

## ВЫБОР ВНЕКЛЕТОЧНОЙ МАТРИЦЫ МНОГОКОМПОНЕНТНОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО ТРАНСПЛАНТАТА С МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ДЛЯ ПЛАСТИКИ ОБШИРНЫХ ДЕФЕКТОВ ПЕРЕДНЕЙ БРЮШНОЙ СТЕНКИ

Военно-медицинский факультет в УО «БГМУ»<sup>1</sup>,  
ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»<sup>2</sup>

---

*Проведен анализ возможности использования в качестве внеклеточного матрикса для трансплантации мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани при пластике обширных дефектов брюшной стенки материалов различного происхождения. Выявлены закономерности, не позволяющие использовать гидрогелевую пластину с мирамистином и 0,3%, 0,6% и 1,5% коллагеновый гель, приготовленный на основе биопластического коллагенового материала «Коллост» в качестве экстрацеллюлярной матрицы. Разработана технология получения и определен оптимальный состав многокомпонентной внеклеточной матрицы на основе желатина с 20% обогащенной тромбоцитами аутоплазмой, который позволяет сохранять высокий уровень жизнеспособности и равномерное распределение клеток по всему объему, что обеспечивает эффективную доставку по всей зоне трансплантации, дает возможность клеточным структурам активно интегрироваться в окружающие ткани.*

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки из жировой ткани, внеклеточная матрица.

V.G. Bogdan, M.M. Zafranskaya, Yu.M. Gain

## CHOICE OF THE EXTRACELLULAR MATRIX OF THE MULTICOMPONENT BIOLOGICAL TRANSPLANT WITH MESENCHYMAL STEM CELLS FROM THE ADIPOSE TISSUE FOR PLASTIC OF EXTENSIVE DEFECTS OF THE FORWARD BELLY WALL

*The analysis of possibility of use as extracellular matrix for transplantation of mesenchymal stem cells from adipose tissue is carried out at plasticity of extensive defects of a belly wall materials of a various origin. The regularities, not allowing to use a gidrogel plate from miramistin and 0,3 %, 0,6 % and 1,5 % the collagenic gel prepared on the basis of the bioplastic collagenic material «Kollost» as an extracellular matrix are revealed. The technology of receiving is developed and the optimum structure of a multicomponent extracellular matrix on the basis of gelatin from 20 % platelet-rich auto-plasma which allows to keep high level of viability and uniform distribution of cages on all volume that provides their effective delivery on all zone of transplantation, gives the chance to cellular structures to be integrated into surrounding fabrics actively.*

**Key words:** adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, extracellular matrix.

Одним из приоритетных направлений современных клеточных технологий является разработка биологического материала, сходного с экстрацеллюлярным матриксом, что позволяло бы использовать его в клинической практике в качестве объемного носителя для клеточной трансплантации [1-7].

Для эффективного восстановления утраченных тканей и формирования функционально полноценных структур внеклеточная матрица в биологическом трансплантате, применяемом для пластики обширных дефектов передней брюшной стенки, должна обладать определенными характеристиками:

1. иметь гелеобразную структуру с возможностью свободной инкорпорации клеток по всему объему материала, создающую протекцию и фиксацию трансплантируемых клеток при коррекции глубоких (не поверхностных) повреждений соединительной ткани;

2. повышать адгезию клеток к используемым синтетическим опорным структурам (хирургическим сеткам) используемым в клинической практике для пластики послеоперационных дефектов;

3. сохранять высокую жизнеспособность клеточного материала;

4. создавать условия для возможности в полной мере реализовать трансплантированным клеткам имеющийся у них пролиферативный и стимуляционный потенциал;

5. быть ареактогенным, стабильным по форме и составу в процессе транспортировки и трансплантации;

6. подвергаться резорбции в организме с образованием не токсичных продуктов [5-7].

В настоящее время наибольшее распространение в качестве биосовместимых матриц получили материалы на основе природных полисахаридов, белковых соединений (желатиновые, коллагеновые и другие гели), образующие трёхмерную 3D структуру и обеспечивающие тканевую целостность [1, 4-11].

Впервые коллагеновый гель как биоматрикс для клеточных культур использовался Bell с соавт., которые оценивали инкорпорацию клеток в гелеобразную структуру [12]. Wang Y. с соавт. показали отсутствие изменений в цитоморфологических и функциональных характеристиках гепатоцитов при их культивировании в коллагеновом геле и коллагеновом «сэндвиче» [13]. Уопено К. доказал, что культивирование МСК в коллагеновом геле значительно улучшает их дифференцировочный потенциал в направлении хондроцитов и остеоцитов, при этом, согласно данным Butter D. с соавт. и George J. с соавт., введение в область дефекта сухожилий МСК в коллагеновом геле способствует активации биомеханических процессов репарации дефектов на 18-33% лучше, чем введение МСК без коллагенового матрикса [14-16].

Кроме того, коллаген, как и желатин, фибронектин и ламинин, повышают адгезивные свойства синтетических материалов [1,2,5,7,10,17].

По литературным данным в качестве основы для приготовления коллагенового геля используют коллаген I типа, который выделяют из хвостов лабораторных крыс путем механической и ферментативной обработки [1,13-14]. Недостатком, ограничивающим клиническое применение данного метода приготовления геля, является ксеногенное происхождение коллагена.

Единичные исследования указывают на возможность использования биodeградирующего полимерного гидрогеля, обладающего высокой абсорбционной способностью, для иммобилизации клеточных культур [18].

Вместе с тем, в доступных нам источниках отсутствует информация о сравнительной оценке основных свойств основных материалов пригодных для применения в качестве внеклеточной матрицы в биологическом трансплантате с мезенхимальными стволовыми клетки (МСК) жировой ткани (ЖТ) человека, применяемом для пластики обширных дефектов передней брюшной стенки отсутствуют.

**Цель исследования:** провести анализ возможности использования внеклеточного матрикса различного происхождения (гидрогелевой полимерной пластины, трехмерного коллагенового и желатинового геля) с выбором оптимального варианта для трансплантации мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани при пластике обширных дефектов передней брюшной стенки.

### Материал и методы

МСК ЖТ различных пассажей 5-ти пациентов с послеоперационными вентральными грыжами больших размеров. Процедура забора биологического материала была одобрена этическим комитетом УЗ «4-я городская клиническая больница им. Н.Е. Савченко». Все пациенты подписали информированное согласие на предоставление биологического материала, а также использование полученной в результате исследований информации для научных отчетов, статей, докладов, диссертационных работ.

МСК ЖТ белых беспородных лабораторных крыс-самцов (n=5, возраст 6 месяцев, масса тела 206,3±11,4 г.), культивированные на различных материалах: коллагеновый и желатиновый гели различной концентрации, гидрогелевая пластина с мирамистином. Экспериментальные исследования проводились в условиях вивария ЦНИЛ БелМАПО с соблюдением руководства «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Гидрогелевая пластина с мирамистином (РУП «БелМед-Препараты», Беларусь) – готовый коммерческий продукт, представляет собой полупрозрачную, бесцветную пластину, размером 6x9 см, относящуюся к средствам местной терапии ран и ожогов, использующимся как противомикробное и ранозаживляющее средство.

#### **Выделение и культивирование МСК ЖТ человека**

**Для выделения МСК ЖТ, гомогенизованную ЖТ** (n=5) промывали стерильным раствором Хенкса и инкубировали в течение 45 минут с 0,075% раствором коллагеназы I типа (Sigma) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) при 37°C. Нейтрализацию фермента проводили равным объемом ФСБ, содержащего 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (НИИ ЭИМ, РБ). Полученные в результате обработки коллагеназой клетки отмывали 2 раза центрифугированием, клеточный осадок ресуспендировали в культуральной среде DMEM с пониженным содержанием глюкозы 1000 мг/мл («Sigma», США) с добавлением 10% ЭТС, 100 U/мл пеницилина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамина и высевали в концентрации  $5 \times 10^4$  клеток на  $1 \text{ см}^2$  в культуральные чашки диаметром 60 мм [18]. Через 24 часа производили смену культуральной среды для удаления неприкрепившихся клеток. По достижении культурами  $\approx 75\%$  конфлюэнтности клетки снимали с поверхности культурального пластика с помощью 0,25% р-ра трипсина/ЭДТА, затем трипсин ингибировали добавлением ФСБ, содержащего 10% ЭТС; после двукратного отмывания центрифугированием клетки засевали в культуральные чашки в концентрации  $1 \times 10^4$  клеток на  $\text{см}^2$  для получения первого пассажа.

#### **Выделение и культивирование МСК ЖТ крыс**

С целью получения первичных культур МСК в стерильных условиях был проведен забор ЖТ крыс из внутрибрюшинного пространства. После промывания материала стерильным физиологическим раствором, содержащим 1% антибиотика (Gibco, Великобритания), ЖТ гомогенизировали и инкубировали с 0,075% раствором коллагеназы I типа (Sigma, Германия) в течение 45 минут при 37°C. Активность фермента ингибировали равным объемом ФСБ, содержащего 10% ЭТС (Nucleo, Новая Зеландия). Полученную в результате ферментативной обработки суспензию клеток дважды отмывали центрифугированием. Клеточный осадок ресуспендировали в среде DMEM с пониженным содержанием глюкозы 1000 мг/мл (Sigma, США), содержащей 10% ЭТС, 1% антибиотика (Gibco, Великобритания) и 1% глутамина (Gibco, Великобритания) и засевали в культуральные чашки диаметром 60 мм в концентрации  $3-4 \times 10^5$  клеток на  $\text{см}^2$ . Конфлюэнтные первичные культуры снимали с поверхности культурального пластика путем ферментативной обработки 0,25% раствора трипсина-ЭДТА в течение 5 минут. Полученную суспензию клеток первичной культуры дважды центрифугировали в ФСБ перед дальнейшим использованием для трансплантации.

#### **Микроскопия и мониторинг клеточных культур**

Культуры исследовали на универсальном инвертированных микроскопах Micros (Австрия) и Carl Zeiss Axiovert 200 (Германия) с применением методов светлого поля, бокового освещения, фазового и Vagel-контрастов, эпифлуоресценции (окраска акридиновым оранжевым и Хекстом 33342/пропидий йодидом).

#### **Оценка жизнеспособности клеток**

- Для оценки жизнеспособности клеток применялись методы витальной окраски с использованием различных красителей: трипанового синего, флуоресцентных красителей (акридинового оранжевого и Хекста 33342/пропидий йодид). При окрашивании трипановым синим 20

мкл суспензии исследуемых клеток смешивали с 20 мкл 0,2% раствора трипанового синего («Serva», Германия), приготовленного на забуференном физиологическом растворе (рН 7,4) с добавлением 0,02% (от объема) азида натрия, и подсчитывали общее число и число живых клеток в камере Горяева.

- Для оценки жизнеспособности МСК в коллагеновом и желатиновом геле клетки предварительно инкубировали в течение 5-10 мин с 0,05% коллагеназой и окрашивали трипановым синим и люминесцентными красителями: Хекст-33342 (Но33342) и йодистый пропидий (PI) (Sigma, Германия). Рабочая концентрация каждого красителя составляла  $10^{-5}$  M.

#### **Трансплантация МСК ЖТ с трехмерным желатиновым гелем крысам с послеоперационными дефектами**

Всем животным выполняли моделирование послеоперационной вентральной грыжи по разработанному нами способу (патент Республики Беларусь на изобретение №15827; Богдан В.Г., Толстов Д.А.).

Сформированы две группы по 20 лабораторных животных в каждой:

- группа №1 пластика дефекта передней брюшной стенки многокомпонентным биологическим трансплантатом – 1 (полипропиленовая хирургическая сетка с трехмерным желатиновым гелем с мезенхимальными стволовыми клетками жировой ткани в концентрации  $1,5 \times 10^5/300$ мкл) (расположение трансплантата: между апоневрозом и париетальной брюшиной);

- группа №2 пластика дефекта передней брюшной стенки многокомпонентным биологическим трансплантатом – 2 (трехмерный желатиновый гель с мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) жировой ткани в концентрации  $1,5 \times 10^5/300$ мкл) (расположение трансплантата: между апоневрозом и париетальной брюшиной).

У животных в процессе моделирования послеоперационной грыжи выполняли забор жировой ткани (фрагмент большого сальника) с последующим выделением и культивированием МСК ЖТ. Морфологическое исследование тканей передней брюшной стенки проводилось на материале, полученном при выведении из эксперимента лабораторных животных на 3, 7, 14, 21 сутки после выполнения пластики с использованием различных вариантов трансплантатов.

#### **Окрашивание МСК ЖТ крыс флуорохромом РКН-26**

Окрашивание витальным липофильным красителем РКН26 (Sigma, США) проводили согласно протоколу фирмы-изготовителя. Суспензию клеток первичной культуры в бессывороточной среде центрифугировали 5 минут при 400хg. Клеточный осадок, содержащий  $2 \times 10^7$  клеток, разводили в 1мл Diluent C (Sigma, США). Непосредственно перед окрашиванием готовили  $1 \text{ мл } 4 \times 10^{-6} \text{ M}$  РКН-26 в Diluent C, и добавляли к 1 мл клеточной суспензии. Клетки инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Реакцию окрашивания останавливали добавлением равного объема сыворотки и инкубированием в течение 1 минуты. Затем клетки разводили полной средой и центрифугировали 10 минут при 400хg при комнатной температуре. Удалили супернатант, клетки переносили в новую пробирку и трижды повторяли процедуру промывания в ФСБ. Интенсивность окрашивания предварительно оценивали с помощью флуоресцентного Carl Zeiss Axiovert 200 (Германия). Готовая клеточная суспензия с необходимой концентрацией клеток использовалась для трансплантации в составе многокомпонентного трансплантата на основе 2,5% желатинового геля.

#### **Выявление флуоресцентно меченых МСК**

##### **у крыс после трансплантации**

Детекцию РКН-26-меченных МСК, трансплантированных крысам с послеоперационными дефектами, проводили с

помощью флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss Axiovert 200 (Германия) на гистологических препаратах толщиной 7 мкм (криофиксация), изготовленных на криостатном микротоме Leica CM 1850 (Leica, Германия).

#### Приготовление коллагенового геля

Для приготовления коллагенового геля использовали биопластический коллагеновый материал – «Коллост» («БиоФармаходитнг», Россия). Используемые концентрации коллагена составляли 0,3% (3мкг/мл), 0,6% (6мкг/мл), 1,5% (15мкг/мл). Растворение коллагена проводили в 0,9% изотоническом растворе и в 0,5М уксусной кислоте. Впоследствии при использовании уксусной кислоты pH доводился 0,1N NaOH до 7,4.  $1 \times 10^5$  МСК жировой ткани 2-го пассажа в физиологическом растворе смешивали с коллагеновым гелем при соотношении объемов геля:клеточная суспензия – 4:1 и высевали в лунку 24-луночного планшета. Высота гелевого матрикса составляла 0,3-0,5 см.

#### Приготовление желатинового геля

К 10% раствору желатина нагретому на водяной бане при 37 °С до полного растворения добавляли физиологический раствор в равном объеме. Осадок снятых с поверхности культурального пластика МСК ЖТ разводили обогащенной тромбоцитами аутоплазмой в объеме, составляющем 20% от конечного объема геля и добавляют к 5% раствору желатина (при использовании МСК ЖТ крыс аутоплазму не применяли). 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. Гель с клетками переносили в лунки 24-луночного планшета.

#### Статистическая обработка полученных результатов

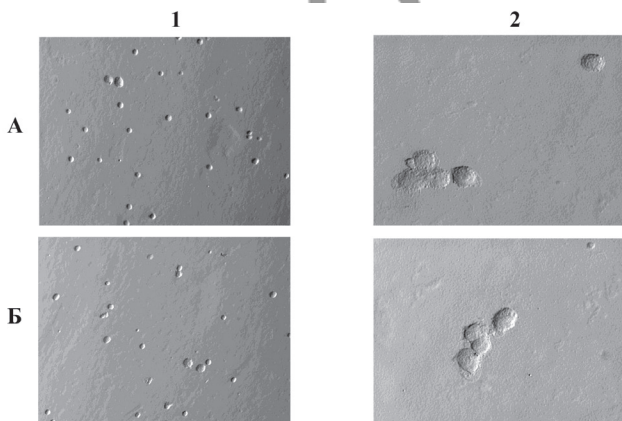
Статистическая обработка данных осуществлена с применением прикладного программного пакета «STATISTICA 6,0». Результаты представлены в формате Me (25-й÷75-й процентиля). Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

#### Результаты исследования

В процессе культивирования МСК ЖТ человека на гидрогелевой пластине с мирамистином исследовалась возможность фиксирования клеток на поверхности и в объеме гидроматрикса.

Для этого пластина была перенесена в чашку Петри диаметром 35мм и покрыта минимальным объемом полной питательной среды DMEM, содержащей МСК ЖТ 2-го пассажа человека в концентрации  $1,5 \times 10^5$ /см<sup>2</sup> гидрогеля (жизнеспособность клеточных культур составляла 94,3% (92,1%÷97,4%)) (рисунок 1А).

При культивировании клеток в присутствии гидрогеля в



Примечание: 1- 1 – увеличение 100; 2- 2 – увеличение 400.

Рисунок 1. Распределение МСК ЖТ 2-го пассажа на поверхности гидрогелевого матрикса через 2 часа (А) и 24 часа (Б).

течение нескольких часов наблюдалось незначительное импрегнирование матрикса питательной средой и неравномерное осаждение клеток на его поверхности в зависимости от особенностей рельефа.

При внесении дополнительного объема питательной среды для более длительного культивирования клеток изменялась их локализация, что свидетельствовало об отсутствии достаточной адгезии клеток к поверхности гидрогеля. Культивирование в течение 24 часов не влияло как на морфологию, так и на адгезивные свойства клеток (рисунок 1Б).

Таким образом, гидрогелевая пластина с мирамистином может использоваться в качестве матрицы для трансплантации клеток только при дополнительном покрытии субстратами, улучшающими клеточную адгезию (коллаген I типа, фибронектин и другие).

Культивирование МСК ЖТ человека в коллагеновых гелях различных концентрациях приготовленных нами на основе биопластического коллагенового материала «Коллост» (БиоФармаходитнг, Россия), представляющий собой коллаген I типа, полученный из кожи крупного рогатого скота, близкий по биохимическому составу и структуре к человеческому коллагену.

Использование различных полимеризационных характеристик коллагена, включающих концентрацию (0,3-30 мг/мл), значение pH (6,0-9,0), температуру, позволяет создать матричную основу из коллагеновых фибрилл с различной микроструктурой, что и определяет физические параметры геля.

Для получения гелеобразной субстанции с достаточной вязкостью нами были использованы различные концентрации коллагена: 0,3% (3мкг/мл), 0,6% (6мкг/мл), 1,5% (15мкг/мл) и 3% (30мкг/мл). Учитывая то, что коллагена I типа лучше растворяется при переходе из уксуснокислого раствора в нейтральный буферный раствор (pH 7,4) и термостатировании образцов в течении 1-2 часов, нами проводилось сравнение растворимости различных объемов коллагена в 0,9% растворе NaCl и в 0,5М уксусной кислоте при температуре 37-40°C. Растворимость коллагена в пределах концентрации 3-15мкг/мл не отличалась как в физиологическом растворе, так и в уксуснокислом растворе, что потребовало для приготовления геля с более высоким содержанием коллагена еще большее закисление среды с последующей ее нейтрализацией и доведением pH до 7,4.

Изучены физические свойства геля, приготовленного на основе биопластического коллагенового материала «Коллост», при различных концентрациях коллагена и температурных условиях.

Так, гель, содержащий 0,6% и 1,5% коллагена, обладает достаточной вязкостью при комнатной температуре, при 37°C переходит в жидкое состояние, а при понижении температуры до 5-10°C происходит застывание геля. При нанесении 1,5% коллагенового геля в условия низкой температуры на поверхность пластика наблюдается формирование достаточно плотного монослоя высотой 0,3-0,5 см, который можно отделить от поверхности, не повредив его. Использование 0,6% коллагенового геля при понижении температуры позволяет получить менее плотный монослой, более легко подверженный изменению при механическом воздействии. Вязкая консистенция геля не достигается при использовании низкой концентраций коллагена менее 3 мкг/мл.

Для определения жизнеспособности клеток в 0,3%, 0,6% и 1,5% коллагеновом геле, обработанные 0,05% коллагеназой, МСК ЖТ окрашивали трипановым синим и люминесцентными красителями Хекст-33342 и пропидий йодидом.

Согласно полученным данным, в течение первого часа инкубации при температуре 5°C жизнеспособность клеток в 0,3% коллагеновом геле снижается на 5,2%, при более длительной инкубации (3ч.) – на 20% с 97,4% (96,7%÷99,1%) до

92,2% (88,1%+94,3%) и 77,4% (74,1%+78,7%) соответственно ( $p < 0,05$ ). Оценка жизнеспособности МСК в геле при 37°C не изменило характер достоверных отличий и через 3 часа инкубации количество жизнеспособных клеток снизилось до 68,6% (66,4%+74,9%) ( $p < 0,05$ ). С увеличением концентрации коллагена до 0,6% и 1,5% наблюдается ещё более выраженное угнетение жизнеспособности клеток по сравнению с данными, полученными при 0,3% коллагеновом геле. Так, через 1 час инкубации МСК в 0,6% и 1,5% коллагеновом гелем в условиях пониженной температуры наблюдается снижение выживаемости клеток на 17,1% (до 80,3% (77,4%+82,2%)) и на 20,5% (76,9% (75,8%+79%)) соответственно ( $p < 0,05$ ). Через 3 часа доля погибших клеток возросла до 30,3% и 32,7%, при этом уровень жизнеспособности снизился до 67,1% (61,5%+69,6%) и 64,7% (60,3%+67,7%) соответственно ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, жизнеспособность МСК ЖТ, импрегнированных в 0,3%, 0,6% и 1,5% гель, приготовленном на основе биопластического коллагенового материала «Коллост», даже при непродолжительном культивировании существенно снижается, что не позволяет использовать его в качестве внеклеточного (экстрацеллюлярного) матрикса многокомпонентного биологического трансплантата.

При культивировании МСК ЖТ человека 2-го пассажа на протяжении 1 суток (24 часа) в трехмерном комбинированном геле на основе желатина с 20% обогащенной тромбоцитами аутоплазмой наблюдалось распределение клеток по всему объему матрикса с достоверным ( $p > 0,05$ ) сохранением высокого уровня жизнеспособности (95,8% (93,1%+97,5%)), которая до внесения клеток в гель составляла 97,4% (96,7%+99,1%) (рис. 2).

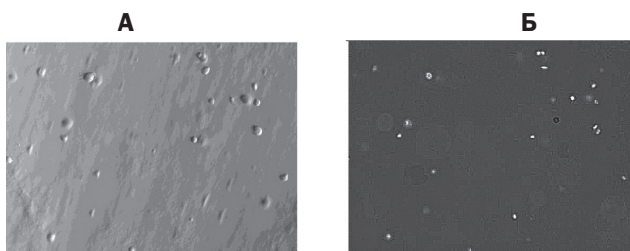
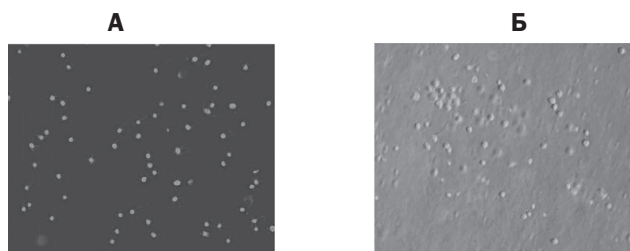


Рисунок 2. Распределение (А) и жизнеспособность (Б) МСК ЖТ в трехмерном желатиновом геле на первые сутки совместного культивирования, ув. 100.

С целью дальнейшей оценки состояния МСК ЖТ в трехмерном желатиновом геле при трансплантации, проведен забор ЖТ из внутрибрюшинного пространства 5-ти лабораторных (беспородных) крыс. Первичные культуры МСК жировой ткани характеризовались морфологической гетерогенностью. Большинство прикрепленных к поверхности адгезивного пластика клеток имело веретеновидную фибробласто-подобную, а по мере роста культуры – полигональную морфологию (характерную для МСК) с визуальным выраженным ядром и перинуклеарной зернистостью. Среди них наблюдалась примесь клеток с более компактной цитоплазмой в перинуклеарной зоне и сильно распластанной по периферии клетки, что характерно для клетки эпителиального происхождения.

На заключительных этапах культивирования проводилась оценка жизнеспособности культур с помощью методов витальной окраски клеток флуоресцентными красителями: Хекстом 33342 и йодистым пропидием. Первичные культуры МСК в желатиновом гелевом матриксе были использованы для трансплантации крысам, после моделирования у них послеоперационных грыж, в сочетании и без полипропиленового сеточного трансплантата.



Примечание: 1- А – суспензия окрашенных клеток, ув.100; 2- Б – окрашенные РКН-26 клетки в желатиновом гелевом носителе, ув.100.

Рисунок 3. МСК ЖТ крыс, окрашенные липофильным цитоплазматическим красителем РКН-26

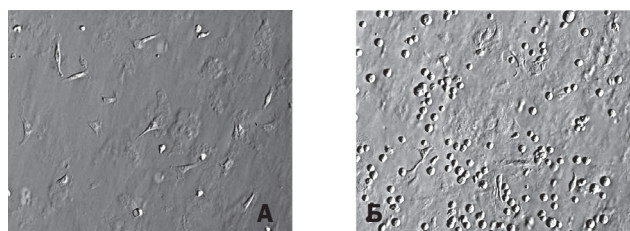
Для оценки локализации МСК после трансплантации крысам с послеоперационными дефектами, часть стволовых клеток жировой ткани первичных культур были окрашены флуорохромом РКН-26 до совмещения с носителем. Длинные алифатические хвосты в структуре красителя обуславливают его липофильность и окрашивание цитоплазматической мембраны меченых клеток (рисунок 3).

Окрашивание трипановым синим флуоресцентно меченых и интактных МСК ЖТ крысы после культивирования в трехмерном желатиновом геле на протяжении 3-х часов при комнатной температуре выявило снижение жизнеспособности клеток на 12,2% и 5,4% с 95,3% (92,4%+97,5%) до 83,2% (81,6%+87,2%) ( $p < 0,05$ ) и 89,9% (88,3%+93,5%) ( $p > 0,05$ ) соответственно. Более значительное снижение жизнеспособности клеток, меченных РКН, может являться результатом выполнением серии дополнительных процедур в ходе окраски клеток, согласно протоколу инструкции фирмы-производителя.

При разведении геля с МСК полной питательной средой DMEM и культивировании в течение 4-х часов на адгезивном пластике большая часть клеток прикрепились к поверхности, что свидетельствует о сохранении клетками характерных для них адгезивных свойств (рисунок 4).

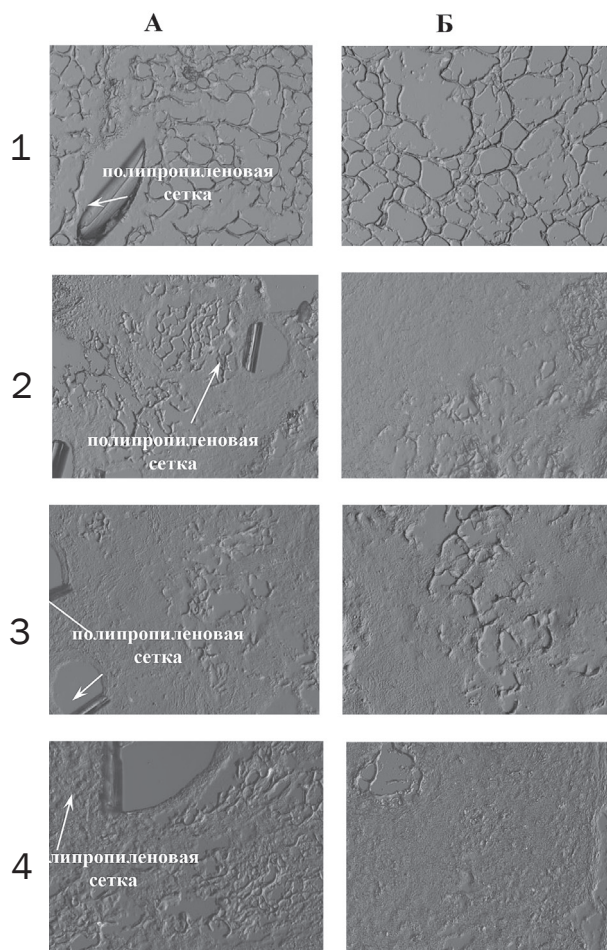
В экспериментальных группах животных №1 (трансплантатом – 1 – полипропиленовая хирургическая сетка с трехмерным желатиновым гелем с МСК ЖТ) и №2 (трансплантатом – 2 – трехмерный желатиновый гель с МСК ЖТ) при проведении пластики дефекта передней брюшной стенки многокомпонентным биологическим трансплантатом были использованы первичные культуры МСК ЖТ, окрашенные РКН-26, до совмещения с носителем. Распределение меченых флуорохромом МСК в тканях передней брюшной стенки крыс оценивали в криосрезах области имплантации клеток, приготовленных с помощью замораживающего микротомы Leica CM 1850 (Германия) на 3, 7, 14 сутки после пластики дефекта с использованием окрашенных стволовых клеток.

При флуоресцентной микроскопии препаратов на всех сроках выведения визуализировали интенсивное свечение цитоплазмы клеток в красном диапазоне спектра (590 nm) (рис. 5).



Примечание: 1- А – разведение клеток 1:20; 2- Б – разведение клеток 1:10.

Рисунок 4. Окрашенные РКН-26 (А) и неокрашенные МСК ЖТ(Б) крыс, культивированные в полной питательной среде в течение 4-х часов, ув.100



Примечание: 1 – 3-е сутки после трансплантации; 2 – 7-е сутки после трансплантации; 3 – 14-е сутки после трансплантации; 4 – 21-е сутки после трансплантации.

Рисунок 5. Распределение меченых флуорохромом РКН-26 МСК (красное свечение) в тканях передней брюшной стенки крыс в месте имплантации совместно с сетчатым полипропиленовым трансплантатом (А) и без него (Б), ув.100

В ходе исследования было установлено, что меченые флуорохромом РКН-26 МСК ЖТ равномерно располагаются в желатиновом геле по всей зоне имплантации, находясь до 3 суток между апоневрозом и париетальной брюшиной, а затем на 7-21 сутки формируют менее интенсивно флуоресцирующий слой и активно интегрируются в окружающие тканевые структуры.

#### Выводы

1. Доказано, что гидрогелевая пластина с мирамистином характеризуется отсутствием достаточной адгезии для МСК ЖТ человека, что значительно затрудняет как фиксацию клеток к поверхности, так и их импрегнацию в гидрогель.

2. Установлено снижение жизнеспособности ( $p < 0,05$ ) МСК ЖТ человека при культивировании в течение 3 часов в 0,3%, 0,6% и 1,5% коллагеновом геле, приготовленном на основе биопластического коллагенового материала «Коллол» с 97,4% (96,7%±99,1%) до 77,4% (74,1%±78,7%), 67,1% (61,5%±69,6%) и 64,7% (60,3%±67,7%) соответственно.

3. Выявленные закономерности не позволяют использовать гидрогелевую пластину с мирамистином и коллагеновый гель в качестве экстрацеллюлярной матрицы многокомпонентного биологического трансплантата.

4. Разработана технология получения и определен оптимальный состав многокомпонентной внеклеточной матрицы на основе желатина с 20% обогащенной тромбоцитами ауто-

плазмой, который позволяет сохранять высокий уровень жизнеспособности (до 95,8% (93,1%±97,5%)) и равномерное распределение МСК ЖТ человека по всему объему.

5. Предложенный внеклеточный матрикс на основе желатина обеспечивает не только эффективную доставку МСК ЖТ по всей зоне трансплантации, но и позволяет клеточным структурам активно интегрироваться в окружающие ткани.

#### Литература

1. Сравнительный анализ полипропиленового и биологического сетчатых имплантатов в эксперименте / А.А. Гостевской [и др.] // Медицинский академический журнал. – 2007. – Т.7, №3. – С. 135-136.

2. Биоматрица на основе полипропиленовой сетки и эмбриональных фибробластов / Н.В. Мальцева [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2008. – №3. – С.128-131.

3. Использование бесклеточного матрикса для формирования новых кровеносных сосудов и сердца методом тканевой инженерии / Ш.Д. Ахмедова [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – т.IV, №2. – С.32-39.

4. Изучение эффективности трансплантации культивированных алогенных фибробластов в коллагеновом геле при лечении ожоговых дефектов роговицы в эксперименте / П.В. Макаров [и др.] // Вестник офтальмологии. – 2004. – №4. – С.27-29.

5. Функции культивируемых эмбриональных клеток на коллаген-хитозановой матрице / А.В. Еремеев [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – т.IV, №2. – С.55-62.

6. Матрицы для культивирования клеток кожи человека на основе природных полисахаридов – хитина и хитозана / Е.Ф. Панарин [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – т.IV, №3. – С.41-46.

7. Применение клеточных покрытий для имплантируемых материалов в сердечно-сосудистой хирургии / Л.А. Бокерия [и др.] // Анналы хирургии. – 2008. – №2. – С.19-21.

8. Seeding strategies for 3D silk scaffolds using human mesenchymal stem cells / H. Ruedlinger [et al.] // Eur. Cells and Mat. – 2004. – Vol.7. – P.53-54.

9. Carlson, M. Technical note: assay of cell quantity in the fibroblast-populated collagen matrix with a tetrazolium reagent / M. Carlson // Eur. Cells and Mat. – 2006. – Vol.12. – P.44-48

10. Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices for cell culture / Ming-Thau Sheu [et al.] // Biomaterials. – 2001. – Vol. 22. – P.1713-1719.

11. Phagocytosis and remodeling of collagen matrix / L. Abraham [et al.] // Exp. Cell Res. – 2007. – Vol. 8. – P. 142-147.

12. Liu, Y. Processing of collagen gels to create in vitro cell growth matrix without damage to the collagen native structure / Y. Liu, D. Williams // J. Engin. Manuf. – 2005. – Vol. 220. – P.787-792.

13. Primary hepatocyte culture in collagen gel mixture and collagen sandwich / Y. Wang [et al.] // World J. Castr. – 2004. – Vol.10, №5. – P.699-702.

14. Multidifferentiation potential of mesenchymal stem cells in 3-dimensional collagen gel cultures / K. Yoheno [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. – 2005. – Vol.75, №3. – P.733-741.

15. Perspectives on cell and collagen composites for tendon repair / D. Butter [et al.] // Clin. Orthopaed. and Rel. Res. – 1999. – Vol.367. – P.324-332.

16. George, J. Differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts on honeycomb collagen scaffold / J. George, Y. Kuboki // BioTech. and Bioeng. – 2006. – Vol.6. – P. 65-74.

17. Сравнительная характеристика композиционных биоматриц с трехмерным желатиновым матриксом и мезенхимальными стволовыми клетками жировой ткани / В.Г. Богдан, М.М. Зафранская, Ю.М. Гаин, Ю.Е. Демидчик // Доклады НАН Беларуси. – 2010. – т. 54, № 3. – С.105-109.

18. A bioresponsive hydrogel tuned to chondrogenesis of human mesenchymal stem cells / CS Bahney [et al.] // FASEB J. – 2011. – Vol.25, №5. – P.1486-1496.

Поступила 11.09.2013 г.