовления биологически активных трансплантатов для их использования в экспериментальных условиях, а затем и в клинической практике при лечении хирургических заболеваний у человека.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования являлись МСК жировой ткани 10 белых беспородных лабораторных крыс (возраст 3 мес, масса тела 120–150 г), а также МСК жировой ткани 3 пациентов (возраст 27, 56 и 60 лет). Клетки культивировались на хирургических рассасывающихся синтетических нитях Дар-Вин со средним и длительным периодом рассасывания (СООО «Эргон Эст», Беларусь), на хирургических сетках Випро (Ethicon, Германия), полипропиленовой сетке хирургической (Россия), мембране PVDF (Transfer Membrane, США) и на таких изделиях медицинского назначения, как коллост-гель (ЗАО «Биофармхолдинг», Россия) и коллост-мембрана (ЗАО «Биофармхолдинг», Россия), а также на прозрачной пленочной полиуретановой повязке ТФ.

Характеристика искусственных носителей. Нить Дар-Вин со средним сроком рассасывания представляет собой синтетические поли- или монофиламентные нити из волокон полимера полигликолевой кислоты, состоящего из 90 % гликолида и 10 % L-лактида. Химическая формула материала $(C_2H_2O_2)_m(C_3H_4O_2)_n$. Диаметр нити равен 0,35 мм и 0,2 мм соответственно. Сроки поддержки тканей у них составляют 21–28 дней, за это время в большинстве случаев образуется рубец. Затем необходимость в нитях отпадает и они через 60–90 дней рассасываются, не оставляя в организме никаких следов.

Нить Дар-Вин с длительным сроком рассасывания – это монофиламентная синтетическая нить с диаметром 0,3 мм. Состоит из моноволокна полимера полидиоксанона. Эмпирическая формула полимера $C_4H_6O_3$. Срок поддержки тканей с их использованием около 50–60 дней. Полное рассасывание наблюдается через 180–210 дней.

Сетка Випро – частично рассасывающаяся облегченная мультифиламентная сетка, состоящая из одинаковых частей – нерассасывающихся полипропиленовых волокон (пролен) и рассасывающихся волокон полимера полигликолиевой кислоты (викрил) путем ферментативного гидролиза в течение 56–70 дней. Сетка Випро имеет поры большого размера 4–5 мм, диаметр нити 0,13 мм, толщина сетки 0,39 мм. Химическая формула материала $(C_3H_6)_n$ и $(C_2H_2O_2)_m(C_3H_4O_2)_n$.

Полипропиленовая сетка хирургическая – состоит из чистой полипропиленовой монофиламентной нити, обладает высокой прочностью. Полипропилен – это термопластичный полимер пропилена. Химическая формула – $(C_3H_6)_n$. Сетка имеет размер пор 1,2–2 мм, диаметр нити 0,13 мм, толщина сетки 0,5 мм.

Мембрана PVDF с порами 0,45 мкм – резорбируемая двухслойная мембрана из поливинилиденфторида (ПВДФ). ПВДФ – фторопласт, фторсодержащий полимер винилиденфторид. Химическая формула материала – $(C_2H_2F_2)_n$.

Прозрачная пленочная повязка ТФ – полупроницаемая полиуретановая пленка. Полиуретан представляет собой полимер, образованный в результате полимеризации изоцианатов до аминов и спиртов. Отличительной особенностью полиуретанов от других полимеров является наличие в их основной цепи уретановой группы $[-O-CO-NH-]$. Обеспечивает быструю и легкую фиксацию при лечении ран. Специально разработанное клеевое покрытие надежно фиксирует повязку и исключает отлипание краев.

Гелеобразующие и гидрогелевые покрытия получают из различных синтетических и природных полимеров (производные, декстрана, акриламида, и др.). Гели достаточно быстро (за 3–4 сут) рассасываются.

Коллост-гель – стерильный биопластический материал на основе костного коллагена I типа животного происхождения с полностью сохраненной волокнистой структурой, обеспечивающий регенерацию пораженных тканей.

Коллост-мембрана – это гибкий и плотный материал, контурируется по размеру дефекта. Для приобретения мембраной пластичности перед применением ее необходимо поместить в стерильный 0,9%-ный раствор NaCl не менее чем на 20–30 мин.

Выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани крысы выполняли в стерильных условиях из материала, взятого из внутрибрюшинного пространства. Забор жировой ткани человека проводился под местной анестезией и/или с применением внутривенной анестезии из разреза 1–1,5 см в околопупочной области путем иссечения участка подкожно жировой клетчатки объемом 5–10 мл в условиях операционной с соблюдением всех правил асептики. В обоих случаях липоаспират помещали в физиологический раствор с антибиотиком. Для выделения МСК проводили ферментативную обработку гомогената жировой ткани в растворах коллагеназы и/или диспазы при постоянном перемешивании в течение 30–60 мин при 37 °С. Затем клеточную суспензию нейтрализовали добавлением фосфатного солевого буфера (ФСБ), содержащего 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин, удаляли супернатант, осадок заливали полной ростовой средой (ДМЕМ), содержащей 10 % ЭТС, 2 мМ L-глутамина, 0,01 мл базового раствора комплексного антибиотика-антимикотика и помещали в культуральные флаконы.

Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37 °С во влажной атмосфере при постоянном давлении 5 % CO₂. Через 24 ч производили смену культуральной среды для удаления неприкрепившихся клеток. В дальнейшем смену среды производили через каждые 4-е сутки. По достижении культурами 75%-ной конфлюэнтности клетки снимали с поверхности пластика культурального флакона с помощью 0,1%-ного раствора трипсина/ЭДТА. Для получения первого пассажа клетки засеивали в адгезионные пластиковые чашки Петри (Sarstedt, Германия) в концентрации 1 · 10⁴ клеток на см². Аналогично получали второй пассаж по достижении конфлюэнтности предыдущим пассажем. Для экспериментов использовали МСК второго пассажа.

МСК в количестве 2 · 10⁴ клеток на см² в питательной среде засеивали в такие же культуральные чашки с носителями. Во избежание всплывания нити сетки и мембраны прижимали к дну полипропиленовым кольцом. В данных условиях клетки инкубировали в течение 3 сут.

Наблюдение за ростом клеток и их морфологическими параметрами проводили ежедневно с использованием инвертированного микроскопа Olympus СКХ 41 (Япония). Оценивали форму, размер клеток, наличие и длину отростков. Проллиферативную активность клеток на разных носителях определяли по средним данным накопления в 3 чашках в 1 мл культуральной среды общепринятым методом в камере Горяева в пересчете количества делящихся клеток на 1 см² поверхности. Жизнеспособность МСК определяли прокрашиванием культуры 0,2%-ным раствором трипанового синего, проникающего только в нежизнеспособные клетки.

Для оценки локализации МСК на нитях и сетках клетки окрашивали флуоресцентным красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI), который проникает в клетки и связывается с обогащенными тиминном и аденином участками в малых бороздках двунитевой ДНК. Для прокрашки клеток DAPI чашки Петри (d=2,5 см) промывали 2 раза раствором ФСБ, затем в них добавляли 4%-ный раствор параформальдегида для их фиксации (RD SYSTEMS) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. После этого образцы отмывали раствором PBS и заливали 0,1%-ным раствором сапонина в сбалансированном солевом растворе (RD SYSTEMS), содержащего 1 мкМ DAPI, в котором мембрана становится проницаема для крупных молекул и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. После инкубации клетки промывали 2 раза раствором сапонина и переводили в 2 мл ФСБ. Измерения проводили на флуоресцентном микроскопе Olympus IX 71 (Япония) через 10 мин. Для регистрации флуоресценции использовался куб со следующими оптическими характеристиками: фильтр возбуждения 350/50 нм, фильтр регистрации 350/50 нм, дихроичное зеркало с границей 400 нм. В качестве регистрирующего устройства использовали цифровую камеру DP 72.

Статистическую обработку результатов проводили вычисляя средние арифметические величины, доверительные интервалы и достоверности различий с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Идеальный трансплантат должен отвечать следующим требованиям:

- 1) создавать адекватную микросреду для заживления ран;
- 2) иметь достаточную проницаемость для газов (кислорода, углекислого газа), что обеспечивает протекание репаративных процессов;

- 3) обладать проницаемостью для паров воды, исключая высыхание дна раны;
- 4) иметь эластичность, дающую возможность моделирования поверхностей со сложным рельефом;
- 5) не обладать пирогенным, антигенным и токсическим действием;
- 6) не обладать местным раздражающим и аллергическим действием

Всем этим требованиям удовлетворяли отобранные и исследованные в работе материалы. Оставалась, однако, неизвестной их биосовместимость с МСК и способность клеток функционировать при создании композиций: материал + МСК.

На рис. 1, 1 (контроль) приведена микрофотография, на которой отчетливо виден клеточный монослой, прокрашенных DAPI клеток, растущих на пластике культурального флакона. На рис. 1, 2–5 представлены микрофотографии МСК, выращиваемых на искусственных носителях Дар-Вин и Випро. С данными синтетическими материалами прочного связывания МСК не происходило, рост клеток в культуре по данным микроскопии значительно замедлялся. В поле зрения наблюдались лишь единичные клетки или их небольшие скопления.

В случае когда в качестве носителя для МСК использовали пропиленовую сетку было установлено, что клетки предпочтительно прикреплялись не к самой сетке, а ко дну культурального

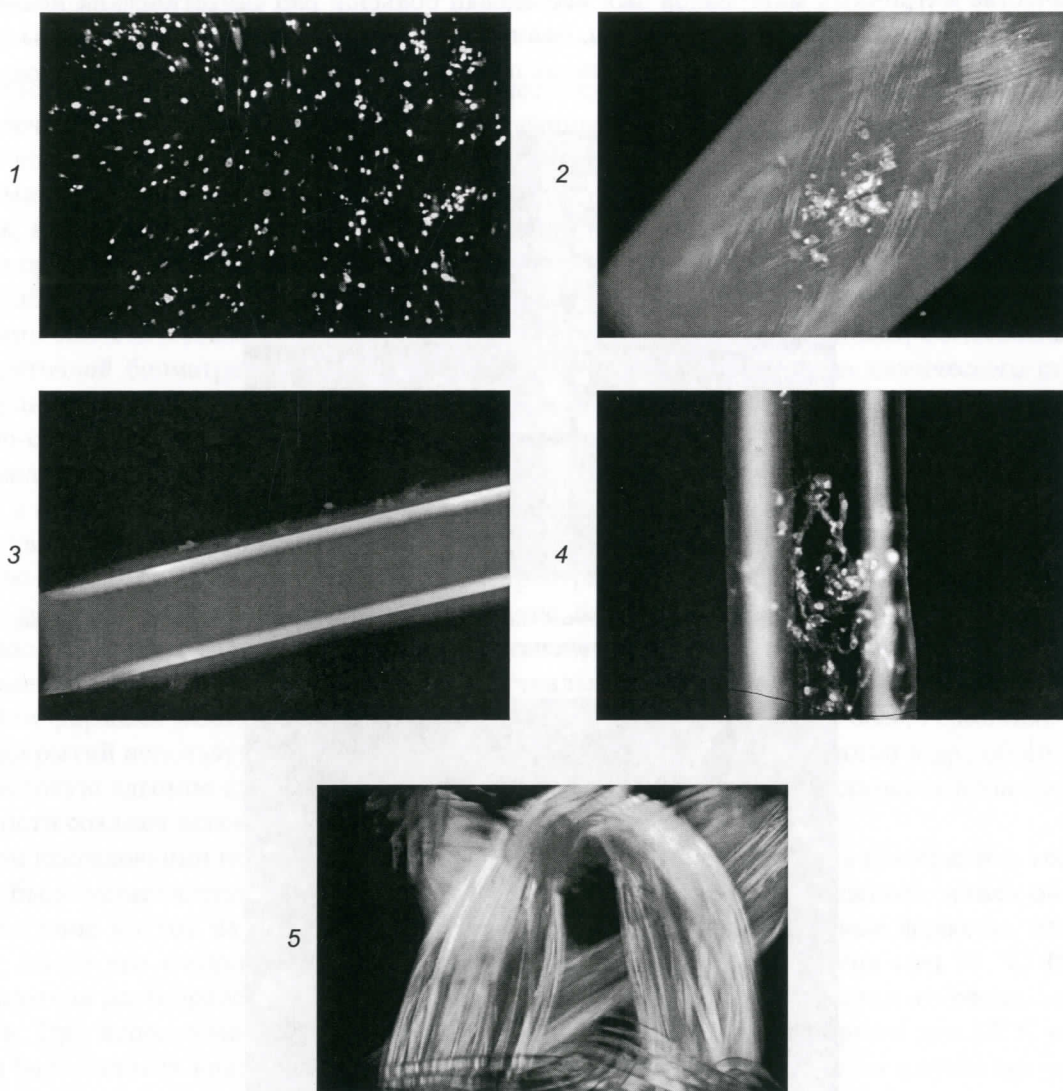


Рис. 1. Влияние изделий медицинского назначения синтетических нитей Дар-Вин и сетки Випро на рост культуры МСК по данным флуоресцентной (окраска DAPI) микроскопии клеток (увеличение: $\times 100$): 1 – контроль, 2 – плетенная нить Дар-Вин со средним сроком рассасывания, 3 – мононить Дар-Вин со средним сроком рассасывания, 4 – мононить Дар-Вин с длительным сроком рассасывания, 5 – сетка Випро

флакона. При этом они сохраняли высокую жизнеспособность (до 97 %), активно пролиферировали и образовывали колонии (рис. 2).

При исследовании в качестве подложки для культуры МСК мембраны PVDF оказалось, что клетки к данному материалу не прикреплялись вообще. МСК находились в суспензии над поверхностью синтетической мембраны или прикреплялись ко дну культурального флакона, где и формировали колонии.

В настоящее время в лечебной практике все чаще применяются пленки из различных природных и синтетических материалов (коллагена, поливинилхлорида, полиуретана, полипропилена, полиэтилентерефталата и др.). Как правило, они обладают достаточной прочностью и эластичностью и удобны в употреблении. Наиболее известные из них пленки на основе полиуретана. Этот вид пленочных покрытий является непроницаемым для бактерий, но пропускает воздух и пары воды, не обладает раздражающим и аллергическим действием, что позволяет использовать их при лечении острых и хронических раневых дефектов. Оказалось, что МСК активно прикрепляются к полиуретановой пленке TF. Было выявлено, что МСК сохраняли высокую жизнеспособность (96 %), формировали на поверхности пленки типичные колонии, а их деление происходило с той же скоростью, как и на пластике культурального флакона (рис. 3).

В качестве матричных материалов был исследован большой ряд синтетических полимеров, таких как полигликолиды, полидиоксаноны, полипропилены и поливинилиденфториды (таблица). Однако в процессе культивирования данных полимеров происходило образование ряда кис-

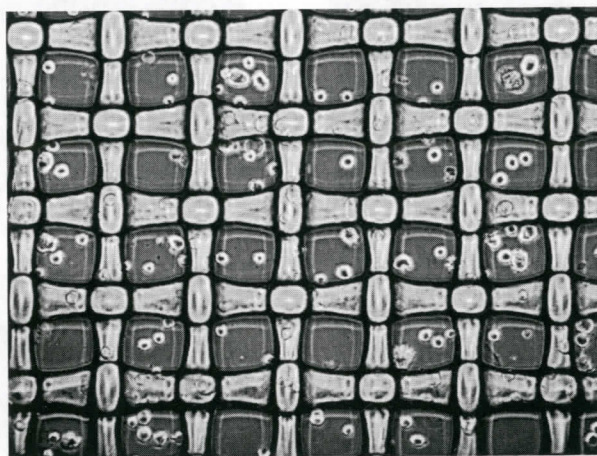


Рис. 2. Единичные клетки в культуральном флаконе с полипропиленовой сеткой (первый день после посева, увеличение: $\times 100$)

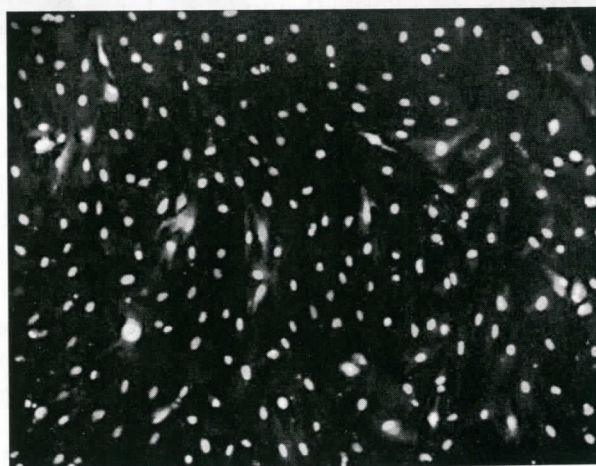


Рис. 3. Рост МСК на прозрачной пленочной полиуретановой повязке TF (слева пластик культурального флакона, справа полиуретановая пленка TF (увеличение: $\times 100$))

Адгезия МСК ЖТ крысы и человека на различных полимерных носителях

Вариант хирургического синтетического материала	МСК ЖТ крысы	МСК ЖТ человека	Вид полимера
Полифиламентная (плетеная) нить Дар-Вин со средним сроком рассасывания	–	–	Полигликолид (C ₂ H ₂ O ₂) _m (C ₃ H ₄ O ₂) _n
Монофиламентная нить Дар-Вин со средним сроком рассасывания	–	–	Полигликолид (C ₂ H ₂ O ₂) _m (C ₃ H ₄ O ₂) _n
Нить Дар-Вин с длительным сроком рассасывания	–	–	Полидиоксанон C ₄ H ₆ O ₃
Сетка Випро	–	–	Полипропилен (C ₃ H ₆) _n ; полигликолид (C ₂ H ₂ O ₂) _m (C ₃ H ₄ O ₂) _n
Полипропиленовая сетка хирургическая	–	–	Полипропилен (C ₃ H ₆) _n
Мембрана PVDF	–	–	Поливинилиденфторид (C ₂ H ₂ F ₂) _n
Прозрачная пленочная повязка TF	+	+	Полиуретан [–O–CO–NH–]

лот, которые снижали pH ростовой среды и клеточную выживаемость. Сравнительные результаты подсчета числа клеток на 1 см² протестированных носителей показали достоверное преобладание количества МСК на прозрачной полиуретановой пленочной повязке TF по сравнению с другими исследуемыми материалами. Так, на 1 см² полиуретановой пленки приходилось 3,5 · 10⁴ клеток, в то время как на других носителях единичные клетки регистрировались лишь на площади порядка 5 см² или их не было вообще.

В таблице приведены данные об избирательном взаимодействии МСК крысы и человека с различными синтетическими материалами. Судя по приведенным выше данным, оптимальной основой клеточной биоматрицы оказался биополимер – полиуретан. Анализ химического строения, пространственной упаковки, рельефа поверхности синтетических носителей с использованием атомно-силовой спектроскопии (данные не приведены) показывает, что решающее значение для эффективного взаимодействия носителей с клетками имеют физико-химические свойства их поверхности, а не плотность упаковки мономеров в полимере, благодаря чему может возникать чисто пространственная комплементарность контактирующих поверхностей носителя и стволовой клетки.

В последние годы получило широкое распространение нанесение на поверхность пластиков, используемых в клеточной биологии и медицине, биоадгезивных материалов, обеспечивающих прочное связывание растущих клеток с носителем, в частности, подобные покрытия нанесены, например, на внутреннюю поверхность культуральных флаконов и чашек Петри предлагаемых разными фирмами («Sarstedt», Германия; «Corning», США, «Greiner bio-one», Германия). В качестве покрытий используются, например, полилизин, фибронектин, ламинин и др., обеспечивающие высокую адгезию клеток. Физико-химические свойства данных полимеров и клеточной поверхности создают основу для обеспечения клеточной адгезии.

При исследовании искусственных носителей на основе коллост-геля (содержание коллагена 15 %) было установлено, что данный материал в определенных разведениях может обеспечивать адгезию клеток на подложке. Клетки высаживали в культуральные флаконы, покрытые гелем, после его полного высыхания. Однако через 5 ч выдерживания при 37 °С 15%-ный коллост-гель растворялся, культуральная среда закислялась, а сами клетки откреплялись и погибали. При использовании же в качестве внеклеточной опорной матрицы для МСК коллост-геля в более низких концентрациях (от 7 до 3 %) время выживания клеток в культуре увеличивалось, однако уже через 18–20 ч до 70 % клеток также погибало (рис. 4). В случае использования 1%-ного раствора геля часть прикрепленных клеток пролиферировала, но со временем их морфология изменялась, формирование колоний резко снижалось и наблюдалось быстрое старение культуры. Только лишь при посеве МСК на 0,1–0,5%-ный коллост-гель клетки имели ве-

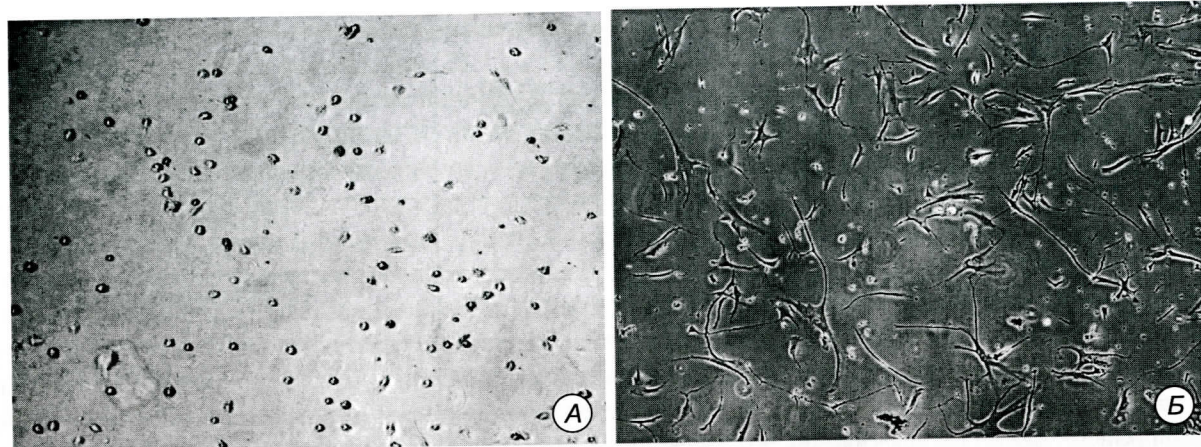


Рис. 4. МСК крысы, культивируемые на поверхности пластика культуральных флаконов, покрытых 7%- (А) и 0,5%-ным (Б) коллост-гелем (увеличение: $\times 100$)

ретенообразную форму с гомогенной цитоплазмой, формировали колонии, их жизнеспособность сохранялась на уровне 90–92 % (рис. 4, Б).

При использовании в качестве основы для МСК коллост-мембраны рост клеток останавливался почти сразу, они практически к ней не прикреплялись и оставались в суспензии. Ростовая среда закислялась, через 18 ч становилась гелеобразной и культура погибала.

Таким образом, использование различных форм биопластического коллагенового материала (коллост-гель, коллост-мембрана) в качестве биотрансплантатов в клеточных технологиях продемонстрировало их достаточно низкую эффективность.

Заключение. Из всех исследованных носителей наиболее предпочтительным в качестве основы для биотрансплантата, содержащего МСК, оказалась полупроницаемая полиуретановая пленка ТФ, на которой стволовые клетки сохраняют высокую жизнеспособность, делятся так же, как и в условиях культурального флакона. Кроме того, в хирургической практике можно использовать в качестве носителя для МСК и коллост-гель, но при его высоких разведениях (содержание 1–0,5 % коллагена)

Литература

1. Третьяк С. И., Маркевич Е. В., Буравский А. В. Хирургический шовный материал. Методические рекомендации. Мн, 2012.
2. Гогия Б. Ш., Адамян А. А., Аляутдинов Р. Р. // Материалы конференции «Актуальные вопросы герниологии». М., 2002. С. 13.
3. Казнин Д. В. // Нижегородские ведомости медицины. 2006. № 1. С. 7–8.
4. Mason C., Manzotti E. // Regenerative Medicine 2010. Vol. 5, № 3. P. 307–313.
5. Zuk P. A., Benhaim P., Hedrick M. H. // Yandbook of stem cells. 2006. № 2. P. 425–447.
6. Киселева В. Е., Васильев А. В. // Биология стволовых клеток и клеточные технологии. 2009. № 2. С. 124–162.
7. Шаповалов С. Г. // ФАРМиндекс-Практик. 2005. Вып. 8. С. 38–46.

I. B. VASILEVICH, E. V. BARANOV, E. S. LOBANOK, S. V. PINCHUK, S. I. TRETYAK, I. D. VOLOTOVSKI

INVESTIGATIONS OF THE INTERACTION OF MESENCHYMAL STEM CELLS FROM ADIPOSE TISSUE WITH POLYMERIC CARRIERS FOR THE PURPOSE OF PRODUCING BIOLOGICAL TRANSPLANTES

Summary

More often mesenchymal stem cells are being used in regenerative medicine to treat diverse diseases. When they are introduced directly into tissues or organs the artificial polymer carriers are used as the basis for transplants (carrier + stem cells) to provide the high concentration of cell materials in situ. The key condition to create a transplant is ability of polymer carriers for adhesion of stem cells. In present work the ability of various commercial polymer materials used in surgery practice to adhere stem cells isolated from fat tissue of rat and human was studied. The largest ability was found for polymer polyurethane film on the surface of which the stem cell were growing analogically as in commercial cultural flasks. The possible mechanisms of adhesion were discussed.