

Е. А. Сосновский

РАЗРАБОТКА МАТРИКСА ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ЛЕЧЕНИИ СПАЕЧНОЙ БОЛЕЗНИ

Научный руководитель: канд. мед. наук, доц. А. В. Жура

2-ая кафедра хирургических болезней

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

***Резюме.** В работе представлены экспериментальные данные по исследованию альгинатного гидрогеля, как физического барьера, при лечении спаечной болезни, а также выживаемость мезенхимальных стволовых клеток в геле и возможность их совместного использования.*

***Ключевые слова:** перитонеальные спайки, мезенхимальные стволовые клетки, альгинатный гидрогель.*

***Resume.** This scientific work contains experimental data on the study of alginate hydrogel as a physical barrier in the treatment of peritoneal adhesions, as well as the survival of mesenchymal stem cells in the gel and the possibility of their joint use.*

***Keywords:** peritoneal adhesions, mesenchymal stem cells, alginate hydrogel.*

Актуальность. В настоящее время проблема лечения перитонеальных спаек далека от решения. Образование спаек, в основном, происходит после выполнения операций на органах брюшной полости, с частотой 40-60% после лапаротомии и 15% после лапароскопии. Также к спайкообразованию приводят воспалительные процессы, травмы, попадания инородных тел и др. Множество разработанных методов профилактики образования спаек свидетельствует об их несовершенстве. Одним из перспективных направлений является разработка противоспаечных агентов, на основании природных полисахаридов.

Цель: Разработать матрикс для трансплантации мезенхимальных стволовых клеток при лечении спаечной болезни.

Задачи:

1. Изучить в эксперименте биосовместимость, биodeградируемость и противоспаечное действие альгинатного гидрогеля.
2. Оценить альгинат как матрикс для трансплантации мезенхимальных стволовых клеток.

Материалы и методы. В работе было использовано 40 лабораторных крыс линии Вистар, которые были разбиты на 2 группы: опытная и группа сравнения. Опытная состояла из 6 лабораторных животных, которым проводилась аппликация 0,5-0,7 мл 4% альгината с помощью шпателя на сформированный дефект брюшной стенки, и 20-ти крысах, где применялся 7% гидрогель по аналогичной методике, группа сравнения состояла из 14 лабораторных животных, где сформированный дефект брюшной стенки оставляли без покрытия гелем.

Исследование биосовместимости проводили по наличию осложнений со стороны послеоперационной раны и брюшной полости, такие как несостоятельность швов на коже и мышцах, гнойные осложнения, наличие спаек и их выраженность, летальность, нарушение поведения животного, недомогание, отказ от пищи.

Способность геля к биodeградации оценивали путем поиска следов геля в брюшной полости.

Определение противовоспалительного действия альгинатного гидрогеля путем визуального определения образования спаек в зоне моделирования эксперимента (таблица 1).

Таблица 1. Градация спаек по степени их выраженности [3]

Рассечение спаек	Балл
Спаяк нет	0
Легкая тупая диссекция	1
Агрессивная тупая диссекция	2
Острая диссекция	3
Повреждение органов	4

При выведении животных из эксперимента был взят гистологический материал из зоны моделирования дефекта как у опытной группы, так и у группы сравнения.

Оценка альгинатного геля как матрикса для трансплантации была проведена с использованием аллогенных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ), которые смешивали с альгинатным гидрогелем (4%, 7% гель) и культивировали 5, 24, 48 часов соответственно. Подсчитывали количество клеток и оценивали жизнеспособность в камере Горяева по исключению 0,4% трипанового синего.

Результаты и их обсуждение. При выведении животных на 8-13 сутки из группы сравнения образование спаек наблюдалось у 12 из 14 лабораторных крыс (86%), летальности и осложнений не было, медиана выраженности спаек составила 2 балла. При изучении среза ткани, полученного из зоны моделирования дефекта у группы сравнения, видно выраженное продуктивное воспаление – большое количество капилляров, фибробластов, лимфоцитов, макрофагов, одиночных гигантских многоядерных клеток, коллагеновых волокон (рисунок 1).

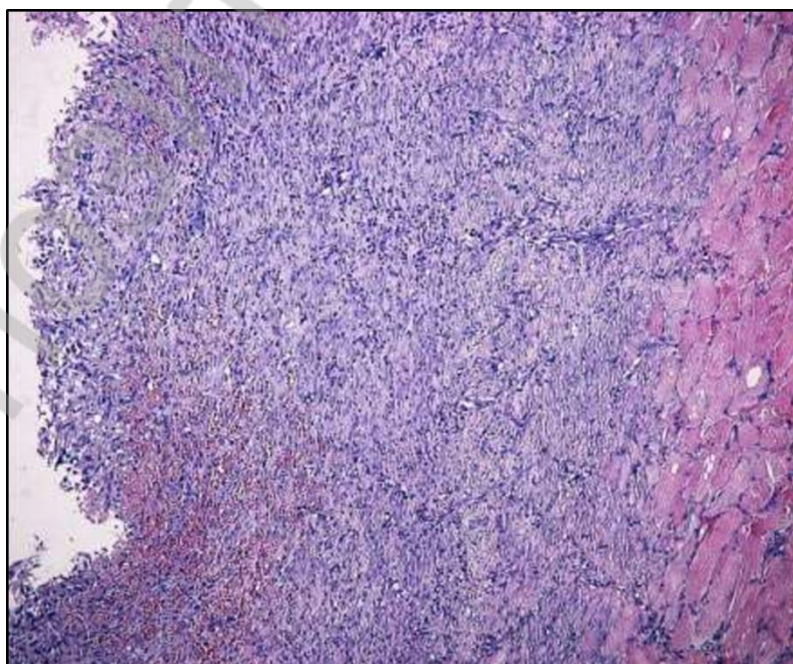


Рисунок 1 – Клеточная инфильтрация, гематоксилин-эозин, х100

При детальном изучении наблюдается неоднородный поверхностный слой клеточного инфильтрата (стрелка), без признаков клеточной ориентации и формирования слоев (рисунок 2).

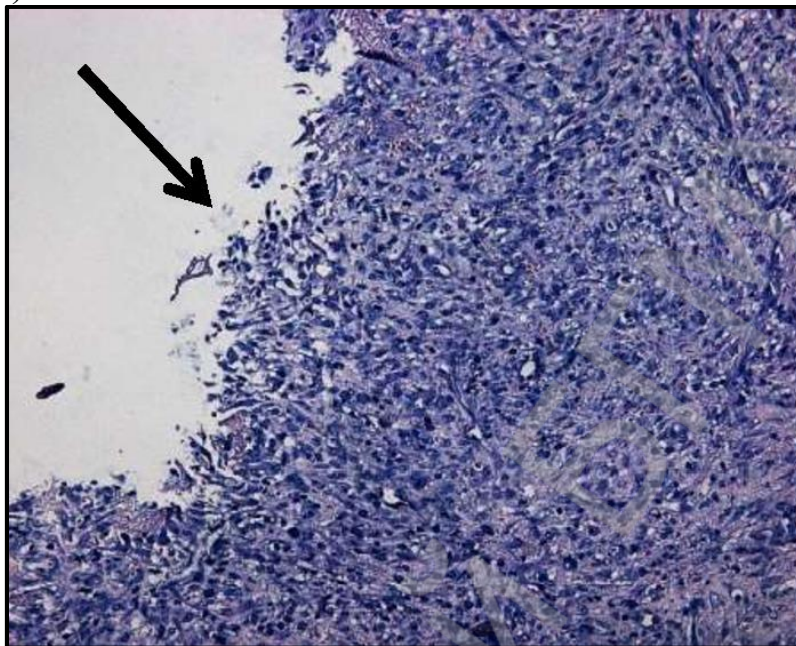


Рисунок 2 – Клеточная инфильтрация, гематоксилин-эозин, х200

За время наблюдений нарушений в поведении крыс, отказов от пищи, летальности, послеоперационных осложнений не было, что говорит об отсутствии токсического воздействия и высокой биосовместимости альгинатного гидрогеля.

У всех животных, при выведении из эксперимента, следов альгинатного гидрогеля в брюшной полости не было выявлено, что характеризуется высокой биodeградируемостью альгинатного гидрогеля.

При оценке результатов основной группы с применением 4% гидрогеля выявлено одно осложнение в виде воспалительного конгломерата, состоящего из брюшной стенки, большого сальника и тонкой кишки. У 4 из 6 (67%) животных наблюдались спайки.

Установлено, что 4% гидрогель имеет недостаточно вязкую консистенцию и быстро стекает с дефекта в передней брюшной стенке – не подходит для профилактики спаек.

При применении 7% альгината у опытной группы спайки наблюдались только у 2 из 20 животных, что равняется 10%, следовательно, 7% гидрогель обладает противоспаечным действием, достоверность определена точным критерием Фишера ($p < 0,01$).

Кроме того, альгинат обладал достаточной вязкостью для его удобного нанесения и предотвращения его преждевременного стекания с места аппликации.

Гистологическое исследование у опытной группы показало умеренное продуктивное воспаление – кровеносные сосуды типа капилляров, фибробласты, лимфоциты, макрофаги, одиночные гигантские многоядерные клетки в зоне моделирования дефекта с нанесением альгинатного гидрогеля (рисунок 3).

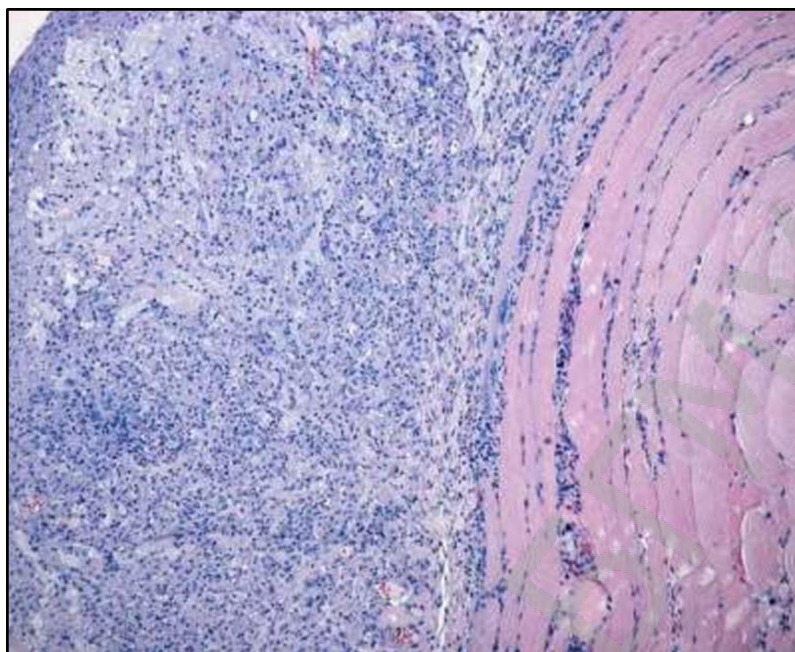


Рисунок 3 – Умеренная клеточная инфильтрация, гематоксилин-эозин, x100

А при увеличении могли наблюдать аморфные массы геля и организацию поверхностного слоя – горизонтальная ориентация клеток, мезотелиоподобная выстилка (рисунок 4).

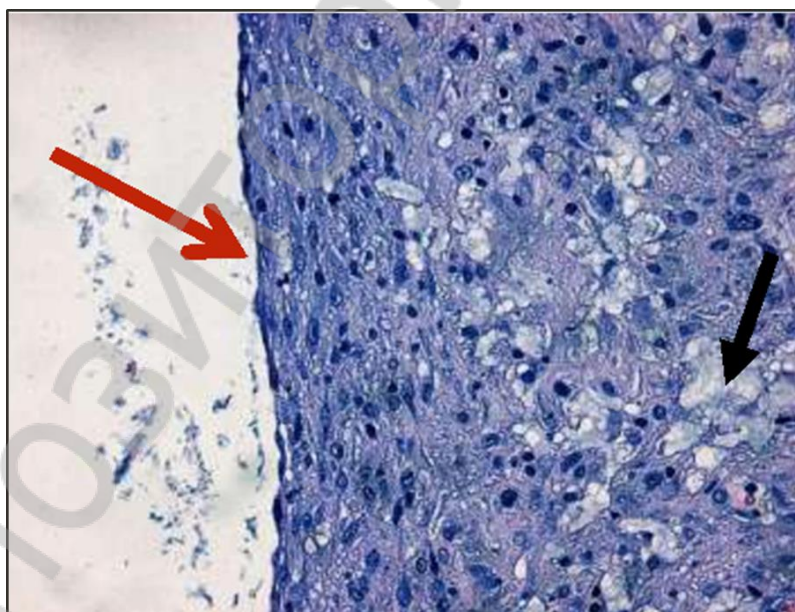


Рисунок 4 – Умеренная клеточная инфильтрация, гематоксилин-эозин, x400

Для оценки альгината как матрикса для трансплантации мезенхимальных стволовых клеток использовались аллогенные МСК ЖТ крыс взятые из брюшной стенки, далее их смешивали с альгинатным гидрогелем 4% и 7% и определяли количество и жизнеспособность клеточной культуры путем микроскопии в камере Горяева по исключению 0,4% трипанового синего. При этом количество жизнеспособных клеток составило не менее 95% в первые сутки культивирования в альгинатном гидрогеле (таблица 2).

Таблица 2. Результаты культивирования МСК ЖТ в альгинатном гидрогеле

Альгинатный гель, %	Время культивирования МСК ЖТ в альгинатном гидрогеле, час		
	5	24	48
	Жизнеспособность $M \pm m$, % (n=12)		
4%	97,8 \pm 0,50	95,5 \pm 0,57	79,0 \pm 1,15
7%	98,3 \pm 0,50	97,8 \pm 0,50	81,5 \pm 1,91

Выводы:

1. Альгинатный гидрогель обладает высокой биосовместимостью и биodeградируемостью;
2. 4% альгинатный гидрогель имеет низкую противоспаечную активность и недостаточно вязкую консистенцию, что приводит к его преждевременному стеканию с места аппликации;
3. 7% альгинатный гидрогель показывает достаточно выраженный противоспаечный эффект, имеет необходимую консистенцию и может применяться для профилактики спайкообразования,
4. 7% альгинатный гидрогель не токсичен для клеточной культуры МСК и возможно его использование как матрикса для их трансплантации.

E. A. Sosnovsky

THE DEVELOPMENT OF STEM CELLS TRANSPLANTATION MATRIX FOR PERITONEAL ADHESIONS TREATMENT

Tutors: associate professor A. V. Zhura,

2nd Surgical Diseases,

Belarusian State Medical University, Minsk

Литература:

1. An Assesment of the Effects of Two Types of Bioresorbable Barriers to Prevent Postoperative Intra-Abdominal Adhesions in Rats / H.A. Kayaoglu [et al.] // Surg Today. – 2005. – Vol.35. – P. 946-950.
2. Benefits and harms of adhesion barriers for abdominal surgery: a systematic review and meta-analysis / R.P. Broek [et al.] // Lancet. – 2014. – Vol.383. – P. 48-59.
3. In search of the best peritoneal adhesion model: comparison of different techniques in a rat model / S.H. Whang [et al.] // J Surg Res. – 2011. – Vol.167. – P. 245-250.
4. Shapiro, L. Novel alginate sponges for cell culture and transplantation / L. Shapiro, S. Cohen // Biomaterials. – 1997. – Vol.18. – P. 583-590.
5. 3D Porous Calcium-Alginate Scaffolds Cell Culture System Improved Human Osteoblast Cell Clusters for Cell Therapy / C-Y Chen [et al.] // Theranostics. – 2015. – Vol.5. – P.643-655.
6. Евтушенко, Д.А. Анализ патоморфологических особенностей брюшины у больных, повторно оперированных на органах брюшной полости на фоне спаечной болезни брюшины / Д.А. Евтушенко // Медицина неотложных состояний. – 2015. – №8. – С. 76-79.