

УДК 576.3:577.12

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БИОРЕЗОРБЦИИ КЛЕТОЧНЫХ И БЕСКЛЕТОЧНЫХ МАТРИКСОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИОКСИАЛКАНОАТОВ И ПОЛИКАПРОЛАКТОНА, ПОТЕНЦИАЛЬНО ПРИГОДНЫХ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ГИБРИДНОГО СОСУДИСТОГО ГРАФТА МАЛОГО ДИАМЕТРА

Л. В. АНТОНОВА, А. Ю. БУРАГО, В. Г. МАТВЕЕВА, Я. Г. ТОРОПОВА,
Е. А. ВЕЛИКАНОВА, Ю. А. КУДРЯВЦЕВА, М. В. НАСОНОВА, А. С. ГОЛОВКИН

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

Цель. Изучить влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (ММСК КМ) на скорость биодеградации сополимерных композиций из полиоксиалканоатов и поликапролактона, потенциально пригодных для создания сосудистого графта.

Материалы и методы. В работе использованы: пленочный матрикс (ПМ) № 1 на основе 5 % полигидроксибутирата с валератом (ПГБВ) и 10 % поликапролактона (PCL) и ПМ № 2 на основе 7,5 % ПГБВ и 10 % PCL. ММСК КМ получали путем выделения костного мозга из бедренных костей крыс линии Wistar.

Результаты. В ходе эксперимента выявлено, что ПМ № 2 начал резорбироваться на два месяца раньше, чем ПМ № 1, за счет большей доли ПГБВ.

Выводы. Наличие ММСК КМ отодвигало начало биорезорбции сополимерных матриксов на месяц с параллельным сокращением продолжительности воспалительной реакции со стороны окружающих тканей.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, биополимеры, время биодеградации.

COMPARING BIORESORPTION OF PLAIN AND CELL-LOADED POLYHYDROXYALKANOATE AND POLYCAPROLACTONE SCAFFOLDS POTENTIALLY SUITABLE FOR SMALL HYBRID VASCULAR GRAFTS PRODUCTION

L. V. ANTONOVA, A. Y. BURAGO, V. G. MATVEEVA, Y. G. TOROPOVA,
E. A. VELIKANOVA, Y. A. KUDRYAVTSEVA, M. V. NASONOVA, A. S. GOLOVKIN

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

Purpose. The study was aimed at evaluating the impact of multipotent mesenchymal stromal cells derived from the marrow (MMSC) on the biodegradation speed of polyhydroxyalkanoate and polycaprolactone copolymer compositions potentially suitable for small vascular graft production.

Materials and methods. The study compared film scaffold (FS) № 1 made from 5 % polyhydroxybutirate and valerate and 10 % polycaprolactone (PCL) and film scaffold (FS) № 2 made from 7,5 % polyhydroxybutirate and valerate and 10 % PCL. MMSC were derived from Wistar rat femoral bones.

Results. The experiment showed that FS № 2 resorption started 2 months earlier than that of FS № 1 due to higher percentage of polyhydroxybutirate and valerate.

Conclusions. The presence of MMSC delayed the start of copolymer scaffold bioresorption for 1 month and reduced the duration inflammatory response in the surrounding tissues.

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells, biopolymers, biodegradation time.

Введение

Биодеградируемые полимеры широко применяются в клеточной трансплантологии и тканевой инженерии [4, 6, 11]. На их основе создаются шовные материалы, трансплантаты для восстановления хрящевой, костной ткани и кожи. Ведутся разработки по созданию сосудистых протезов. Однако в каждом случае выбор полимера обусловлен сроком его

биодеградации, который должен быть достаточным для завершения регенерации или воссоздания органа. Так, для создания сосудистого графта пригодны гемосовместимые биополимеры, скорость биодеградации которых не должна быть меньше 2–3 лет. Именно за это время на месте биорезорбируемого сосудистого графта формируется новый собственный сосуд.

Полигидроксиалканоаты – линейные полимеры, получаемые микробиологическим путем при бактериальной ферментации сахаров или липидов. В силу особенностей биосинтеза материалов этой группы существует возможность получения широкого спектра значений скорости деградации и механических параметров, что позволяет применять полиоксиданты в различных областях медицинской науки и практики [1].

Поликапролактон – полимер, обладающий малой скоростью гидролиза эфирной связи. Продукты гидролиза поликапролактона утилизируются макрофагами и глиальными клетками с возможным возникновением воспалительной реакции. Однако в настоящее время существует ряд экспериментальных работ, доказывающих пригодность поликапролактона в качестве основы для создания сосудистых графтов [5, 6, 7].

При этом в случае заселения внутренней поверхности графта функционально активными клетками (мультипотентными мезенхимальными стромальными или эндотелиальными) необходимо иметь четкую уверенность, что культивирование подобных клеточных типов не повлияет на скорость биодеградации сополимерного каркаса. Вместе с тем различные типы клеток обладают специфическими функциональными свойствами и в процессе своей жизнедеятельности синтезируют массу биоактивных веществ, способных оказывать влияние на некоторые характеристики полимерных конструкций.

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) способны секретировать как компоненты внеклеточного матрикса (фибронектин, коллаген, протеогликаны, ламинин) [3, 9, 10], так и комплекс цитокинов с противовоспалительным и антиапоптотическим действием и хемокинов, участвующих в поддержании гемопоэза (ИЛ1, ИЛ6, ИЛ7, ИЛ8, ИЛ11, факторы роста стволовых клеток и гепатоцитов, макрофагальный, сосудисто-эндотелиальный, гранулоцитарно-макрофагальный) [2, 8, 9]. Известен также хоуминг-эффект ММСК, реализующийся через выработку цитокина SDF-1 [10].

Взаимодействие в системе «функционально активная клетка – клеточный носитель» реализуется через иммунологические механизмы внутри организма. Метаболизм клетки способен вносить серьезные изменения в процессы резорбции клеточного носителя. Однако, несмотря на широкий интерес к биодеградируемым полимерам, вопрос влияния функционально активных клеточных типов на скорость резорбции полимеров остается до конца неизученным.

Цель исследования

Изучить влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на скорость биодеградации сополимерных композиций из полиоксидантов и поликапролактона, потенциально пригодных для создания гибридного сосудистого графта.

Материалы и методы

Двухмерные матриксы в виде пленок получали методом полива растворов полимеров в хлороформе на обезжиренную поверхность стекла. Использовали пленочные матриксы (ПМ) следующего состава: ПМ № 1 – композиция 5 % полигидроксибутирата с гидроксивалератом (ПГБВ) ММ 2307кДа (производитель – Институт биохимии и физиологии им. Г. К. Скрыбина СО РАН (г. Пушкино, Московская область) и 10 % поликапролактон (PCL) ММ 80000кДа (Sigma, США); ПМ № 2 – композиция 7,5 % ПГБВ и 10 % PCL. Культуру ММСК КМ получали путем выделения костного мозга бедренных костей крыс линии Wistar. Культивирование клеток проводили при 37 °С и 5 % CO₂ в среде DMEM, содержащей 1 % HEPES буфера, 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, 1 % L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мкг/мл стрептомицина, 0,1 мкг/мл амфотерицина В. Фенотип каждого пассажа определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител CD90, CD45, CD106 и CD11b, меченных флуорохромами. Жизнеспособность клеток до и после культивирования на сополимерных пленках оценивали путем окрашивания 0,1 %-ным раствором трипанового синего. ММСК КМ 4 пассажа высеивали на матрицы, расположенные в 6-луночных культуральных планшетах, в концентрации $4,1 \times 10^5$ на лунку и культивировали в течение 7 дней. За сутки до окончания культивирования в две контрольные лунки с ПМ № 1 и № 2 добавляли флуорохром PKH26 с последующим подсчетом меченных ММСК КМ, видимых в десяти полях зрения микроскопа, усредненных и пересчитанных на единицу площади в 1 мм². Матриксы с клетками (опыт) и без них (контроль) имплантировали подкожно 36 крысам линии Wistar. Вывод животных из эксперимента с оценкой гистологической картины осуществляли ежемесячно вплоть до 6 месяцев.

Экспрессию VEGF в тканях, окружающих имплантированные матриксы с клетками, оценивали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания замороженных срезов (толщина 14 мкм). Срезы предварительно фиксировали ацетоном. Окрашивание осуществляли поликлональными антителами кролика к VEGF крысы. В качестве вторичных антител использовали ослиные антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с FITC (Millipore, США). Полученные препараты анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа «Axio Imager. A1» (Carl Zeiss, Германия).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica 6.0. При всех видах статистического анализа учитывался уровень статистической значимости 95 % ($p < 0,05$).

Результаты

Перед культивированием на матриксах количество жизнеспособных ММСК КМ 4 пассажа составило 99,6 %. При этом 89,3 % были CD 90⁺, 45⁻, 106⁻, 11b⁻, что соответствовало фенотипу ММСК. Количество клеток на ПМ № 1 и ПМ № 2 через 7 дней культивирования соответствовало $361,3 \pm 7,7$ и $404,8 \pm 5,5$ кл/мм² (жизнеспособных – 93,8 и 96,0 % соответственно).

Выявлено, что воспалительная реакция в тканях вокруг сополимерных матриксов № 1 и № 2 без клеток однопипна, проявлялась в виде умеренной и очаговой лимфогистиоцитарной инфильтрации и сохранялась в течение месяца. Однако частота встречаемости воспалительной реакции в тканях вокруг ПМ № 1 в 2 раза превосходила таковую в случае с ПМ № 2 (66,7 против 33,3 %; $p < 0,05$). Следовательно, биосовместимость матриксов *in vivo* выше у образцов, содержащих в своем составе 7,5 % ПГБВ.

Однако обнаружено, что распад образцов с 7,5 % содержанием ПГБВ начался уже через месяц после имплантации (рис. 1), о чем свидетельствовало появление многокамерных фиброзных капсул с расположенным внутри полимером и образование внутри капсул фибринозно-коллагеновых перемычек, подтверждавших наличие изъязвлений на поверхности пленочных матриксов. При этом образцы с 5 % включением ПГБВ начали медленно деградировать лишь через 3 месяца после подкожной имплантации, на что указывало появление многокамерной тонкостенной полости, в которой располагался матрикс, и отсутствие внутри полости фибринозно-коллагеновых перемычек.

При изучении частоты воспалительной реакции со стороны окружающих тканей при имплантации матриксов № 1 и № 2 с ММСК КМ выявлено, что воспалительные изменения в тканях нивелировались в 2 раза быстрее, чем вокруг образцов без клеток (14 дней против месяца, $p < 0,05$), что косвенно подтверждает противовоспалительное влияние ММСК КМ.

Известно, что резорбция полиоксипропаноатов и поликапролактона *in vivo* происходит с привлечением клеток моноцитарно-макрофагальной системы. В нашем эксперименте сокращение продолжительности

воспалительной реакции в тканях вокруг ПМ № 1 и № 2 с ММСК КМ на своей поверхности привело к отсрочке начала деградации матриксов на месяц (рис. 1).

Так, биодеградация ПМ № 2 (с 7,5 % включением ПГБВ) с клетками началась через 2 месяца после подкожной имплантации, тогда как признаки резорбции подобного матрикса без клеток отмечены уже через месяц после подкожной имплантации. Медленная деградация ПМ № 1 (с 5 % включением ПГБВ) с ММСК КМ началась через 4 месяца, тогда как подобный же бесклеточный матрикс начал резорбироваться к окончанию 3-го месяца подкожной имплантации. Таким образом, увеличение доли ПГБВ в сополимерных композициях вело к ускорению их распада, а присутствие ММСК КМ на поверхности матриксов задерживало биодеградацию на месяц, снижая выраженность воспалительной реакции окружающих тканей и, как следствие, ограничивая привлечение клеток моноцитарно-макрофагальной системы, ответственных за осуществление распада биополимеров *in vivo*.

Известно, что лишь жизнеспособный клеточный пул способен оказывать на окружающие ткани полноценный паракринный эффект. Косвенным отбражением жизнеспособности и длительности пребывания ММСК КМ на матриксах является определение в тканях, окружающих матриксы с клетками, сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF), выделяемого ММСК. Нами отмечено, что максимальная экспрессия данного ростового фактора наблюдалась в течение первого месяца подкожной имплантации матриксов с клетками с заметным снижением в последующие периоды (рис. 2). При этом макроскопически над зоной матриксов, содержащих ММСК КМ, отмечалось полнокровие сосудов подкожной жировой клетчатки. К концу 4-го месяца достоверной разницы в окрашивании флуоресцентным красителем на VEGF тканей вокруг клеточных и бесклеточных матриксов не зафиксировано.

Обсуждение

Таким образом, выбранные композиции долевого соотношения ПГБВ и PCL для изготовления клеточных матриксов продемонстрировали высокую

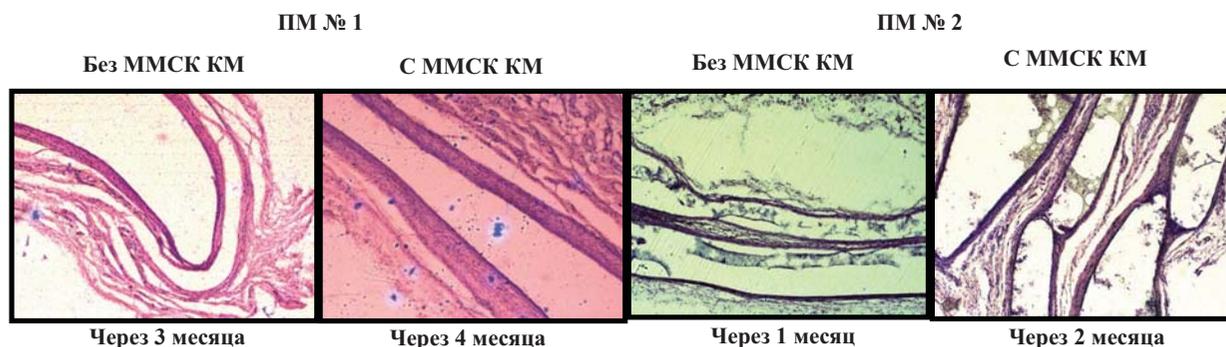


Рис. 1. Начало биорезорбции матриксов с ММСК КМ и без клеток после подкожной имплантации (ув. $\times 100$; окраска гематоксилин-эозином)

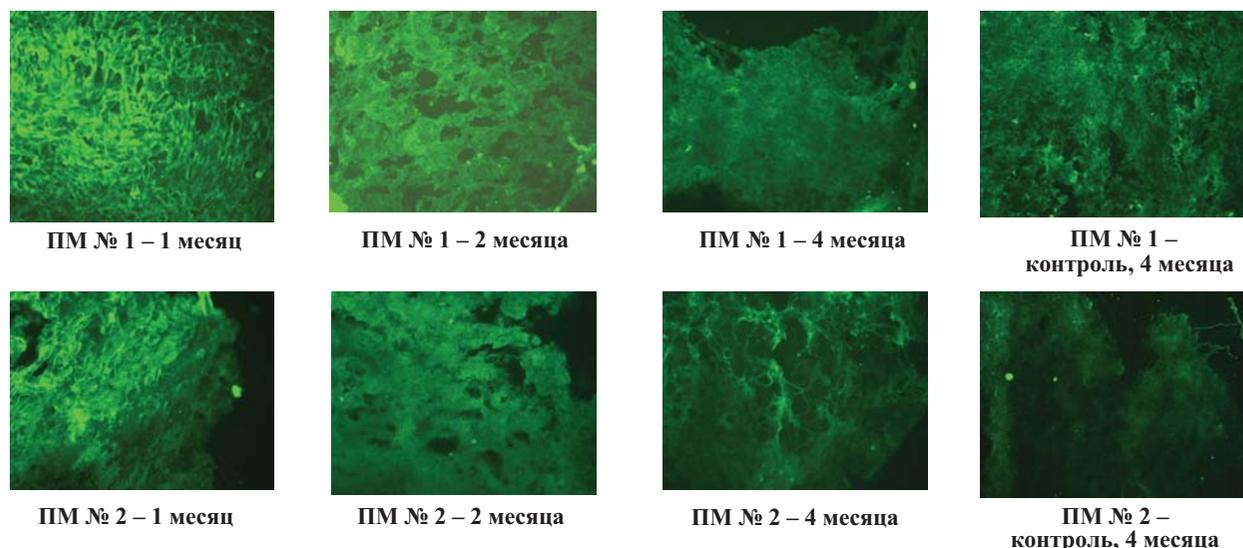


Рис. 2. Внутритканевая экспрессия VEGF вокруг плечочных матриц с ММСК КМ в сравнении с контролем (матрицы без клеток) в различные временные интервалы подкожной имплантации (ув. $\times 200$)

биосовместимость *in vitro* (клеточная адгезия) и *in vivo* (реакция окружающих тканей) и пригодны для создания сополимерного каркаса гибридного сосудистого графта. Увеличение доли ПГБВ в сополимерных композициях приводило к ускорению их распада, что нежелательно, однако резорбция матриц на основе 7,5 % ПГБВ и 10 % PCL отмечена только микроскопически. Присутствие ММСК КМ на поверхности ПМ № 1 и № 2 задерживало биодеградацию, снижая воспалительную реакцию окружающих тканей на имплантацию матриц и привлечение клеток моноцитарно-макрофагальной системы, ответственных за осуществление распада биополимеров *in vivo*. Данный факт может нивелировать минусы, связанные с включением в сополимерную композицию большей доли полиоксикапраноатов, значительно повысить биологическую инертность и, как следствие, проходимость будущего сосудистого графта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шишацкая Е. И. Клеточные матрицы из резорбируемых полигидроксиалканоатов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2007. Т. II, № 2. С. 68–72.
2. Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow / N. Boiret [et al.] // Exp. Hematol. 2005. Vol. 33. P. 219–225.
3. Devine S. M., Hoffman R. Role of mesenchymal stem

cells in hematopoietic stem cell transplantation // Curr. Opin. Hematol. 2000. Vol. 7. P. 358–363.

4. Fabrication and characterization of six electrospun poly(alpha-hydroxy ester) based fibrous scaffolds for tissue engineering / W. J. Li [et al.] // Acta Biomaterialia. 2006. № 2. P. 377–385.

5. Factorial design optimization and *in vivo* feasibility of poly(e-caprolactone)-micro- and nanofiber-based small diameter vascular grafts / B. Nottelet [et al.] // J. of Biomedical Materials Research. 2008. Part A. P. 865–875.

6. *In vitro* and *in vivo* degradation of non-woven materials made of poly(e-caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions / N. Bolgen [et al.] // J. Biomater. Scin. Polym. Ed. 2005. № 16. P. 1537–1555.

7. Shin'oka T., Imai Y., Ikada Y. Transplantation of a Tissue-Engineered Pulmonary Artery // N. Engl. J. Med. 2001. T. 344. P. 532–533.

8. Siegel G., Shaffer R., Dazzi F. The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells // Transplantation. 2009. Vol. 87, № 9. P. 45–49.

9. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis / F. Dazzi [et al.] // Blood Rev. 2006. Vol. 20. P. 161–171.

10. The T-box transcription factor Brachury mediates cartilage development in mesenchymal stem cell line C3H10T1/2 / A. Hoffman [et al.] // J. Cell. Sci. 2002. Vol. 115. P. 769–781.

11. Webb A. R., Yang J., Ameer G. A. Biodegradable polyester elastomers in tissue engineering // Expert Opin. Biol. Ther. 2004. Vol. 4(6). P. 801–812.