

УДК: 616-089.819.843:577.11: 57.085.23

**СКОРОСТЬ РЕЗОРБЦИИ ТРАНСПЛАНТАТА НА ОСНОВЕ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ  
И МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК**

**М. В. НАСОНОВА<sup>1</sup>, Л. В. АНТОНОВА<sup>1</sup>, В. Г. МАТВЕЕВА,<sup>1</sup> Н. В. ДОРНИНА<sup>2</sup>,  
В. А. ЕЖОВ<sup>2</sup>, А. Ю. БУРАГО<sup>1</sup>, Т. В. ГЛУШКОВА<sup>1</sup>, Ю. А. КУДРЯВЦЕВА<sup>1</sup>**

**<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия**

**<sup>2</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН,  
Пущино, Московская обл., Россия**

В статье представлены результаты гистологического исследования местной реакции тканей при подкожной имплантации биополимерных матриксов на основе полиоксиалканоатов и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Показано, что имплантированный материал не вызывает отторжения и острой воспалительной реакции. Вокруг имплантированных материалов формируется соединительнотканная капсула. Наблюдается активная инфильтрация имплантированного материала клетками и васкуляризация. Имплантированные матриксы подвергаются медленной биодеструкции. Наличие мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на поверхности матриксов замедляет скорость резорбции полимера.

**Ключевые слова:** полигидроксибутират, полигидроксибутировалерат, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, биодegradация, биосовместимость.

**RESORPTION RATE OF POLYHYDROXYALKANOATE- BASED SCAFFOLDS  
AND SCAFFOLDS WITH MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS**

**M. V. NASONOVA<sup>1</sup>, L. V. ANTONOVA<sup>1</sup>, V. G. MATVEEVA<sup>1</sup>, N. V. DORONINA<sup>2</sup>,  
V. A. EZHOV<sup>2</sup>, A. YU. BURAGO<sup>1</sup>, T. V. GLUSHKOVA<sup>1</sup>, Yu. A. KUDRYAVTSEVA<sup>1</sup>**

**<sup>1</sup> Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute for Complex Issues  
of Cardiovascular Disease, Kemerovo, Russia**

**<sup>2</sup> Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS,  
Puschino, Moscow reg., Russia**

The article presents the findings of histological analysis of local tissue response to subcutaneous implantation of polyhydroxyalkanoate-based scaffolds and scaffolds with multipotent mesenchymal stromal cells. There were no rejection and acute inflammatory response of the implanted biopolymeric materials. The connective tissue capsule has formed around the implanted materials. Active cell infiltration of the implanted material and its vascularization have been observed. The implanted scaffolds undergo slow biodegradation. The presence of multipotent mesenchymal stromal cells on the scaffold surface slows down the resorption rate of the polymer.

**Key words:** polyhydroxybutyrate, polyhydroxybutyrate, multipotent mesenchymal stromal cells, biodegradation, biocompatibility.

**Введение**

Наиболее перспективной задачей современной медицины считается развитие тканевой инженерии как одного из направлений регенеративной медицины [10]. При этом приоритетным направлением является разработка биоинженерных каркасов и biomaterialов, применение которых позволило бы решать как этические, так и иммунологические проблемы трансплантологии. Для создания органов и тканей используются каркасы или матриксы (биологические или искусственные), клетки (ауто-, алло-, ксеногенные), биореакторы и биоактивные молекулы [4, 9]. В последние годы на рынке изделий медицинского назначения появляется большое

число материалов, используемых в хирургической практике, различающихся по химической природе и входящих в их состав лекарственных веществ и композиционных материалов: материал – клетка. На сегодняшний день материалами для изготовления скаффолдов являются несколько типов полимеров, на основе которых ведутся разработки по созданию матриц для тканевой инженерии [2]. Основными критериями биологически совместимой матрицы должны быть: отсутствие цитотоксичности, поддержание адгезии, пролиферации и дифференцировки помещенных на ее поверхность клеток, отсутствие воспалительной реакции на материал и иммунного ответа, достаточная ме-

ханическая прочность в соответствии с назначением, биорезорбируемость обычными метаболическими путями [5]. Большой интерес исследователи уделяют полимерам природного происхождения, в частности полиоксикалкоаноатам [7, 12]. Данный класс полимеров характеризуется значительным разнообразием и включает в себя как моно-, так и сополимеры, которые, в свою очередь, обладают различными сроками биодеградации, физико-химическими и физико-механическими свойствами [12]. Особый интерес представляет полигидроксibuтират и полигидроксibuтиролалерат, нашедшие широкое применение в регенеративной медицине [6, 7, 8].

Особым аспектом стоит вопрос биосовместимости матрицы и способности клеток функционировать в созданной композиции. Принципиальный успех на первом этапе зависит от позитивного и негативного отбора полимеров и клеток, заселяющих матрицу. В этом плане особый интерес вызывает использование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) в качестве клеточного материала для восстановления тканей. ММСК характеризуются высокой скоростью пролиферации и последующей дифференцировки в различные типы клеток. В трансплантологии ММСК применяют для различных целей: замены поврежденных клеток, продления жизни аллогенного трансплантата путем угнетения активности лимфоцитов реципиента, коррекции патологии путем стимуляции собственных репаративных резервов организма, создания тканеинженерных конструкций [1]. Некоторые аспекты применения ММСК для лечения сердечно-сосудистой патологии хорошо изучены в доклинических и клинических исследованиях [11].

**Цель** исследования – изучить биосовместимость и сроки резорбции системы матрикс – клетка на основе полиоксикалкоаноатов и ММСК, оценить влияние клеточного компонента на скорость резорбции матрицы.

### Материалы и методы

Для изготовления матриксов использовали полигидроксibuтират (ПГБ) с молекулярной массой 309 кДа, сополимер полигидроксibuтиролалерата (ПГБВ) с молекулярной массой 2307 кДа и 541 кДа, синтезированные в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН (Пушино, Московская область). Для растворения биополимеров использовали трихлорметан. Пленочные образцы получали в лабораторных условиях методом полива раствора ПГБ и ПГБВ 3 %-ной концентрации на обезжиренную

поверхность стекла. Испарение растворителя проводили при комнатной температуре.

Были изготовлены шесть типов имплантатов: № 1 ПГБВ Мм 2307 кДа; № 2 ПГБВ Мм 2307 кДа + ММСК; № 3 ПГБВ Мм 541 кДа; № 4 ПГБВ Мм 541 кДа + ММСК, № 5 ПГБ Мм 309 кДа; № 6 ПГБ Мм 309 кДа + ММСК.

Культуру ММСК получали путем выделения костного мозга бедренных костей крыс-самцов линии Wistar. Культивирование клеток проводили при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub> в среде DMEM (Gibco, США), содержащей 1 % NEPEs буфера, 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, 1 % L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мкг/мл стрептомицина, 0,1 мкг/мл амфотерицина В (Sigma Aldrich, США). Фенотип клеток до и после культивирования на матрицах определяли методом проточной цитофлуориметрии на цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, США) с использованием моноклональных антител CD90 и CD11b, меченных FITC, и CD45 и CD106, меченных PE. Жизнеспособность ММСК до и после культивирования на сополимерных пленках определяли путем окрашивания клеток 0,1 %-ным раствором трипанового синего. Для культивирования на матрицах использовали ММСК 4-го пассажа. Клетки высевали в концентрации  $4,1 \times 10^5$  на лунку 6-луночного планшета и культивировали в течение 7 дней. За сутки до окончания времени культивирования ММСК КМ на матриксах в контрольные лунки с матриксами добавляли флуорохром PKH26 (Sigma, США). Детекцию флуоресцентно меченных ММСК, адгезированных на матриксах, проводили посредством флуоресцентной микроскопии на инвертированном микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия). Эффективность адгезии клеток к поверхности ПМ оценивали по количеству прикрепившихся клеток, видимых в десяти полях зрения микроскопа, усредненных и пересчитанных на единицу площади в 1 мм<sup>2</sup>.

Подкожная имплантация клеточных и бесклеточных матриксов проведена на крысах-самцах Wistar, содержащихся на стандартном пищевом рационе в условиях вивария НИИ КПССЗ. Все манипуляции лабораторным животным проводили под ингаляционным эфирным наркозом в условиях чистой операционной с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», «Правил по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных», утвержденных Минздравом СССР (1977) и Минздравом РСФСР (1977) и в соответствии с требованиями приказов №1179 Минздрава СССР от 10.10.1983 г., № 267 Минздрава России от 19.06.2003 г.

В эксперименте использовали белых крыс-самцов линии Wistar массой 230–250 г (n=72). Лабораторным животным под ингаляционным наркозом изофлурана («E-Z Anesthesia», E-Z Systems Corporation) в условиях чистой операционной на спине выстригали шерсть и обрабатывали операционное поле раствором йода на 70 %-ном спирте. Разрезали кожу парамедиально и тупым разделением тканей формировали карманы. В каждый карман помещали по одному имплантату. Каждому животному имплантировали образцы двух типов матриксов – без клеток и с клетками. Кожу ушивали лавсаном 3/0. Животных выводили из эксперимента глубоким эфирным наркозом через 14, 28, 42, 56, 70, 90, 120, 150 суток. Извлеченные имплантаты фиксировали в 4 %-ном формалине, затем заливали в парафин по стандартной методике. Поперечные срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Морфологические изменения тканей оценивали по признакам: инкапсуляция мембран, выпадение фибрина, воспаление, неоангиогенез, коллагенизация, гистиоцитарные изменения (грануляционная и фиброзная ткань) и клеточный состав в области трансплантации (макрофаги, фибробласты, многоядерные гигантские клетки инородных тел (МГКИТ), гранулемы МГКИТ, эпителиоидные клетки), степень редукции (трансформации) трансплантированных образцов и степень резорбции мембран.

**Результаты и обсуждения**

Перед культивированием на матриксах количество жизнеспособных ММСК составило 99,6 %. При фенотипическом анализе ММСК четвертого пассажа выявлено, что 90,6 % клеток были 90+, 45-, 106-, 11b-, что соответствует фенотипу ММСК (рис. 1). Количество клеток на матриксах № 2, № 4 и № 6 через 7 дней культивирования составило соответственно 219,3±47,2 кл/мм<sup>2</sup>, 227,3,5±

±20,7 кл/мм<sup>2</sup> и 158,3,5±22,4 кл/мм<sup>2</sup>. При этом количество жизнеспособных ММСК, снятых с образцов матриц № 2 и № 6, составило соответственно 98,1; 97,7 и 98,1 %.

После имплантации матриксов заживление ран у животных в экспериментальных группах происходило первичным натяжением. Ни у одного животного не обнаружено явлений отторжения имплантатов, нагноения, расхождения швов и других послеоперационных осложнений. Все матриксы находились в месте имплантации, были окружены фиброзной капсулой. Вокруг всех типов имплантатов по периферии в окружающей фиброзно-мышечной ткани не отмечено некрозов, кровоизлияний, гранулем и выраженного отека. Реакция тканей на оперативное вмешательство и последующую имплантацию полимерных матриксов в общих чертах протекала по обычной схеме, характерной для раневого процесса и реакции на инородное тело, включая стадии травматического воспаления, образования соединительной ткани, формирования и перестройки рубца [6].

Микроскопическая картина в месте имплантации экспериментальных матриксов всех типов через 2 недели после операции характеризовалась отсутствием отека тканей вокруг имплантатов (рис. 2), отмечено начало формирования фиброзной капсулы. Сопоставление результатов, полученных при имплантации матриксов из полимеров с незаселенными ММСК, с реакцией тканей на матриксы с клетками показало, что начальная воспалительная реакция тканей была более выраженной у матриксов без клеток, проявлялась в виде умеренной и очаговой лимфогистиоцитарной инфильтрации и сохранялась в течение одного месяца (рис. 2).

Через 4 недели после имплантации вокруг матриксов всех типов были сформированы фиброзные капсулы (рис. 3). Прорастание соединитель-

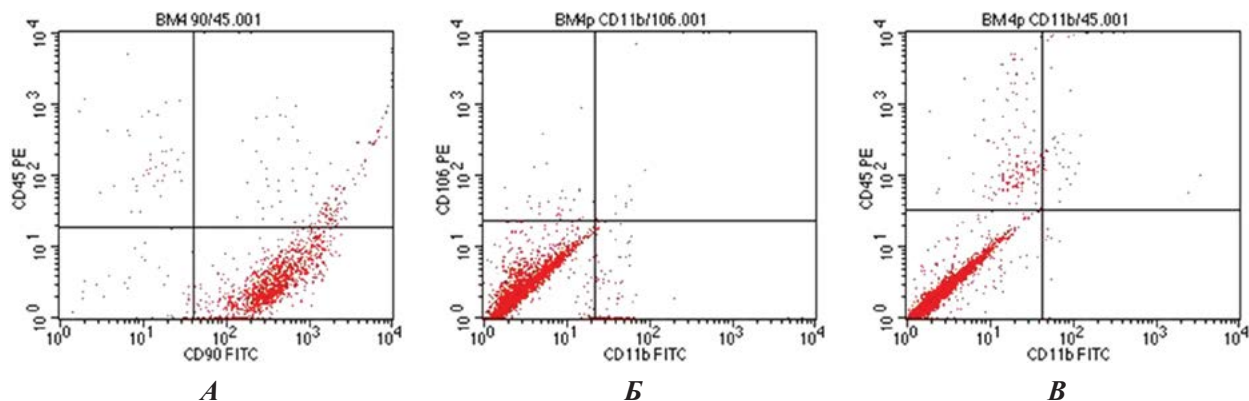
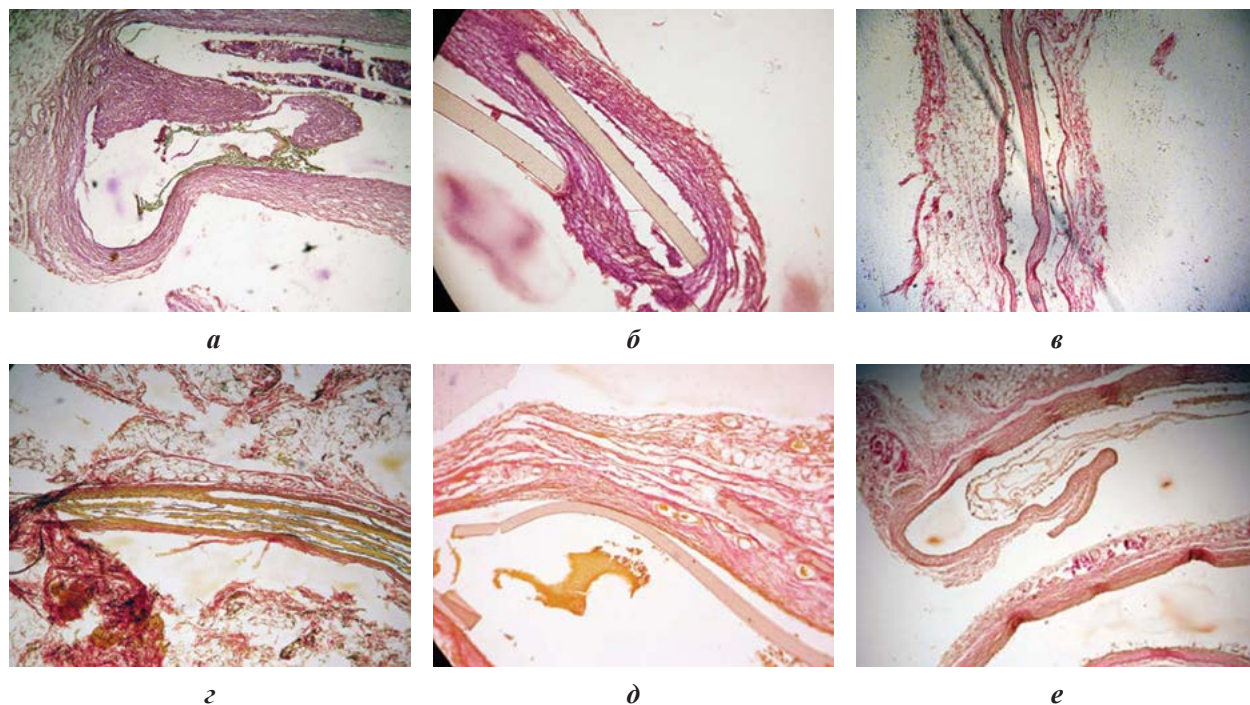
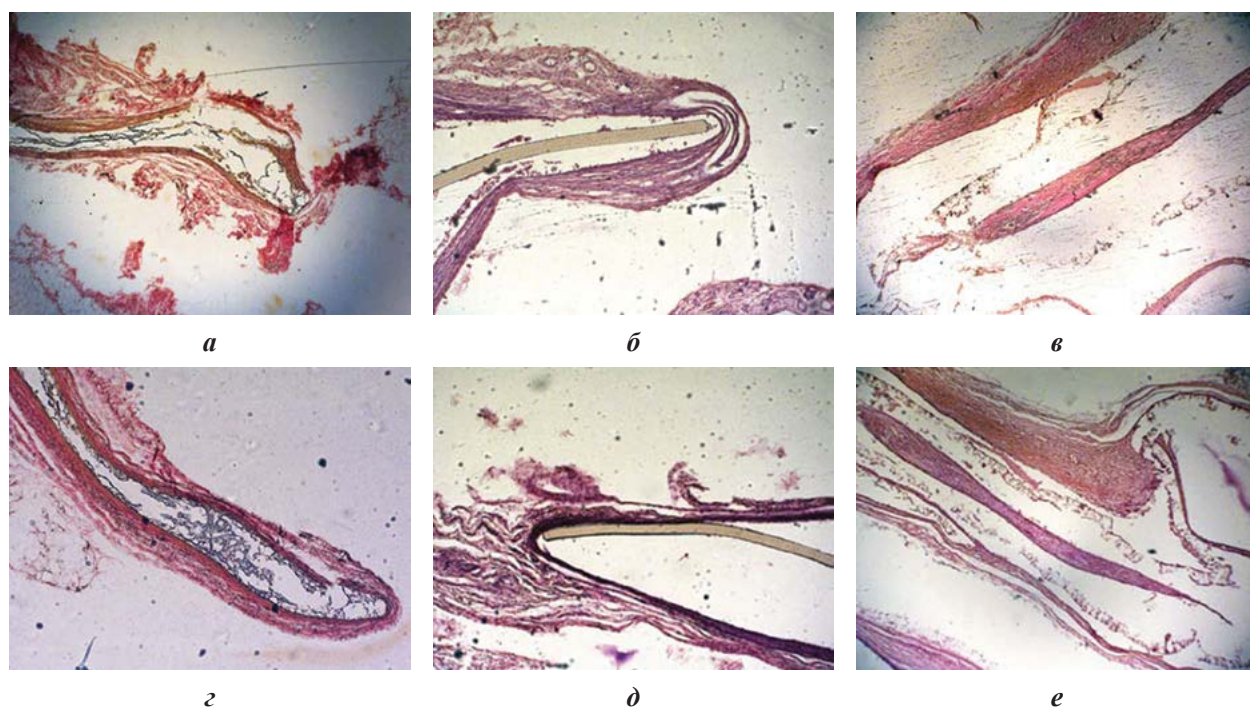


Рис. 1. Двухмерные гистограммы распределения ММСК 4 пассажа методом проточной цитофлуориметрии: А – по CD 90 – CD 45; Б – по CD 11b – CD 106; В – по CD 11b – CD 45.



**Рис. 2. Динамика биодegradации матриц через две недели *in vivo*:**  
 а) ПГБВ 2307кДа (ув. 200, окраска гематоксилин-эозином); б) ПГБВ кДа 541 (ув. 100, окраска гематоксилин-эозином);  
 в) ПГБ 309 кДа (ув. 50, окраска по Ван-Гизону); г) ПГБВ 2037 кДа + ММСК (ув. 100, окраска по Ван-Гизону);  
 д) ПГБВ 541 кДа + ММСК (ув. 100, окраска по Ван-Гизону); е) ПГБ 309 кДа + ММСК (ув. 100, окраска по Ван-Гизону)



**Рис. 3. Динамика биодegradации матриц через четыре недели *in vivo*:**  
 а) ПГБВ 2307 кДа (ув. 50; окраска по Ван-Гизону); б) ПГБВ 541 кДа; (ув. 100; окраска гематоксилин-эозином);  
 в) ПГБ 309 кДа (ув. 50; окраска по Ван-Гизону); г) ПГБВ 2307 кДа + ММСК (ув. 100; окраска по Ван-Гизону);  
 д) ПГБВ 541 кДа + ММСК (ув. 100; окраска гематоксилин-эозином);  
 е) ПГБ 309 кДа + ММСК (ув. 50; окраска гематоксилин-эозином)

ной ткани в имплантат не отмечено. По периферии в окружающей фиброзно-мышечной ткани некрозов, кровоизлияний, лимфогистиоцитарной инфильтрации и отека не наблюдалось. Капсула характеризовалась наличием небольшого количества макрофагов и фибробластов, располагавшихся на внутренней поверхности капсулы, на границе с пленкой. Определялись единичные гигантские клетки инородных тел (ГКИТ), лежащие в толще внутренней поверхности капсулы. Клеточная инфильтрация капсул, формирующихся вокруг всех типов матрицков, возрастает преимущественно за счет фибробластов и активных макрофагов; в окружающих тканях в небольших количествах отмечено присутствие клеток воспаления (нейтрофилов и лимфоцитов). Также выявлено присутствие большого количества ГКИТ, являющихся, как известно, одним из основных агентов биорезорбции. Обнаружена активная дегенерация матрицков ПГБ 309 кДа и ПГБВ 2307 кДа, что проявлялось в виде появления многокамерных капсул с расположенным внутри пенистым полимером и появлением фибрино-коллагеновых перемишек. Микроскопически видны микроэрозии на поверхности матрицков. В случае имплантации матрицков ПГБВ 541 кДа и ПГБВ 541 кДа + ММСК резорбции матрицков не наблюдали.

Существенных различий в состоянии тканей и структуре фиброзных капсул вокруг ПГА-матрицков спустя 10 недель после имплантации не отмечено (рис. 4), за исключением увеличения количества ГКИТ и снижения количества клеток воспаления в окружающих матриксах тканях. По-прежнему визуализировалось большое количество макрофагов (рис. 4). Видимые повреждения матрицков из ПГБВ 2307 кДа; ПГБВ 2307 кДа + ММСК; ПГБ 309 кДа; ПГБ 309 кДа + ММСК – выраженная шероховатость поверхности, вакуолизация матрицков. Матрикс, изготовленный из ПГБВ 541 кДа и ПГБВ 541 кДа + ММСК, выглядел наименее деструктурированным.

Спустя 3 месяца после имплантации (рис. 5) отмечено возрастание толщины фиброзных капсул вокруг всех типов матрицков. Капсулы характеризовались наличием ярко выраженной двухслойности, внутренний слой занимал  $\frac{1}{3}$  толщины, был представлен рыхлой фиброзной тканью с большим количеством макрофагов, фибробластов и ГКИТ. Наружная поверхность представлена плотной фиброзной тканью в виде пучков коллагеновых волокон и прилегающих к ним фиброцитов. Капсулы характеризовались высокой зрелостью коллагена с наличием фиброцитов во внешнем слое, внутренний – представлен тонким слоем фибробластов с макрофагами, молодой фиброзной тканью

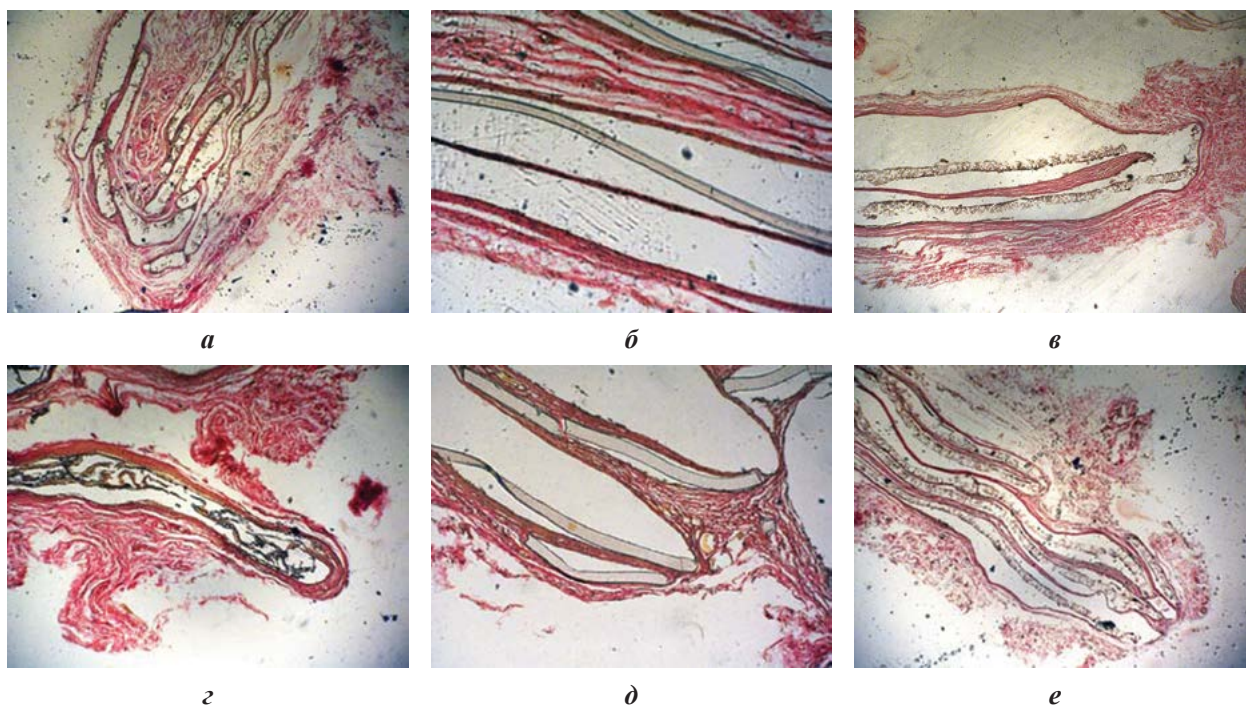
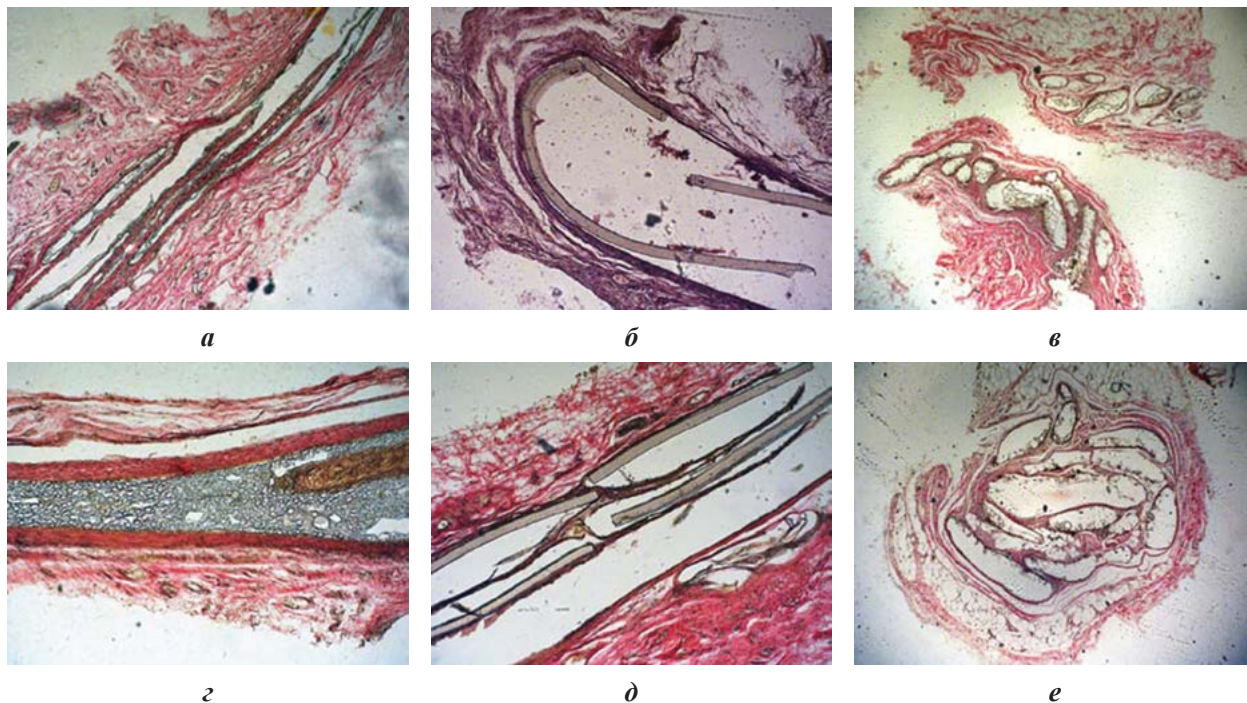
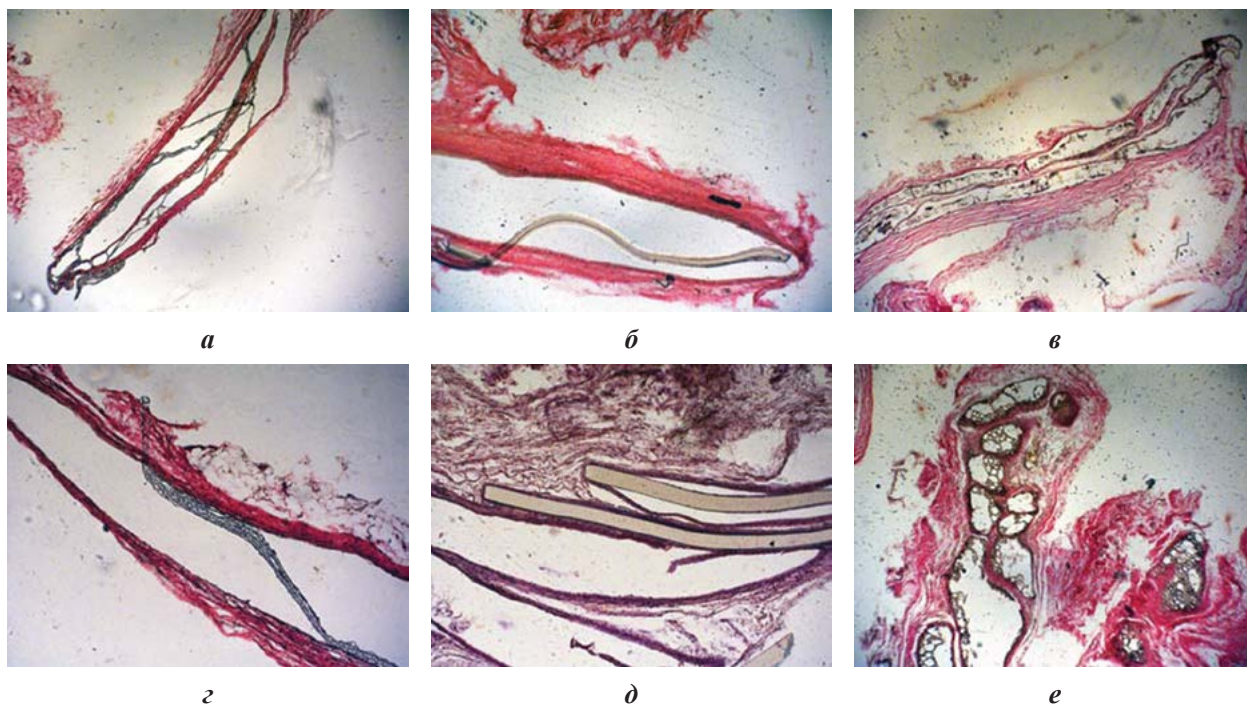


Рис. 4. Динамика биодеградации матрицков через 10 недель *in vivo*:

- а) ПГБВ 2307 кДа (ув. 50, окраска по Ван-Гизону); б) ПГБВ 541 кДа (ув. 100, окраска по Ван-Гизону);  
 в) ПГБ 309 (ув. 50, окраска по Ван-Гизону); г) ПГБВ 2307 кДа + ММСК (ув. 50, окраска по Ван-Гизону);  
 д) ПГБВ 541 кДа + ММСК (ув. 100, окраска по Ван-Гизону); е) ПГБ 309 кДа + ММСК (ув. 50, окраска по Ван-Гизону)



**Рис. 5.** Динамика биодegradации матриц через 3 месяца *in vivo*:  
 а) ПГБВ 2307 кДа (ув. 50; окраска по Ван-Гизону); б) ПГБВ 541 кДа (ув. 50; окраска по Ван-Гизону);  
 в) ПГБ 309 кДа (ув. 50; окраска по Ван-Гизону); г) ПГБВ 2307 кДа + ММСК (ув. 100; окраска по Ван-Гизону);  
 д) ПГБВ 541 кДа + ММСК (ув. 100; окраска гематоксилин-эозином);  
 е) ПГБ 309 кДа + ММСК (ув. 50; окраска по Ван-Гизону)



**Рис. 6.** Динамика биодegradации матриц через 5 месяцев *in vivo*:  
 а) ПГБВ 2307 кДа (ув. 100, окраска по Ван-Гизону); б) ПГБВ 541 кДа (ув. 50, окраска по Ван-Гизону);  
 в) ПГБ 309 кДа (ув. 50, окраска по Ван-Гизону); г) ПГБВ 2307 кДа + ММСК (ув. 100, окраска по Ван-Гизону);  
 д) ПГБВ 541 кДа + ММСК (ув. 100, окраска гематоксилин-эозином);  
 е) ПГБ 309 кДа + ММСК (ув. 50, окраска по Ван-Гизону)

с умеренной инфильтрацией лейкоцитами. Наружная поверхность представлена плотной фиброзной тканью в виде пучков коллагеновых волокон и прилегающих к ним фиброцитов, с обеднением клеточного состава инфильтрата. Характерной реакцией тканей на имплантацию матриксов из ПГА было увеличение количества ГКИТ на фоне значительного снижения нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрации. Необходимо отметить, что матриксы ПГБВ 541 кДа как с ММСК, так и без сохраняют свою целостность по сравнению с другими группами образцов.

Через 5 месяцев после имплантации вокруг матриксов зафиксировано значительное истончение капсул (рис. 6) по сравнению с ранними сроками. Однако количество макрофагов в тканях, примыкающих к имплантатам, по-прежнему оставалось на высоком уровне. Среди фибробластических элементов преобладали «зрелые» клетки. Клетки воспалительного ряда не определялись. В периферических частях капсулы наблюдали образование зрелой соединительной ткани в виде пучков коллагеновых волокон и прилегающих к ним фиброцитов. За исключением ПГБВ 541 кДа; ПГБВ 541 кДа + ММСК, практически все матриксы были сильно разрушены и фрагментированы.

Полученные результаты показали, что матриксы на основе полигидроксибутирата и полигидроксибутиролалерата биосовместимы, реакция на них со стороны окружающих тканей умеренная. Выявлено, что воспалительные изменения в тканях нивелируются в два раза быстрее при имплантации матриксов, содержащих на своей поверхности ММСК, что косвенно подтверждает противовоспалительное влияние ММСК. При этом введение ММСК замедляет резорбцию клеточных матриксов.

### Заключение

Таким образом, анализ динамики тканевой реакции при подкожной имплантации комплекса матрикс – клетка позволил установить характер влияния ММСК, адгезированных на полимерной

матрице, который включает в себя нивелирование негативного воздействия полимера, снижение интенсивности острого и устранение хронического воспаления, формирование условий для естественной репарации.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. *Murphy S. V., Atala A.* Organ engineering – combining stem cells, biomaterials, and bioreactors to produce bioengineered organs for transplantation. *BioEssays*. 2013; 35: 163-172. doi: 10.1002/bies.201200062.
2. *Saxena A. R.* Tissue engineering: Present concepts and strategies. *Journal of Indian Association of Pediatric Surgery*. 2005; 10: 14-19. doi: 10.4103/0971-9261.16069.
3. *Fuchs J. R., Nasser B. A., Vacanti J. P.* Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. *Ann. Thorac. Surg.* 2001; 72: 577–591. doi:10.1016/S0003-4975(01)02820-X.
4. *Sarkar S. Schmitz-Rixen T., Hamilton G., Seifalian A. M.* Achieving the ideal properties for vascular bypass grafts using a tissue engineered approach: a review. *Med. Biol. Eng. Comput.* 2007; 45 (4): 327-336. doi:10.1007/s11517-007-0176z.
5. *Guilak F., Butler D., Goldstein S. A., Baaijens F. P.* Biomechanics and mechanobiology in functional tissue engineering. *Journal of Biomechanics*. 2014; 47(9): 1933–1940. doi: 10.1016/j.jbiomech.2014.04.019.
6. *Kuppan P., Vasanthan K. S., Sundaramurthi D., Krishnan U. M.* Development of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) fibers for skin tissue engineering: effects of topography, mechanical and chemical stimuli. *Biomacromolecules*. 2011; 12 (9): 3156-3165. doi: 10.1021/bm200618w.
7. *Sudesh K., Abe H., Doi Y.* Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog Polym Sci.* 2000; 25(10): 1503–1555. doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6.
8. *Петренко А. Ю., Петренко Ю. А.* Трансплантация мезенхимальных стромальных клеток: перспективы и реальность. *МЕДИЦИНА СЬОГОДНІ І ЗАВТРА*. 2011; 1-2: 50-51.
9. *Petrenko A. Yu., Petrenko Yu. A.* Transplantatsiya mezenhimalnykh stromalnykh kletok: perspektivy i realnost. *MEDIT-SINA SЬOGODNI I ZAVTRA*. 2011; 1-2: 50-51. [In Russ].
9. *Patel D. M., Shah J., Srivastava A. S.* Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cells International*. 2013; 496218: 15. doi:org/ 10.1155/2013/496218.

Статья поступила: 28.11.2014

Для корреспонденции:

**Насонова Марина Владимировна**  
Адрес: 650002, г. Кемерово,  
Сосновый бульвар, д. 6  
Тел. 8 (3842) 64-42-38  
E-mail: nanomv@kemcardio.ru

For correspondence:

**Nasonova Marina**  
Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo,  
650002, Russian Federation  
Tel. 8 (3842) 64-42-38  
E-mail: nanomv@kemcardio.ru