

УДК: 616-089.819.843-77:615.461

## СТИМУЛЯЦИЯ АНГИОГЕНЕЗА МАТРИЦАМИ ИЗ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА, СОДЕРЖАЩИМИ VEGF

В. В. СЕВОСТЬЯНОВА, Г. Ю. ВАСЮКОВ, В. В. БОРИСОВ, А. Ю. БУРАГО,  
Ю. Н. ФОРМОКИДОВА, А. С. ГОЛОВКИН

*Федеральное государственное бюджетное учреждение*

*«Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»  
Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Кемерово, Россия*

**Цель.** Оценить выраженность ангиогенеза в месте имплантации матриц из поликапролактона (PCL), содержащих молекулы VEGF, в эксперименте *in vivo*.

**Материалы и методы.** Матрицы изготавливали из PCL методом электроспиннинга. Инкорпорирование молекул VEGF в PCL матрицы осуществляли с помощью двухфазного электроспиннинга. Поверхностную структуру всех матриц изучали методом сканирующей электронной микроскопии. Определение динамики выхода ростового фактора из полимерных волокон проводили иммуноферментным анализом. Для оценки биологических свойств PCL и PCL+VEGF матриц их имплантировали внутрибрюшинно крысам породы Wistar ( $n=60$ ) сроком на 2, 3 и 4 месяца с последующим проведением гистологических и гистохимических исследований.

**Результаты.** Исследование показало, что структура PCL матриц значительно меняется после введения в их состав VEGF. Кроме того, был продемонстрирован длительный контролируемый выход молекул ростового фактора из матриц, а также сохранение их биологической активности, о чем свидетельствовало увеличение количества капилляров на матрицах с VEGF по сравнению с контролем после имплантации мелким лабораторным животным.

**Заключение.** В работе было показано, что матрицы из поликапролактона с VEGF обладают более выраженным проангиогенным эффектом, чем матрицы без ростового фактора. Это делает возможным их применение в тканевой инженерии *in vivo*.

**Ключевые слова:** поликапролактон, сосудистый эндотелиальный фактор роста, электроспиннинг, тканевая инженерия.

## POLYCAPROLACTONE SCAFFOLDS CONTAINING VEGF FOR ANGIOGENESIS STIMULATION

V. V. SEVOSTYANOVA, G. YU. VASUKOV, V. V. BORISOV, A. YU. BURAGO,  
YU. N. FORMOKIDOVA, A. S. GOLOVKIN

*Federal State Budgetary Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular diseases,  
Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Kemerovo, Russia*

**Purpose.** To evaluate the local angiogenesis stimulation by polycaprolactone (PCL) scaffolds with VEGF *in vivo*.

**Materials and methods.** PCL scaffolds were fabricated using electrospinning method. For the encapsulation of VEGF into PCL scaffold a two phase electrospinning was used. The scaffolds structure was examined by scanning electron microscopy. Growth factor release dynamic was assessed by ELISA. For evaluation of biological properties, the PCL and PCL+VEGF scaffolds were implanted in Wistar rat abdominal wall ( $n=60$ ) for 2, 3 and 4 months. The explanted samples were examined by histological and immunohistochemical analyses.

**Results.** The study showed that PCL fiber diameters in the scaffolds have changed after VEGF encapsulation. Moreover, long-term controlled release of growth factor was demonstrated. In addition, we have also shown the preservation of PCL+VEGF scaffolds biological activity; this was evidenced by increase of the number of capillaries on scaffolds with VEGF compared to control samples after implantation in rats.

**Conclusion.** This study showed that the PCL scaffold with VEGF has pro-angiogenic potential in comparison with pure scaffolds and can potentially be used for the tissue engineering *in vivo*.

**Key words:** polycaprolactone, vascular endothelial growth factor, electrospinning, tissue engineering.

### Введение

Обычной реакцией организма при контакте с имплантированным биоматериалом является процесс репарации, а не регенеративное восстановление тканей [1]. Это связано с тем, что репарация направлена на быстрое восстановление

функций поврежденных органов и при этом не происходит формирования структур, имитирующих свойства нативной ткани. Такой репаративный ответ организма может быть причиной осложнений, например, при имплантации сосудистых протезов и тканеинженерных графтов для регенерации *in vivo* [2].

Использование таких биологически активных молекул, как ростовые факторы, является многообещающим подходом в решении данной проблемы [3]. Потенциально пригодным для привлечения эндотелиальных клеток, стимуляции ангиогенеза и регенерации тканей является сосудистый эндотелиальный фактор роста (vascular endothelial growth factor (VEGF)). VEGF представляет собой ключевой регулятор ангиогенеза при физиологических и патологических состояниях, поскольку является потенциальным митогеном для эндотелиальных клеток, индуцирующим их миграцию и пролиферацию через ряд интегриновых рецепторов [4]. При этом необходима локальная доставка ростового фактора в зону повреждения. Это обусловлено тем, что оральное введение неприемлемо из-за низкой биодоступности в результате ферментативного расщепления молекул ростового фактора и их плохой абсорбции, а внутривенное введение неэффективно по причине короткого периода полувыведения из плазмы [5, 6]. Самым простым способом для местной доставки биомолекул в место имплантации является предварительная инкубация биоматериала в растворе, содержащем необходимое вещество. Однако такой подход не позволяет осуществлять контроль над доставкой, которая в значительной степени зависит от среды в месте имплантации и состояния пациента [7].

Другим подходом является химическая иммобилизация биомолекул на поверхности, чтобы обеспечить непосредственное взаимодействие клеток со стимуляторами роста. Однако здесь возникают проблемы, связанные с сохранением механизма действия молекул после их химического прикрепления к биоматериалу, а именно экранирование и конформационные изменения сайтов связывания с рецептором [8]. Несколько перспективных попыток было проведено для иммобилизации белков на поверхности биоматериала. Кроме того, было показано, что введение промежуточных молекул между поверхностью материала и прикрепляемыми белковыми молекулами может способствовать сохранению их биологической активности [9, 10].

Подходом, который способен обеспечивать регуляцию местной доставки биомолекул, является использование тканеинженерных матриц с инкорпорированным ростовым фактором, который выделяется из матрицы после имплантации [11, 12]. Наиболее перспективным биodeградируемым полимером для создания тканеинженерных кровеносных сосудов, а также матриц, способствующих васкуляризации тканей в зонах ишемии,

на наш взгляд, является синтетический материал поликапролактон (ε-polycaprolactone (PCL)). Этот биорезистентный полимер достаточно прочный и эластичный, кроме того, он обладает длительным периодом биodeградации с образованием нетоксичных продуктов [13]. В данной работе для создания тканеинженерных матриц с VEGF был использован метод двухфазного электроспиннинга. Данный метод позволяет вводить биологические молекулы и лекарственные средства в состав полимерного волокна [14].

Таким образом, целью исследования *in vivo* явилась оценка выраженности ангиогенеза в месте имплантации матриц из поликапролактона (PCL), содержащих молекулы VEGF, в эксперименте *in vivo*.

### Материалы и методы

*Материал.* Для изготовления тканеинженерных матриц использовали биodeградируемый полимер – поликапролактон (Sigma-Aldrich, США). В работе использовали рекомбинантный сосудистый эндотелиальный фактор роста (R&D System, США) для инкорпорирования в полимерную матрицу.

*Изготовление тканеинженерных матриц.* PCL матрицы без ростового фактора изготавливали методом электроспиннинга при следующих параметрах процесса: концентрация полимера в хлороформе – 14 %, напряжение – 15 kV, скорость потока раствора – 1 мл/ч, расстояние между иглой и коллектором – 15 см. Для инкорпорирования в PCL матрицу молекул VEGF использовали метод двухфазного электроспиннинга. При этом 14 %-ный раствор полимера в хлороформе тщательно смешивали с ростовым фактором, лиофилизированном в фосфатно-солевом буфере (Gibco, США) до концентрации 1 мкг/мл, в соотношении 20:1 и далее проводили электроспиннинг при параметрах, описанных выше.

Перед экспериментами по оценке кинетики выхода ростового фактора и имплантации матриц лабораторным животным все образцы обрабатывали 70 %-ным раствором этилового спирта в течение 10 мин и далее отмывали физиологическим раствором – 15 мин.

*Оценка структуры матриц.* Исследование морфологии матриц и диаметра волокон выполняли перед имплантацией образцов лабораторным животным. Все образцы PCL и PCL+VEGF покрывали золотым токопроводящим напылением толщиной в 30 нм и далее изучали на сканирующем электронном микроскопе S3400N (Hitachi, Япония).

Отдельные волокна PCL+VEGF изучали на световом микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия).

*Кинетика выхода ростового фактора из матриц.* Для оценки высвобождения ростовых факторов из структуры полимера в процессе его деградации образцы PCL матриц с VEGF ( $1 \times 2 \text{ см}^2$ ) ( $n=5$ ) помещали в пробирки с фосфатно-солевым буфером объемом 1,5 мл и инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  и 5 %  $\text{CO}_2$ . Через установленные промежутки времени (12 ч, 24 ч, 48 ч и далее через каждые 48 ч) в течение 80 суток из каждой пробирки отбирали 200 мкл раствора и восстанавливали исходный объем свежим буфером. В собранных образцах определяли количественное содержание ростового фактора с использованием наборов для иммуноферментного анализа VEGF (R&D System, США). Измерение проводили на планшетном спектрофотометре Униплан (Пикон, Россия).

*Оценка биологических свойств PCL матриц, содержащих VEGF, in vivo.* Для оценки биологической активности инкорпорированного VEGF и реакции тканей матрицы PCL и PCL+VEGF имплантировали внутрибрюшинно самцам крыс породы Wistar (250–300 г) ( $n=60$ ). Предварительно животных вводили в наркоз внутрибрюшинной инъекцией этионала натрия – 30 мг/кг. После антисептической обработки операционного поля проводили срединную лапаротомию. Каждой крысе к внутренней стороне брюшной стенки подшивали матрицу из PCL или PCL+VEGF размером  $1 \times 2 \text{ см}^2$ . Далее ушивали брюшную стенку.

Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде на рационе питания, соответствующем нормативам ГОСТа. Эксперимент выполнялся в соответствии с правилами гуманного обращения с животными, которые регламентированы «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755). Через 2, 3 и 4 месяца животных выводили из эксперимента. Состояние полимерных матриц и окружающих тканей оценивали гистологически с окраской гематоксилин-эозином и с помощью гистохимической окраски с антителами к CD31 (Spring Bioscience, США).

*Статистические методы.* Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Нормальность распределения оценивали при помощи критерия Колмогорова – Смирнова. Достоверность различий определяли с помощью непараметрического

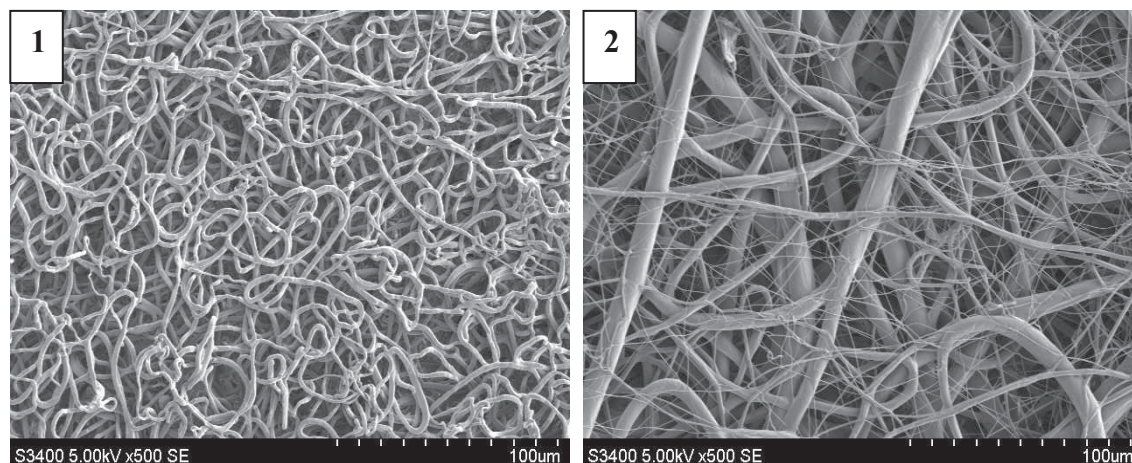
критерия Манна – Уитни, а также непараметрического дисперсионного анализа Краскела – Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартного отклонения, а также медианы и 25-й и 75-й процентиля.

### Результаты и обсуждение

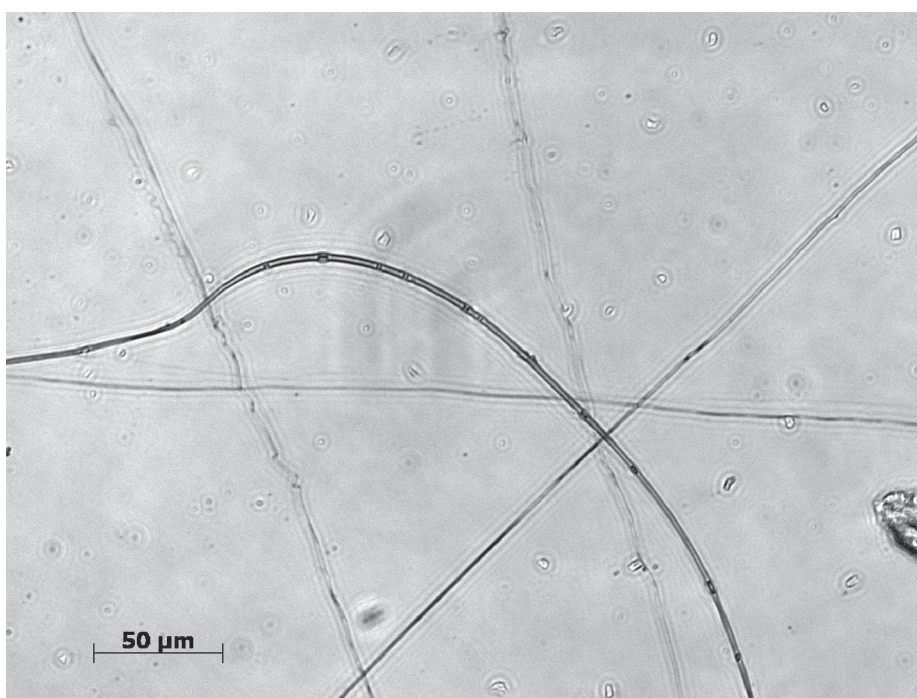
Как известно, VEGF является ключевым медиатором ангиогенеза, так как он стимулирует деление эндотелиальных клеток, их миграцию и прорастание, благодаря up-регуляции интегриновых рецепторов [15]. Возможно, что медленное контролируемое высвобождение ангиогенного ростового фактора в течение длительного периода будет способствовать регенерации тканей. Ранее нами была показана возможность инкорпорирования биологически активных молекул в структуру полимерных биodeградируемых матриц [16]. Настоящее исследование направлено на оценку способности тканеинженерных матриц из поликапролактона, содержащих VEGF, стимулировать ангиогенез и регенерацию тканей. Изготовление матриц с VEGF осуществляли методом двухфазного электроспиннинга, который позволяет получать тонкие волокна с инкорпорированными биологическими молекулами и лекарственными препаратами.

Оценка морфологии PCL матриц с использованием сканирующей электронной микроскопии показала, что все образцы состояли из хаотично переплетенных полимерных волокон. При этом волокна PCL матриц были равномерными по толщине и не имели выраженных дефектов. Средний диаметр волокон составил  $2,521 \pm 0,490 \text{ мкм}$ . Матрицы, содержащие VEGF, в свою очередь, были образованы волокнами, значительно варьирующимися по диаметру от 0,142 до 10,714 мкм (рис. 1). Исследование полимерных волокон с помощью световой микроскопии подтвердило наличие вкраплений ростового фактора в образцах, полученных методом двухфазного электроспиннинга (рис. 2). Появление в PCL матрицах после инкорпорирования молекул VEGF волокон, имеющих наноразмеры, вероятно, связано с увеличением проводимости и диэлектрической проницаемости в результате введения водной фазы в раствор полимера перед проведением электроспиннинга [17].

Кинетику выхода молекул VEGF из матриц изучали в течение 80 дней, поскольку этот период наиболее важен для того, чтобы стимулировать ангиогенез и направить процесс, происходящий в тканях в результате взаимодействия с чужеродным материалом, в сторону регенерации [18, 19].



*Рис. 1. Изображения сканирующей электронной микроскопии:  
1 – PCL матрица методом электроспиннинга,  
2 – PCL матрица с VEGF методом двухфазного электроспиннинга*



*Рис. 2. Изображение световой микроскопии. Волокно PCL с инкорпорированными молекулами VEGF*

Кроме того, известно, что эндотелизация кровеносных протезов также происходит в первые месяцы после имплантации. Полученные результаты показали, что выход ростового фактора из матрицы происходил на протяжении всего эксперимента, при этом за 80 дней из матрицы выделилось 265,94 пг VEGF (рис. 3). Начиная с четвертых суток исследования, выделение ростового фактора в раствор осуществлялось с относительно постоянной скоростью –  $15,039 \pm 1,409$  пг в четыре дня. В данном эксперименте получено количество VEGF, выделившегося из матрицы в процессе деградации полимера, поскольку предварительно

образцы отмывали от ростового фактора, оставшегося на поверхности волокон после проведения электроспиннинга. Медленный выход VEGF обусловлен низкой скоростью деградации полимера. Тем не менее такая кинетика высвобождения биомолекул способна обеспечить пролонгированную доставку ростового фактора в место имплантации. Кроме того, длительный период деградации полимера и медленное высвобождение вещества в окружающие ткани снижают риск быстрого выделения большой дозы ростового фактора и в случае сосудистых графтов, последующих системных побочных эффектов при попадании в кровь.

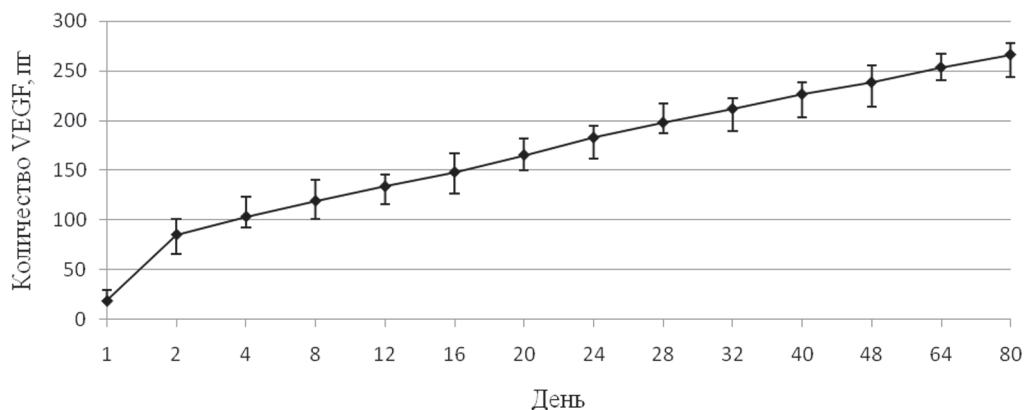


Рис. 3. Кинетика выхода VEGF из волокон PCL в течение 80 дней (25% < M < 75%)

Влияние матриц на ткани, а также их способность стимулировать ангиогенез изучали в данной работе при помощи имплантации полимерных образцов из PCL и PCL+VEGF внутрибрюшинно крысам на срок 2, 3 и 4 месяца. Макроскопическое исследование матриц, имплантированных внутрибрюшинно крысам, показало прорастание образцов капиллярной сетью во всех точках эксперимента.

При гистологическом исследовании тканеинженерных матриц и окружающих их тканей обнаружено, что все образцы инфильтрированы грануляционной тканью с гигантскими многоядерными клетками, ядра которых расположены в виде колец (рис. 4). Это гигантские многоядерные клетки инородных тел, являющиеся реакцией организма на чужеродный материал. Ко второму месяцу в обеих группах вокруг матриц наблюдали образование капсул из соединительной ткани. При этом образование зрелой плотной соединительной тка-

ни происходило на четвертом месяце только на матрицах, содержащих ростовой фактор. Результаты гистологического анализа свидетельствовали об умеренном воспалении во всех исследуемых образцах в результате физиологической реакции организма на чужеродное тело. Признаков острого воспаления не было отмечено ни в одном из случаев.

Гистохимическое исследование образцов к CD31 проводили для оценки количества капилляров по окрашиванию эндотелиальных клеток, образующих стенки мелких кровеносных сосудов. Результаты показали значительное увеличение количества капилляров (на 1 мм<sup>2</sup>) на матрицах с VEGF по сравнению матрицами из чистого поликапролактона в каждой временной точке эксперимента. При этом уже через 3 месяца на матрицах, содержащих VEGF, обнаружены кровеносные сосуды диаметром больше диаметра капилляра. Кроме того, в матрицах, содержащих VEGF, наблюда-

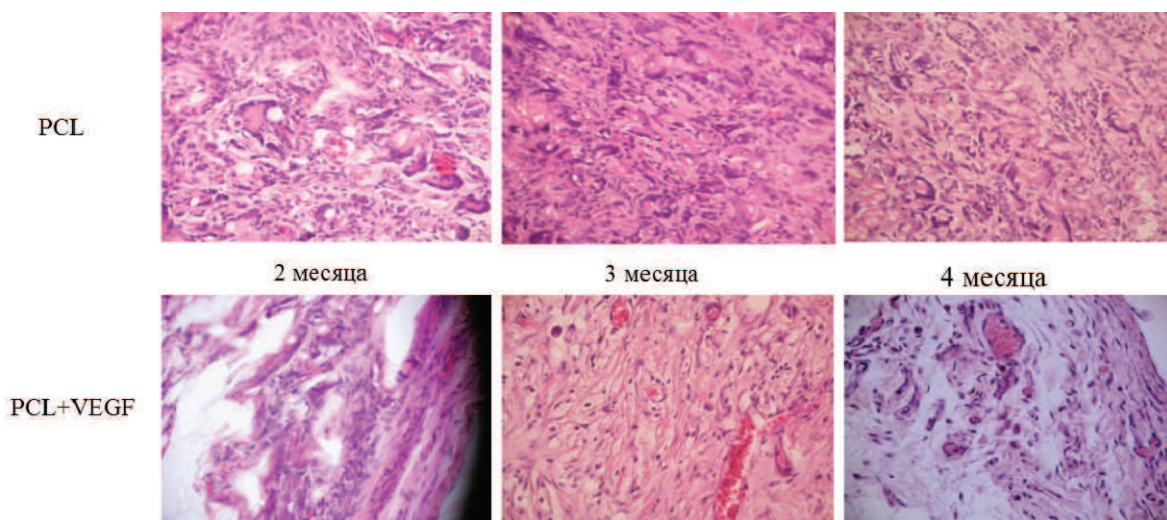
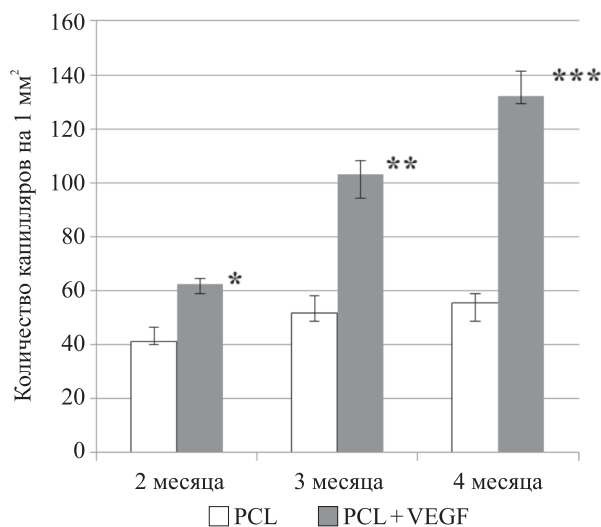


Рис. 4. PCL и PCL+VEGF матрицы, имплантированные внутрибрюшинно крысам, через 2, 3 и 4 месяца после имплантации. Окр. гематоксилин-эозином. Ув. ×200

ли достоверное увеличение количества капилляров на протяжении 4 месяцев ( $p < 0,05$ ). В свою очередь, дисперсионный анализ не показал различий по количеству капилляров в матрицах без ростового фактора между 2, 3 и 4 месяцами исследования.

Полученные данные демонстрируют, что введение в тканеинженерную матрицу из PCL молекул VEGF приводит к активному привлечению эндотелиальных клеток и увеличению количества кровеносных сосудов на поверхности полимерного материала и в прилегающих тканях. Кроме того, достоверное увеличение количества капилляров на матрицах, содержащих VEGF, на протяжении четырех месяцев также подтверждает сохранение биологической активности ростового фактора после выхода из полимерных волокон в окружающие ткани. Благодаря этому, PCL может быть использован для изготовления тканеинженерных матриц, которые будут служить не только каркасом для выращиваемого органа, но также и системой доставки ростовых факторов в зону регенерации [20]. В свою очередь, использование VEGF в PCL матрицах в качестве биологически активных молекул способствует

значительному повышению ангиогенеза в месте имплантации материала.

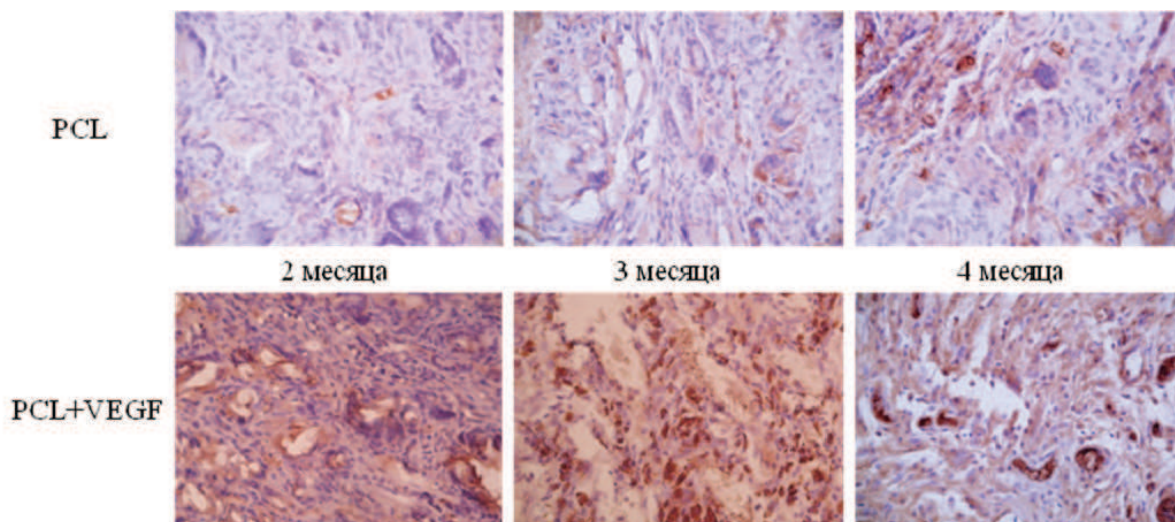


\*  $p < 0,05$  относительно матриц PCL через 2 месяца

\*\*  $p < 0,05$  относительно матриц PCL через 3 месяца

\*\*\*  $p < 0,05$  относительно матриц PCL через 4 месяца

**Рис. 5.** Количество капилляров на PCL и PCL+VEGF матрицах, имплантированных внутрибрюшинно, через 2, 3 и 4 месяца ( $25\% < M < 75\%$ )



**Рис. 6.** Внутрибрюшинная имплантация PCL+VEGF графта. Гистохимическая окраска с антителами к CD31. Ув.  $\times 200$

### Заключение

Таким образом, тканеинженерные матрицы из PCL+VEGF, изготовленные методом двухфазного электроспиннинга, способны обеспечивать местную контролируемую доставку ростового фактора и могут быть имплантированы в места, нуждающиеся в стимуляции ангиогенеза при различных патологических состояниях. Кроме того, поскольку такие матрицы обладают свойством активировать и привлекать на свою поверхность эндотели-

альные клетки, они могут быть использованы для создания тканеинженерных сосудистых графтов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Anderson J. M., Rodriguez A., Chang D. T. Foreign body reaction to biomaterials // *Seminars in Immunology*. 2008. Vol. 20(2). P. 86–100.
2. Acute thrombogenicity and 4 weeks healing properties of a new stretch-ePTFE graft / H. Parsson [et al.] // *European Journal of Vascular Surgery*. 1993. Vol. 7(1). P. 63–70.
3. Lee K., Silva E. A., Mooney D. J. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review

of recent developments // J. R. Soc. Interface. 2011. Vol. 8. P. 153–170.

4. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy / S. Shinkaruk [et al.] // Curr. Med. Chem. Anticancer Agents. 2003. Vol. 3. P. 95–117.

5. Han K., Choi M., Chung Y. Site-specific degradation and transport of recombinant human epidermal growth factor (rhEGF) in the rat gastrointestinal mucosa // Int. J. Pharm. 1998. Vol. 168. P. 189–197.

6. Bastian S. E., Walton P. E., Belford D. A. Transport of circulating IGF-I and LR3IGF-I from blood to extracellular wound fluid sites in rats // J. Endocrinol. 2000. Vol. 164. P. 77–86.

7. Enhancement of bone ingrowth by transforming growth factor- $\beta$  / D. R. Sumner [et al.] // J. Bone Joint Surg. 1995. Vol. 77A. P. 1135–1147.

8. Rao S. V., Anderson K. W., Bachas L. G. Oriented immobilization of proteins // Microchimica Acta. 1998. Vol. 128(3). P. 127–143.

9. Ikada Y. Surface modification of polymers for medical applications // Biomaterials. 1994. Vol. 15(10). P. 725–736.

10. Sharon J. L., Puleo D. A., Immobilization of glycoproteins, such as VEGF, on biodegradable substrates // Acta Biomaterialia. 2008. Vol. 4(4). P. 1016–1023.

11. Greisler H. P. Growth factor release from vascular grafts // Journal of Controlled Release. 1996. Vol. 39(2–3). P. 267–280.

12. In vitro release of dexamethasone or bFGF from chitosan/hydroxyapatite scaffolds / R. S. Tigli [et al.] // Journal

of Biomaterials Science, Polymer Edition. 2009. Vol. 20(13). P. 1899–1914.

13. Sahoo R., Sahoo S., Nayak P. Synthesis and characterization of polycaprolactone – gelatin nanocomposites for control release anticancer drug paclitaxel // European Journal of Scientific Research. 2011. Vol. 48(3). P. 527–537.

14. Electrospun biphasic drug release polyvinylpyrrolidone/ethyl cellulose core/sheath nanofibers / D. G. Yu [et al.] // Acta Biomaterialia. 2013. Vol. 9. P. 5665–5672.

15. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer // Oncology. 2005. Vol. 69. P. 4–10.

16. Свойства тканеинженерных матриц из поликапролактона, импрегнированных ростовыми факторами VEGF и bFGF / В. В. Севостьянова [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2012. Т. 7, № 4. С. 62–67.

17. An introduction to electrospinning and nanofibers / S. Ramakrishna [et al.]. Singapore: World Scientific, 2005. 382 p.

18. Therapeutic angiogenesis in chronically ischemic porcine myocardium: comparative effects of bFGF and VEGF / G. C. Hughes [et al.] // Ann. Thorac. Surg. 2004. Vol. 77. P. 812–818.

19. Attanasio S., Snell J. Therapeutic angiogenesis in the management of critical limb ischemia: current concepts and review // Cardiol. Rev. 2009. Vol. 17. P. 115–120.

20. Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering / M. Sokolsky-Papkov [et al.] // Advanced Drug Delivery Reviews. 2007. Vol. 59. P. 187–206.

Статья поступила 29.10.2013

Ответственный автор за переписку:

**Севостьянова Виктория Владимировна** –  
младший научный сотрудник лаборатории клеточных  
технологий ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН

Адрес для переписки:

Севостьянова В. В., 650002,  
г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6  
Тел: 8 (3842) 64-46-50  
E-mail: sevostv@gmail.com

Corresponding author:

**Victoria V. Sevostyanova** –  
junior research associate of cellular technologies laboratory  
of FSBI RI for CICVD, SB RAMS

Correspondence address:

V. V. Sevostyanova, 6, Sosnoviy blvd.,  
Kemerovo, 650002  
Tel.: +7 (3842) 64-46-50  
E-mail: sevostv@gmail.com