

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ АДСОРБЦИИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛАХ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В УРОЛОГИИ

Ярин Г.Ю.¹, Шевела А.И.¹, Надеев А.П.², Михеева Т.В.¹, Хоменюк С.В.¹,
Майбородин И.В.^{1,3}

¹ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск, e-mail: imai@mail.ru;

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск;

³Институт молекулярной патологии и патоморфологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск

Методами флуоресцентной микроскопии изучали подкожную клетчатку крыс в различные сроки после имплантации полипропиленовых материалов, применяемых в урологии, после пассивной адсорбции мультипотентных стромальных клеток (МСК) с мембранами, мечеными Vybrant® CM-DiI. После имплантации и проленовой мононити, и сетки из полипропилена через 1 неделю в крупных клетках тканей рядом с инородным телом были обнаружены многочисленные включения разных размеров и форм с очень интенсивной флуоресценцией на фоне применения фильтра для родамина. Спустя 1 месяц после операции были найдены только редко встречающиеся единичные объекты с более яркой люминесценцией при использовании фильтра для родамина. Наиболее вероятно, что крупные клеточные элементы, содержащие флуоресцирующие включения, являются макрофагами, а объекты с люминесценцией при использовании родаминового фильтра – детрит введенных МСК с мечеными Vybrant® CM-DiI мембранами. Следовательно, практически все адсорбированные МСК подвергаются деструкции в тканях места имплантации спустя 1 неделю после операции, а к 1 месяцу из тканей полностью элиминируется и детрит этих МСК. Таким образом, все эффекты адсорбции МСК на поверхности полимерных материалов должны быть транзиторными и ограничиваться только 1 неделей, далее влияние клеточных технологий на воспаление, васкуляризацию и структурную организацию тканей, окружающих инородное тело, скорее всего, будет незаметным.

Ключевые слова: полипропиленовые имплантаты, мультипотентные стромальные клетки, адсорбция клеток, деструкция, люминесцентная микроскопия.

STUDY OF THE RESULTS OF MULTIPOTENT STROMAL CELL ADSORPTION ON POLYMER MATERIALS USED IN UROLOGY

Yarin G.Yu.¹, Shevela A.I.¹, Nadeev A.P.², Mikheeva T.V.¹, Khomenyuk S.V.¹,
Maiborodin I.V.^{1,3}

¹Federal State Budgetary Institution of Science «Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS», Novosibirsk, e-mail: imai@mail.ru;

²Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk;

³Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk

The subcutaneous tissue of rats in various times after implantation of polypropylene materials used in urology, after passive adsorption of multipotent stromal cells (MSCs) with membranes labeled with Vybrant® CM-DiI, was study by methods of fluorescent microscopy. 1 week after implantation of both prolene monofilament and polypropylene mesh, numerous inclusions of different sizes and shapes with very intense fluorescence were found in large tissue cells near the foreign body when a rhodamine filter was applied. One month after the operation, only rare single objects with brighter luminescence were found when using a filter for rhodamine. It is most likely that large cells containing fluorescent inclusions are macrophages, and objects with luminescence when using a rhodamine filter are the detritus of injected MSCs with labeled Vybrant® CM-DiI membranes. Thus, almost all adsorbed MSCs undergo destruction in the tissues of the implantation site 1 week after the surgery, and by 1 month, the detritus of these MSCs is completely eliminated from the tissues. Thus, all effects of MSC adsorption on the surface of polymeric materials should be transient and limited to only 1 week, next the effect of cellular technologies on the inflammation, vascularization and structural organization of tissues surrounding a foreign body will most likely be invisible.

Keywords: polypropylene implants, multipotent stromal cells, adsorption of cells, destruction, luminescence microscopy.

Пролапс тазовых органов и стрессовое недержание мочи регистрируют у 40–50% женщин в постменопаузе, это затрагивает 200 млн человек во всем мире. Ургентная инконтиненция составляет 22–36%, смешанная – 29%, на долю других типов приходится от 5% до 10%. Стандартные методы лечения часто обеспечивают симптоматическое облегчение, но не нацелены на основную этиологию и демонстрируют огромную вариабельность результатов от пациента к пациенту, ограниченный успех и осложнения, связанные с процедурами [1, 2].

Операциями выбора при стрессовой инконтиненции считаются различные варианты петлевых пластик или слинговых (петлевых) операций. Суть всех слинговых операций заключается в создании надежного «механизма закрытия», который не предусматривает восстановления поврежденного сфинктерного аппарата, а ведет к так называемому удержанию мочи путем компрессии мочеиспускательного канала [3]. Формирование слинга (петли) вокруг шейки мочевого пузыря и проксимальной уретры также восстанавливает нормальное анатомическое положение последних. В настоящее время для изготовления петель все шире применяются синтетические материалы. Этот метод дает хорошие результаты более чем в 80% случаев, основанные как на субъективных, так и на объективных оценках [4]. Среди недостатков синтетических петель следует отметить возможность отторжения и частые инфекционные осложнения [5].

Клеточные технологии позволяют предложить решения на будущее как при первичной установке слингов, так и для лечения осложнений этой процедуры. Использование аутологичных клеток для покрытия поверхностей имплантатов представляет собой многообещающее средство и для ослабления реакции инородного тела, и для снижения остроты воспаления [6]. Адсорбированные мультипотентные стромальные клетки (МСК) жировой ткани на волокна полигликолевой кислоты образуют каркас с формой, имитирующей комплекс слингов. С увеличением времени культивирования сконструированная ткань показывает значительное улучшение биомеханических свойств, также были найдены зрелые структуры тканевого коллагена [5]. Кроме того, плохая васкуляризация является ключевым ограничением для долгосрочного приживания больших искусственных конструкций в регенеративной медицине, а значительный ангиогенез может быть индуцирован адгезией МСК на инородном продукте [7, 8].

В связи с вышеизложенным была поставлена цель **исследования** – изучить возможность применения *in vivo* МСК, адсорбированных на полимерных материалах, применяемых в урологии.

Материал и методы исследования

Эксперименты проведены на крысах инбредной линии Wag весом 180–200 г возрастом 6 месяцев, животные были получены и содержались в виварии Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск), соответствующем категории SPF. Крыс содержали при естественном освещении и неограниченном доступе к корму и воде. Все манипуляции не были связаны с причинением боли животным и проведены с соблюдением ГОСТ 33215-2014 (Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными).

Крысы получали ингаляционное эфирное обезболивание. Дыхание животных во всех случаях было спонтанным. Хирургические вмешательства по имплантации исследуемых материалов, связанные с повреждением тканей, были выполнены в условиях чистой операционной с соблюдением правил асептики и антисептики, имплантируемые материалы были приобретены в аптечной сети и были стерильны.

Получение, культивирование и характеристики аутологичных мезенхимальных МСК костномозгового происхождения (ММСК)

Методы выделения, культивирования, определения физических, морфологических, фенотипических признаков и дифференцировочного потенциала ММСК соответствовали литературным рекомендациям [9, 10]. Клеточные мембраны ММСК были окрашены раствором Vybrant® CM-Dil (Thermo Fisher Scientific, USA) [9, 10] согласно инструкции производителя. Непосредственно перед операцией стерильный фрагмент имплантируемого изделия погружали в суспензию ММСК на 2 часа для пассивной адсорбции в связи с тем, что живые клетки, как и клетки перевиваемых клеточных культур, из взвеси прикрепляются практически к любому твердому субстрату [11]. Такой срок адсорбции является достаточным для формирования монослоя на большинстве материалов.

Ход хирургического вмешательства, группы животных, характеристика имплантируемых изделий и сроки забора материала при изучении влияния ММСК на имплантацию полимеров

Так как очень многие имплантируемые в организм урологических пациентов материалы созданы на основе полипропилена, было проведено исследование тканей вокруг имплантированных под кожу в правом лопаточном регионе фрагмента проленовой лигатуры или сетки Parietene™ ProGrip™ без и с адсорбированными на поверхности ММСК.

Имплантировали стерильный Пролен (W8844 12 ПРОЛЕН 3/0, 90 см, синий, диаметр 0,2 мм с атравматической иглой СС-25 26 мм ½ с) и фрагменты сетки Parietene™ ProGrip™ (стерильный сетчатый имплантат для внутреннего протезирования 15x9 см (6"x3,5"), Tyco Healthcare Group LP, France). Для подкожной имплантации полимеров производили разрез кожи по средней линии спины в области шеи от основания черепа до лопаток длиной 1–2 см.

Тупым способом формировали слепой канал длиной 1,5–2 см в сторону правой лопатки. В данный карман помещали имплантат с или без адсорбированных ММСК [12, 13]. Послеоперационные раны ушивали непрерывными швами, кожу и кожные швы обрабатывали спиртовым раствором йода. Крыс декапитировали через 1 неделю; 1; 6 и 12 месяцев после операции. Методами световой микроскопии с применением флюоресценции изучали ткани рядом с полимерами. В каждой группе с имплантацией проленовой нити было по 11 животных, сетки Parietene™ ProGrip™ – по 16. Всего в экспериментах было использовано 216 крыс.

Образцы тканей для последующего изучения фиксировали в 4%-ном растворе забуференного нейтрального параформальдегида (рН 7,4) не менее 1 суток, обезвоживали и просветляли в реактиве «Изопреп» (БиоВитрум, Россия), заключали в гистопласт. Неокрашенные гистологические срезы толщиной 5–7 мкм после удаления гистопласта исследовали в режиме люминесценции микроскопа Axioimager M1 (Carl Zeiss, Germany) при увеличении до 1200 раз с фильтрами Alexa Fluor 488 (диапазон возбуждения 450–490 нм, диапазон регистрации 515–∞ нм) или для родамина (Rhod – диапазон возбуждения 540–552 нм, диапазон регистрации 575–640 нм). При получении микрофотографий использовали автоматическую экспозицию. В процессе совмещения изображений с применением фильтров Alexa 488 и для родамина можно получить зеленый и красный (или оранжевый и желтый) цвет в зависимости от преобладания интенсивности свечения при том или ином фильтре. Зеленый цвет дает более яркая флюоресценция при использовании фильтра Alexa 488, красный цвет – на фоне применения родаминового фильтра, желтый и его оттенки получаются в результате смешения зеленого и красного цветов в той или иной пропорции [9, 10].

Результаты исследования и их обсуждение

У животных с имплантацией полимеров без предварительной адсорбции ММСК в месте хирургического вмешательства отсутствовали объекты с преимущественной флюоресценцией (красной) при установке родаминового фильтра.

При изучении результатов имплантации *проленовой мононити* с адсорбированными ММСК, мембраны которых были окрашены Vybrant® CM-DiI, с использованием методов люминесцентной микроскопии через 1 неделю в крупных клетках тканей рядом с инородным телом были обнаружены многочисленные включения разных размеров и форм с очень интенсивной флюоресценцией на фоне применения фильтра для родамина. Иногда в крупном клеточном элементе присутствовал один достаточной большой овальный фрагмент с красной люминесценцией. В других случаях в цитоплазме содержались многочисленные мелкие объекты с таким же ярким свечением (рис. 1а).

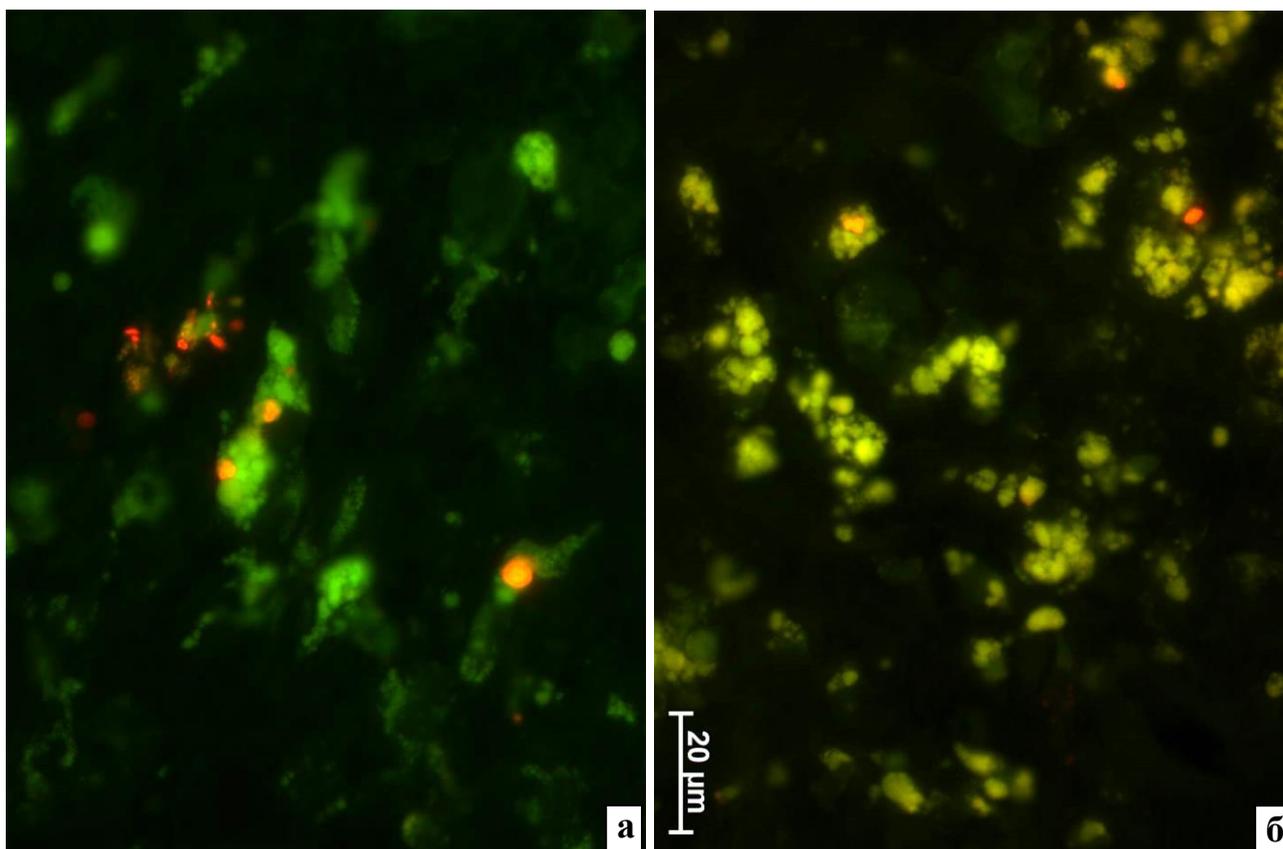


Рис. 1. Ткани рядом с проленовой мононитью на 1-й неделе (а) и через 1 месяц (б) после имплантации с адсорбированными на поверхности ММСК. Результат компьютерного совмещения изображений, полученных при изучении неокрашенных срезов в люминесцентном режиме микроскопа с применением фильтров Alexa 488 и для родамина. а – Отдельные клеточные элементы содержат множество включений разных размеров и форм, с четкими краями и очень ярким свечением при установке родаминового фильтра. б – Только в небольшом числе клеток содержатся единичные включения разных форм и размеров, с четкими краями и очень интенсивной флюоресценцией при использовании родаминового фильтра

Наиболее вероятно, что крупные клеточные элементы, содержащие флюоресцирующие включения, являются макрофагами, а объекты с люминесценцией при использовании родаминового фильтра – детрит введенных ММСК с мечеными Vybrant® CM-DiI мембранами. Большинство введенных ММСК очень быстро погибает при введении в ткани, особенно сразу после хирургического вмешательства [9, 10, 14, 15]. Во-первых, резко меняются условия окружающей среды этих клеточных элементов. Во-вторых, на них действуют агрессивные факторы раневого отделяемого [14], даже в условиях асептического воспаления. Следовательно, большая часть введенных ММСК очень быстро погибает и разрушается, детрит поглощается фагоцитами и, не исключено, оказывает на них определенное влияние.

Спустя 1 месяц после внедрения проленовой лигатуры с адсорбированными ММСК были найдены только редко встречающиеся единичные объекты с более яркой люминесценцией при использовании фильтра для родамина (рис. 1б). К этому сроку все внесенные в организм на поверхности пролена ММСК, по-видимому, уже были разрушены и элиминированы. Также, скорее всего, к этой дате исчезло и влияние ММСК, оказываемое на иммунокомпетентные клетки реципиента и воспалительный процесс. Следует отметить, что другие исследователи также отмечают гибель и практически полную элиминацию введенных извне ММСК из организма крыс, в том числе и замещение этих клеточных элементов из структур, созданных при их участии и в результате дифференцирования, к 4–5-й неделям, то есть через 1 месяц [9, 10].

При исследовании методом флюоресцентной микроскопии тканей рядом с *сеткой Parietene™ ProGrip™* на 1-й неделе после имплантации с адсорбированными ММСК, мечеными Vybrant® CM-DiI, в некоторых клеточных элементах были найдены включения с более интенсивным свечением при установке фильтра для родамина. Эти включения были мелкими и содержались только по несколько штук в отдельных крупных клетках, по-видимому, фагоцитах (рис. 2а). Вероятность макрофагального происхождения таких клеточных элементов была подробно рассмотрена выше.

К 1-му месяцу после введения сетчатого материала с ММСК только в единичных клетках было найдено небольшое число мелких включений со слабым преимущественным свечением на фоне применения родаминового фильтра (рис. 2б). Следовательно, к этому сроку не только все введенные ММСК уже разрушены, но и из места имплантации сетки с адсорбированными ММСК практически элиминирован и детрит этих ММСК, что совпадает с литературными данными о быстрой деструкции введенных извне ММСК [9, 10, 14, 15] и исчезновении их дебриса к 4–5-й неделям после трансплантации [9, 10]. Элиминация ММСК осуществляется посредством макрофагального фагоцитоза; если ММСК были окрашены флюоресцентным красителем, то макрофаги накапливают эту метку в своих лизосомах в большой концентрации и за счет этого приобретают способность к собственной соответствующей люминесценции [9, 10].

Через 6 и 12 месяцев после внедрения МСК структуры с более интенсивным свечением в условиях использования фильтра для родамина не были найдены ни мононити, ни сетки с адсорбированными ММСК, мечеными люминесцентным красителем Vybrant® CM-DiI.

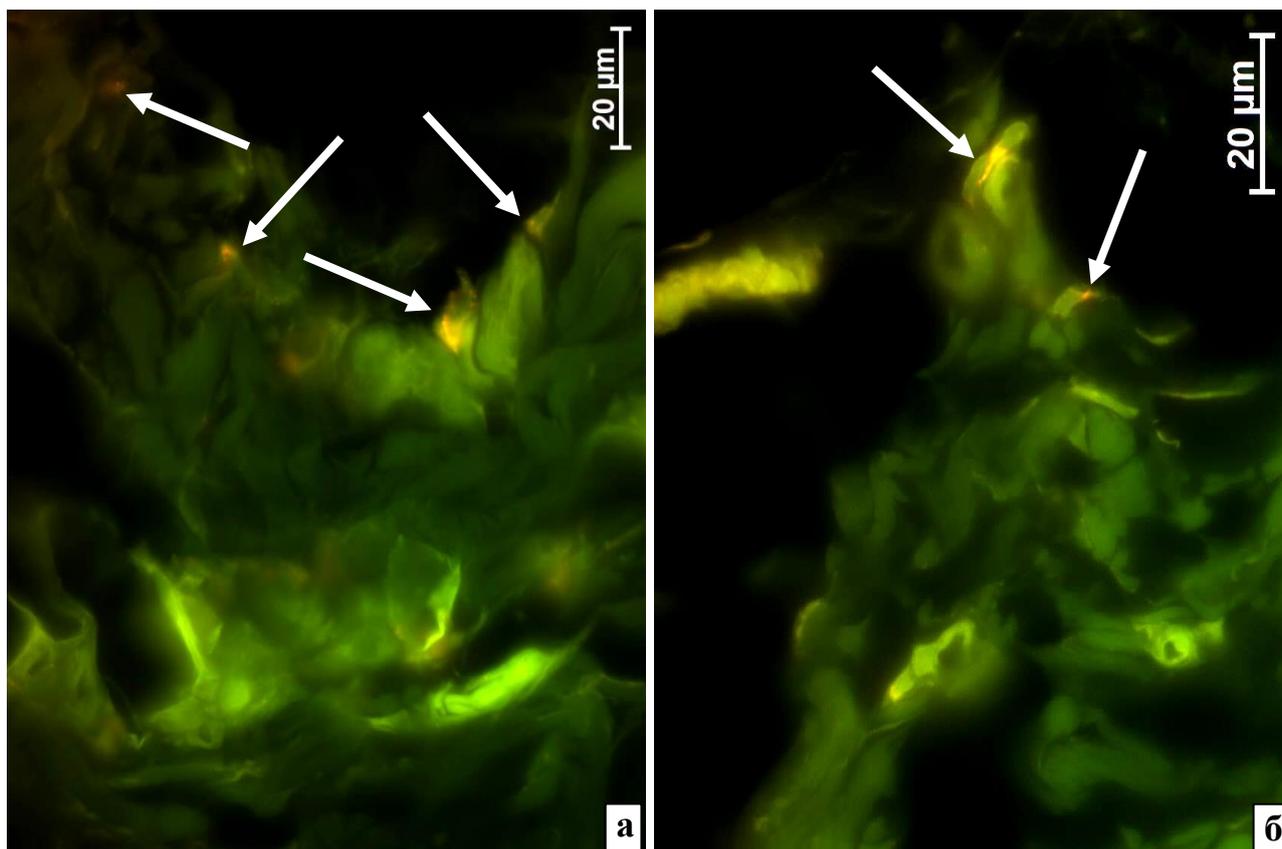


Рис. 2. Ткани возле полимерной сетки спустя 1 неделю (а) и 1 месяц (б) после внедрения с адсорбированными на поверхности МСК. Результат компьютерного совмещения изображений, полученных при изучении неокрашенных срезов в люминесцентном режиме микроскопа с применением фильтров Alexa 488 и для родамина. а – Отдельные клеточные элементы содержат включения с более ярким свечением при установке родаминового фильтра. б – В некоторых клетках содержатся небольшие единичные включения с более интенсивной флюоресценцией при использовании родаминового фильтра

Заключение

Возможна пассивная адсорбция МСК на полипропиленовых материалах, применяемых в урологической практике, а также при имплантации этих полимеров вместе с МСК *in vivo* для влияния на процессы приживания внедряемых инородных тел. Однако практически все адсорбированные МСК подвергаются деструкции в тканях места имплантации спустя 1 неделю после операции, а к 1 месяцу из тканей полностью элиминируется и детрит этих МСК. Таким образом, все эффекты адсорбции МСК на поверхности полимерных материалов должны быть транзитными и ограничиваться только 1 неделей, далее влияние клеточных технологий на воспаление, васкуляризацию и структурную организацию тканей, окружающих инородное тело, скорее всего, будет незаметным.

Список литературы

1. Aufderklamm S., Aicher W.K., Amend B., Stenzl A. Stress urinary incontinence and regenerative medicine: is injecting functional cells into the urethra feasible based on current knowledge and future prospects? *Curr Opin Urol.* 2019. vol. 29. no. 4. P. 394-399. DOI: 10.1097/MOU.0000000000000624.
2. Janssen K., Lin D.L., Hanzlicek B., Deng K., Balog B.M., van der Vaart C.H., Damaser M.S. Multiple doses of stem cells maintain urethral function in a model of neuromuscular injury resulting in stress urinary incontinence. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2019. vol. 317. no. 4. P. F1047-F1057. DOI: 10.1152/ajprenal.00173.2019.
3. Lichtenberg V.A., Voelcker F., Wildbolz H. *Handbuch der Urologie: Band 5: Spezielle Urologie III: Erkrankungen der Harnleiter, der Blase, Harnröhre, Samenblase, Prostata, des Hodens und Samenstranges und der Scheidenhäute, Scrotum. Gynäkologische Urologie.* Springer-Verlag, 2013. 1134 p.
4. Hakim L., De Ridder D., Van der Aa F. Slings for urinary incontinence and the application of cell-based therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015. vol. 82-83. P. 22-30. DOI: 10.1016/j.addr.2014.11.006.
5. Wang Y., Wang W., Wang X., Wang Y., Wang J., Fu Q., Shi G. Tissue-engineered sling with adipose-derived stem cells under static mechanical strain. *Exp Ther Med.* 2017. vol. 14. no. 2. P. 1337-1342. DOI: 10.3892/etm.2017.4705.
6. Roger Y., Schäck L.M., Koroleva A., Noack S., Kurselis K., Krettek C., Chichkov B., Lenarz T., Warnecke A., Hoffmann A. Grid-like surface structures in thermoplastic polyurethane induce anti-inflammatory and anti-fibrotic processes in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2016. vol. 148. P. 104-115. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.06.024.
7. Handel M., Hammer T.R., Noeaid P., Boccaccini A.R., Hoefler D. 45S5-Bioglass(®)-based 3D-scaffolds seeded with human adipose tissue-derived stem cells induce in vivo vascularization in the CAM angiogenesis assay. *Tissue Eng Part A.* 2013. vol. 19. no. 23-24. P. 2703-2712. DOI: 10.1089/ten.TEA.2012.0707.
8. Nowacki M., Jundziłł A., Nazarewski Ł., Kotela A., Kloskowski T., Skopińska-Wisniewska J., Bodnar M., Łukasiewicz A., Nazarewski S., Kotela I., Kucharzewski M., Pokrywczyńska M., Marszałek A., Drewa T. Blood vessel matrix seeded with cells: a better alternative for abdominal wall reconstruction-a long-term study. *Biomed Res Int.* 2015. vol. 2015. P. 890613. DOI: 10.1155/2015/890613.
9. Майбородин И.В., Матвеева В.А., Маслов Р.В., Оноприенко Н.В., Кузнецова И.В.,

Частикин Г.А., Анিকেев А.А. Некоторые реакции регионарных лимфатических узлов крыс после имплантации в дефект костной ткани мультипотентных стромальных клеток, адсорбированных на полигидроксиалканоате // Морфология. 2016. Т. 149. № 2. С. 21-26.

10. Майбородин И.В., Морозов В.В., Анিকেев А.А., Фигуренко Н.Ф., Маслов Р.В., Частикин Г.А., Матвеева В.А., Майбородина В.И. Макрофагальный ответ у крыс на введение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в регион хирургической травмы // Новости хирургии. 2017. Т. 25. № 3. С. 233-241. DOI: 10.18484/2305-0047.2017.3.233.

11. Шевела А.А., Тодер М.С., Матвеева В.А., Артемьева Л.В., Матвеев А.Л., Мейснер С.Н., Мейснер Л.Л., Шевела А.И., Анিকেев А.А., Фигуренко Н.Ф., Маслов Р.В., Байбородин С.И., Майбородин И.В. Химически чистое кремниевое и танталовое покрытие не токсично для мезенхимальных стромальных клеток и усиливает цитосовместимость электрополированного сплава никелида титана // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. 2017. № 3(62). С. 45-50. DOI: 10.17223/1814147/62/06.

12. Майбородин И.В., Кузнецова И.В., Береговой Е.А., Шевела А.И., Майбородина В.И., Манаев А.А., Баранник М.И. Отсутствие полной абсорбции полилактидного материала в организме // Новости хирургии. 2014. Т. 22. № 1. С. 26-32. DOI: 10.18484/2305-0047.2014.1.26.

13. Kim C.H., Kim D.H., Oh S.H., Song S.Y. Human embryonic stem cell-derived endothelial precursor cell conditioned medium reduces the thickness of the capsule around silicone implants in rats. *Ann Plast Surg.* 2015. vol. 75. no. 3. P. 348-352. DOI: 10.1097/SAP.000000000000123.

14. Rodrigues M., Yates C.C., Nuschke A., Griffith L., Wells A. The matrikine tenascin-C protects multipotential stromal cells/mesenchymal stem cells from death cytokines such as FasL. *Tissue Eng Part A.* 2013. vol. 19. no. 17-18. P. 1972-1983. DOI: 10.1089/ten.TEA.2012.0568.

15. Yates C.C., Nuschke A., Rodrigues M., Whaley D., Dechant J.J., Taylor D.P., Wells A. Improved transplanted stem cell survival in a polymer gel supplemented with Tenascin C accelerates healing and reduces scarring of murine skin wounds. *Cell Transplant.* 2017. vol. 26. no. 1. P. 103-113. DOI: 10.3727/096368916X692249.