


Сравнительное изучение методов модернизации герниопротезов как матрицы для культивирования фибробластов

И.С. Иванов , А.А. Ушанов, Е.С. Мишина, В.А. Плотников, А.Р. Бобкова, К.С. Толкачев

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Аннотация. Цель исследования – провести сравнительное изучение методов модернизации герниопротезов как матрицы для культивирования фибробластов. **Материалы и методы.** В условиях эксперимента было выполнено нанесение на поверхность сетчатых герниоэндопротезов вещества поликапролактона по оригинальной методике, предложенной В.В. Берещенко и коллективом соавторов (2019 г.). В качестве объекта изучения был выбран поливинилиденфторидный герниоэндопротез «Унифлекс Стандартный» (ООО «Линтекс», Санкт-Петербург, Россия). После нанесения полимера выполняли обработку низкотемпературной плазмой с характеристиками: частота – 5 кГц, напряжение импульса – 10 кВ, плотность мощности – 2 Вт/см², время экспозиции – 5 минут. После этого выполнялась стерилизация образцов с помощью рентгеновского излучения с мощностью 150 кВ и экспозицией 3 мин. Нанесение клеток осуществлялось путем внесения образцов в среду DMEM с культурой фибробластов на 5 дней. Полученные образцы изучали при помощи сканирующей электронной микроскопии. Статистическую обработку проводили с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни в программе Statistica 10 (Dell Software Company, Round Rock, Texas, United States of America). **Результаты.** Полученные данные свидетельствуют об успешном прикреплении фибробластов на поверхность модифицированных герниопротезов. **Выводы.** Описанный процесс модификации герниопротеза может применяться с целью улучшения его свойств в ходе течения процессов репарации соединительной ткани *in vivo*.

Ключевые слова: грыжи, герниопротезирование, низкотемпературная плазма, поликапролактон, дермальные аутофибробласты

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

Comparative study of methods for the modernization of mesh prostheses as a matrix for the cultivation of fibroblasts

I.S. Ivanov , A.A. Ushanov, E.S. Mishina, V.A. Plotnikov, A.R. Bobkova, K.S. Tolkahev

Kursk State Medical University, Kursk, Russia

Abstract. Objective: conduct a comparative study of methods for the modernization of mesh prostheses as a matrix for the cultivation of fibroblasts. **Materials and methods:** In the experiment conditions, polycaprolactone substance was applied to the surface of mesh hernioendoprotheses according to the original method proposed by V.V. Bereshchenko and a team of co-authors (2019). The polyvinylidene fluoride "Uniflex Standard" prosthesis (Lintex LLC, St. Petersburg, Russia) was chosen as the object of study. After applying the polymer, low-temperature plasma treatment was performed with the characteristics: frequency – 5 kHz, pulse voltage – 10 kV, power density – 2 W/cm², exposure time – 5 minutes. After that, the samples were sterilized using X-ray radiation with a power of 150 kV and an exposure of 3 min. The application of cells was carried out by introducing samples into a DMEM medium with fibroblast culture for 5 days. The obtained samples were studied using scanning electron microscopy. Statistical processing was performed using the nonparametric Mann-Whitney test in the Statistica 10 program (Dell Software Company, Round Rock, Texas, United States of America). **Results:** The data obtained indicate the successful attachment of fibroblasts to the surface of modified hernioprostheses. **Conclusions:** The described process of hernioprosthesis modification can be used to improve its properties during the course of connective tissue repair processes *in vivo*.

Keywords: hernia, mesh prosthesis, low-temperature plasma, polycaprolactone, dermal autofibroblasts

Проблема вентральных грыж остается одной из самых актуальных в абдоминальной хирургии. Согласно данным литературы, во всей человеческой популяции от данной патологии страдают от 3,9 до 4,5 % [1]. В связи с этим не прекращается поиск как способов профилактики, так и лечения грыж. В наше время «золотым стандартом» лечения грыж передней

брюшной стенки является герниоэндопротезирование сетчатым герниопротезом [2]. Однако имплантация синтетических материалов связана с риском развития ряда экссудативных осложнений, например, сером. Кроме того, научное сообщество пришло к выводу, что сама по себе имплантация сетчатого протеза не является единственно достаточным средством лечения,

так как эта патология является лишь одной из проявлений дисколлагенозных состояний [3]. В случае же послеоперационных вентральных грыж имеются научные данные о несостоятельности самой соединительной ткани в области дефекта, что также ставит под вопрос полноценность и законченность исключительно хирургического лечения [4]. С этой целью предпринимаются попытки как системного, так и местного улучшения результатов оперативного вмешательства. Одним из примеров такого подхода является усовершенствование самого имплантируемого протеза с помощью модификации его поверхности и применения клеточных технологий [5]. Имплантации клеточного материала при герниопластиках (в том числе фибробластов) базируются на многочисленных научных работах, позволяющих судить как об эффективности такого метода модифицирования оперативного вмешательства, так и о перспективности всего направления в целом. Позитивные данные получены при использовании стромальных клеток, полученных из подкожно-жировой клетчатки, костного мозга, фетальной ткани, эмбрионального материала и некоторых других субстанций [6]. Множество данных получено и при попытках улучшения поверхностных свойств герниопротезов и при обработке их низкотемпературной плазмой. Обработку производили уже улучшенных герниопротезов с помощью нанесения поликапролактона на поверхность имплантов [7, 8]. Поликапролактон является полимером с гидрофобными свойствами, однако фибробласты могут успешно закрепляться на его поверхности, особенно с учетом последующей модификации его поверхности [9].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить способность фибробластов к прикреплению на поверхность покрытого поликапролактоном сетчатого протеза.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнялось на базе лаборатории морфологии и клеточных технологий НИИ Экспериментальной медицины ФГБОУ ВО «Курского государственного медицинского университета» в период с июня по декабрь 2022 года. Объектом исследования выбран сетчатый полимерный эндопротез «Унифлекс стандартный» (поливинилиденфторидная мононить диаметром 0,12 мм, толщина сетки 0,5 мм, поверхностная плотность 0,73 г/м², объемная пористость около 90 %) производства ООО «Линтекс» (Санкт-Петербург, Россия). Во 2-й группе наблюдения в асептических условиях на материал сетки наносился 10%-й раствор поликапролактона в хлороформе согласно методике, описанной В.В. Берещенко и соавторами (2019 г.) [10].

В 3-й группе наблюдения следующим этапом модификации была обработка сеток низкотемпературной плазмой с характеристиками: частота – 5 кГц, напряжение импульса – 10 кВ, плотность мощности – 2 Вт/см², время экспозиции – 5 минут. Так как заданные характеристики не обеспечивают стерильность, выполнялась последующая стерилизация образцов с помощью рентгеновского излучения с мощностью 150 кВ и экспозицией 3 мин.

Во всех группах наблюдения на сетчатый протез наносились дермальные аутофибробласты, выделенные методом теплого трипсина из кожи лабораторного животного. С этой целью образцы помещались в среду DMEM + пенициллин + L-глутамат с культивированными в ней дермальными аутофибробластами в количестве $1,5 \times 10^5$ клеток. Период инкубации фибробластов вместе с протезом составлял 5 дней. С целью определения факта прикрепления и количественного подсчета фибробластов на модифицированных герниопротезах выполняли сканирующую электронную микроскопию полученных образцов при помощи сканирующего электронного микроскопа JEOL 6610LV (JEOL, Япония).

Ввиду небольших размеров выборки в экспериментальных группах исследования при выполнении расчетов было принято решение в качестве основной методики определения уровня статистической значимости отличий использовать непараметрический критерий Манна – Уитни. В качестве программной среды использовали программу Statistica 10 (производитель Dell Software Company, Round Rock, Texas, United States of America).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате полученных исследований было выявлено, что после культивирования дермальных аутофибробластов в течение 5 суток происходит их прикрепление к нитям эндопротеза. В группе с использованием герниопротеза «Унифлекс стандартный» на нитях синтетического материала визуализировались единичные клетки округлой или овальной формы. Большая часть клеток прикреплялась ко дну флакона, приобретая характерную распластannую форму с большим количеством отростков (рис. А).

В группе «Унифлекс стандартный» с последующей обработкой поликапролактоном вокруг нитей протеза визуализировались группы фибробластов. Большая часть клеток имели распластannую или вытянутую форму, что свидетельствует о прочности прикрепления к материалу (рис. Б, Д). Важно, что клеточный рост определялся как вокруг мест переплетения, так и между прямыми нитями.

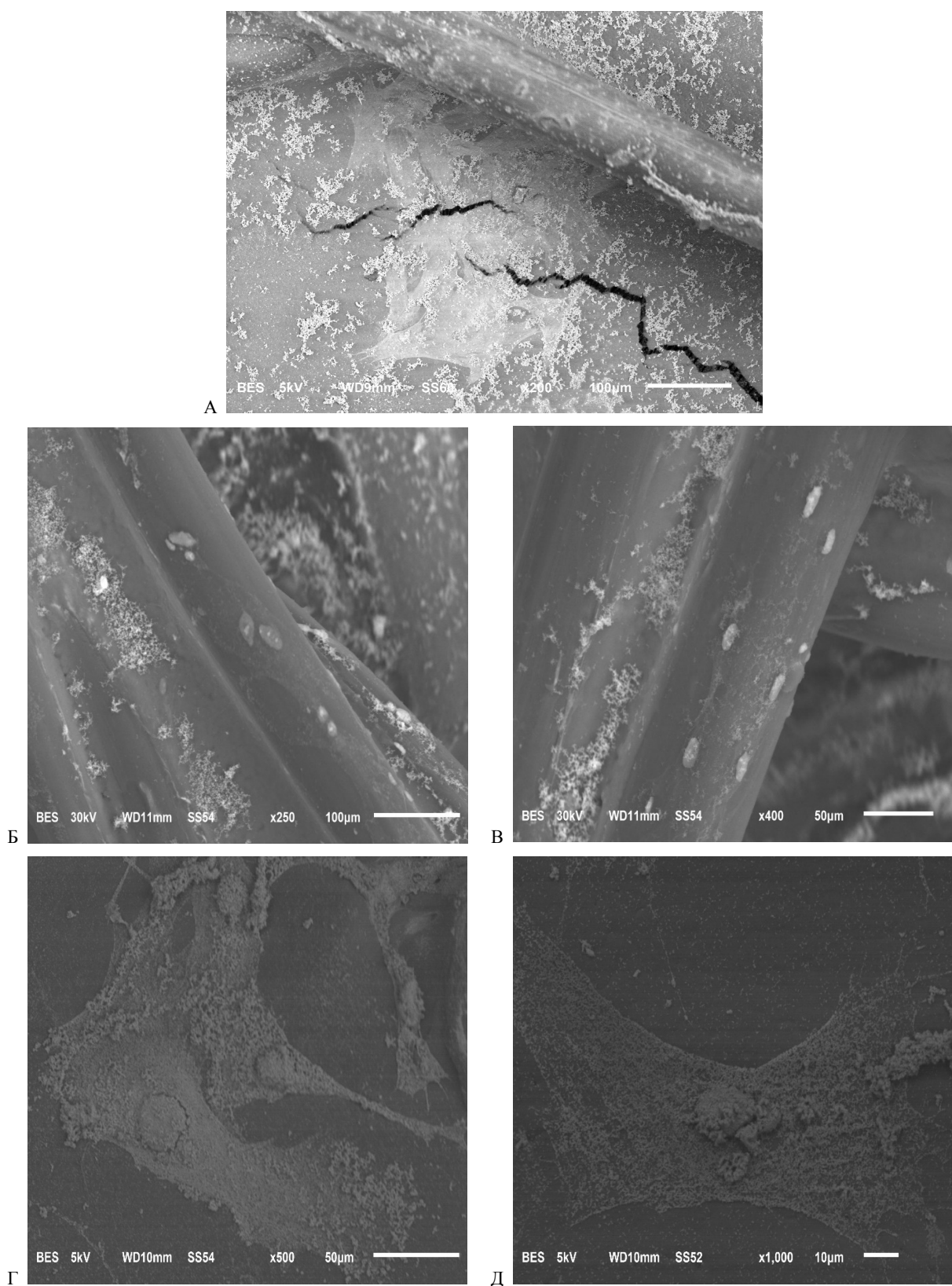


Рис. Микрофотография при электронной микроскопии поверхности сетчатого эндопротеза «Унифлекс стандартный». СЭМ: А – без предварительной обработки протеза (ув. $\times 200 \times 10^6$); Б – с обработкой поликапролактоном (ув. $\times 250 \times 10^6$); В – с обработкой поликапролактон + низкотемпературная плазма (ув. $\times 400 \times 10^6$); Г – с обработкой поликапролактоном (ув. $\times 500 \times 10^6$); Д – с обработкой поликапролактон + низкотемпературная плазма (ув. $\times 400 \times 10^6$)

В группе «Унифлекс стандартный» с обработкой поликапролактон + низкотемпературная плазма также определялось прикрепление фибробластов к герниопротезу. При этом клетки преимущественно располагались поодиночке, имели округлую форму и локализовались только на прямых нитях, а в местах плетения отсутствовали (рис. В, Г). С учетом достаточного упорядоченного клеточного «рисунка» можно предположить, что клетки плотно фиксировались в местах насечек, полученных в результате обработки низкотемпературной плазмой. Такой способ обработки

синтетического материала подходит для исключительно стерильных условий, так как данные насечки могут служить местом локализации не только клеток соединительной ткани, но и бактерий.

При морфометрии клеток фибробластов, прикрепленных на нитях герниопротеза, было показано достоверное увеличение их количества после обработки поликапролактоном в 3,3 раза и в 3,4 раза с обработкой поликапролактон + низкотемпературная плазма по сравнению с группой «Унифлекс стандартный» (табл.).

Количественные показатели прикрепленных на нитях герниопротеза фибробластов

Экспериментальная группа	Количество клеток на поверхности нитей протеза
«Унифлекс Стандартный»	$1,5 \times 10^4 \pm 105,9$
«Унифлекс Стандартный» с обработкой поликапролактоном	$4,9 \times 10^4 \pm 376,3^*$
«Унифлекс Стандартный» с обработкой поликапролактон + низкотемпературная плазма	$5,1 \times 10^4 \pm 544,9^*$

* $p < 0,01$ по сравнению с группой «Унифлекс стандартный».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оба способа обработки синтетического материала сетки стимулируют хорошее прикрепление и пролиферацию фибробластов. Однако выбор метода модернизации должен быть определен в зависимости от конкретной хирургической цели и условий оперативного вмешательства.

Капельное нанесение поликапролактона позволяет увеличить потенциальную поверхность колонизации фибробластами поверхности модифицированного имплантата. Применение клеточных технологий в комбинации с усовершенствованием поверхности сетки, приводящей к улучшению тканевой реакции на нее, является логичным продолжением развития человеческих знаний в этой области. Обработка плазмой поверхности полимера позволяет нивелировать его гидрофобность и сделать доступной поверхность для клеточной колонизации. Фибробласты обладают способностью к прикреплению к модифицированной с помощью поликапролактона поверхности сетчатого герниопротеза.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Helgstrand F. National results after ventral hernia repair. *Danish medical journal*. 2016;63(7):B5258.
2. Quiroga-Centeno A.C. et al. Systematic review and meta-analysis of risk factors for Mesh infection following Abdominal Wall Hernia Repair Surgery. *The American Journal of Surgery*. 2022;224(1PtA):239–246. doi: 10.1016/j.amjsurg.2021.12.024.
3. Лазаренко В.А., Иванов С.В., Иванов И.С. и др. Биопсия кожи как метод определения показаний к превентивному эндопротезированию передней брюшной стенки.

Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2020;4:46–53. doi: 10.21626/vestnik/2020-4/06.

4. Thankam F.G., Palanikumar G., Fitzgibbons R.J., Agrawal D.K. Molecular mechanisms and potential therapeutic targets in incisional hernia. *Journal of Surgical Research*. 2019;236:134–143. doi: 10.1016/j.jss.2018.11.037.

5. Dydak K., Junka A., Nowacki G. et al. In Vitro Cytotoxicity, Colonisation by Fibroblasts and Antimicrobial Properties of Surgical Meshes Coated with Bacterial Cellulose. *International journal of molecular sciences*. 2022;23(9):4835. doi: 10.3390/ijms23094835.

6. Petter-Puchner A.H., Fortelny R.H., Gruber-Blum S. et al. The future of stem cell therapy in hernia and abdominal wall repair. *Hernia*. 2015;19(1):25–31. doi: 10.1007/s10029-014-1288-7.

7. Stastna E., Castkova K., Rahel J. Influence of hydroxyapatite nanoparticles and surface plasma treatment on bioactivity of polycaprolactone nanofibers. *Polymers*. 2020;12(9):1877. doi: 10.3390/polym12091877.

8. Bolbasov E.N., Antonova L.V., Matveeva V.G. et al. Effect of radio frequency discharge plasma on surface properties and biocompatibility of polycaprolactone matrices. *Biomeditsinskaya khimiia*. 2016;62(1):56–63. doi: 10.18097/PBMC20166201056.

9. Турчин В.В., Солопов М.В., Жихарев Д.В. и др. Адгезия и жизнеспособность фетальных фибробластов человека, культивируемых на 3-печатном матрикс из полипролактона. *Вестник неотложной и восстановительной хирургии*. 2020;5(1):134–143. EDN: AVAUBO.

10. Берещенко В.В., Надыров Э.А., Лызииков А.Н. и др. Модифицированный полипропиленовый эндопротез для герниопластики: экспериментальная оценка эффективности его применения. *Проблемы здоровья и экологии*. 2019;1(59):107–112.

REFERENCES

1. Helgstrand F. National results after ventral hernia repair. *Danish medical journal*. 2016;63(7):B5258.
2. Quiroga-Centeno A.C. et al. Systematic review and meta-analysis of risk factors for Mesh infection following Abdominal Wall Hernia Repair Surgery. *The American Journal of Surgery*. 2022;224(1PtA):239–246. doi: 10.1016/j.amjsurg.2021.12.024.
3. Lazarenko V.A., Ivanov S.V., Ivanov I.S., et al. Skin biopsy as a method of determining indications for preventive anterior abdominal wall replacement. *Kurskii nauchno-prakticheskii vestnik "Chelovek i ego zdorov'e" = Kursk scientific and practical bulletin "Man and his health"*. 2020;4:46–53. (In Russ.) doi: 10.21626/vestnik/2020-4/06.
4. Thankam F.G., Palanikumar G., Fitzgibbons R.J., Agrawal D.K. Molecular mechanisms and potential therapeutic targets in incisional hernia. *Journal of Surgical Research*. 2019;236:134–143. doi: 10.1016/j.jss.2018.11.037.
5. Dydak K., Junka A., Nowacki G. et al. In Vitro Cytotoxicity, Colonisation by Fibroblasts and Antimicrobial Properties of Surgical Meshes Coated with Bacterial Cellulose. *International journal of molecular sciences*. 2022;23(9):4835. doi: 10.3390/ijms23094835.
6. Petter-Puchner A.H., Fortelny R.H., Gruber-Blum S. et al. The future of stem cell therapy in hernia and abdominal wall repair. *Hernia*. 2015;19(1):25–31. doi: 10.1007/s10029-014-1288-7.
7. Stastna E., Castkova K., Rahel J. Influence of hydroxyapatite nanoparticles and surface plasma treatment on bioactivity of polycaprolactone nanofibers. *Polymers*. 2020;12(9):1877. doi: 10.3390/polym12091877.
8. Bolbasov E.N., Antonova L.V., Matveeva V.G. et al. Effect of radio frequency discharge plasma on surface properties and biocompatibility of polycaprolactone matrices. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2016;62(1):56–63. doi: 10.18097/PBMC201662010569.
9. Turchyn V.V., Solopov M.V., Zhiharev D.V. et al. Adhesion and viability of human fetal fibroblasts cultured on 3d printed polycaprolactone matrix. *Vestnik neotlozhnoi i vosstanovitel'noi khirurgii = Bulletin of Emergency and Restorative Surgery*. 2020;(1):134–143. (In Russ.).
10. Bereshchenko V.V., Nadyrov E.A., Lyzikov A.N. and others. Modified polypropylene endoprosthesis for hernioplasty: experimental evaluation of its effectiveness. *Problemy zdorov'ya i ekologii = Health and ecology issues*. 2019;1(59):107–112. (In Russ.).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Информация об авторах

Илья Сергеевич Иванов – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой хирургических болезней № 1, Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия; [✉]ivanov.is@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4408-961X>
Александр Александрович Ушанов – аспирант кафедры хирургических болезней № 1, Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-0876-0656>

Екатерина Сергеевна Мишина – кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии, заведующая лабораторией морфологии и клеточных технологий, Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-3835-0594>

Владислав Александрович Плотников – студент 4-го курса лечебного факультета, Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Александра Руслановна Бобкова – студентка 4-го курса лечебного факультета, Курский государственный медицинский университет Курск, Россия

Кирилл Сергеевич Толкачев – ординатор кафедры травматологии и ортопедии, Курский государственный медицинский университет Курск, Россия; <https://orcid.org/0009-0008-3822-1817>

Статья поступила в редакцию 27.03.2023; одобрена после рецензирования 21.06.2023; принята к публикации 14.08.2023.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Information about the authors

Ilya S. Ivanov – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Surgical Diseases No. 1, Kursk State Medical University, Kursk, Russia; [✉]ivanov.is@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4408-961X>

Alexander A. Ushanov – Postgraduate student of the Department of Surgical Diseases No. 1, Kursk State Medical University, Kursk, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-0876-0656>

Ekaterina S. Mishina – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Histology, Embryology, Cytology, Head of the Laboratory of Morphology and Cell Technologies, Kursk State Medical University, Kursk, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-3835-0594>

Vladislav A. Plotnikov – 4th year student of the Faculty of Medicine, Kursk State Medical University, Kursk, Russia; почта

Alexandra R. Bobkova – 4th year Medical Faculty student, Kursk State Medical University Kursk, Russia

Kirill S. Tolkachev – Resident of the Department of Traumatology and Orthopedics, Kursk State Medical University Kursk, Russia; <https://orcid.org/0009-0008-3822-1817>

The article was submitted 27.03.2023; approved after reviewing 21.06.2023; accepted for publication 14.08.2023.