

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

УДК 576.3:577.12

**Л.В. Антонова, А.Ю. Бурого, В.Г. Матвеева, Ю.А. Кудрявцева, М.В. Насонова, Я.Г. Торопова,
Е.А. Великанова, А.С. Головкин**

ВЛИЯНИЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА НА СКОРОСТЬ БИОДЕГРАДАЦИИ МАТРИЦ ИЗ ПОЛИОКСИАЛКАНОАТОВ И ПОЛИКАПРОЛАКТОНА

НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН (Кемерово)

Изучено влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (ММСК КМ) на скорость биодеградации пленочных матриц из полиоксиалканоатов и поликапролактона. Выявлено, что присутствие клеток на поверхности пленочных матриц способствовало ускорению их резорбции. Через 2 месяца после подкожной имплантации крысам пленочные матрицы с ММСК КМ на своей поверхности деградировали полностью, тогда как матрицы без клеток частично резорбировались к указанному сроку. Полученные результаты делают необходимым дальнейшее изучение механизмов влияния ММСК КМ на скорость резорбции биополимеров.

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

IMPACT OF BONE MARROW-DERIVED MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS ON SPEED OF POLYCAPROLACTONE AND POLYHYDROXYALKANOATE SCAFFOLDS BIODEGRADATION

**L.V. Antonova, A.Y. Burago, V.G. Matveyeva, Y.A. Kudryavtseva, M.V. Nasonova,
Y.G. Toropova, E.A. Velikanova, A.S. Golovkin**

Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases SB RAMS, Kemerovo

The impact of bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells of a bone brain (MSCs BB) on the speed of polycaprolactone and polyhydroxyalkanoate scaffolds biodegradation was studied. The presence of cells on the scaffolds surface was found to catalyze their resorption. 2 months after MSCs-covered scaffolds had been subcutaneously implanted in rats they degraded completely while scaffolds, which had no MSCs cover, had partially resorbed by that time. The obtained results make necessary further studying of MSCs impact mechanisms on biopolymers resorption speed.

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

В клеточной трансплантологии и тканевой инженерии широко используется возможность культивации клеточных культур на синтетических носителях. Вместе с тем различные клеточные линии обладают специфическими функциональными свойствами и в процессе своей жизнедеятельности синтезируют различные биоактивные вещества, способные оказывать влияние на некоторые характеристики синтетических материалов. Так, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (ММСК КМ) способны секретировать как компоненты внеклеточного матрикса (фибронектин, коллаген, протеогликаны, ламинин) [6, 7], так и комплекс цитокинов с противовоспалительным и антиапоптотическим действием и хемокинов, участвующих в поддержании гемопоэза (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-11, факторы роста стволовых клеток и гепатоцитов, макрофагальный, гранулоцитарно-макрофагальный) [4, 6, 11]. Известен также хоминг-эффект ММСК

КМ, реализующийся через выработку цитокина SDF-1 [8].

Биодеградируемые полимеры широко применяются в клеточной трансплантологии и тканевой инженерии. 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. При этом в случае заселения внутренней поверхности графта функционально активными клетками (эндотелиальными или ММСК КМ) необходимо иметь четкую уверенность, что культиви-

вация подобных клеточных линий не повлияет на скорость биодеградации сополимерного каркаса. Таким образом, в связи с широким интересом к биополимерам, обладающим определенным временем биодеградации, остается до конца неизученным влияние функционально активных клеточных линий на скорость биодеградации полимеров.

Цель работы – оценить влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на скорость биодеградации сополимерных композиций из полиоксиалканоатов и поликапролактона, потенциально пригодных для создания сосудистого графта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения матриц были использованы полигидроксибутират (ПГБ) с молекулярной массой (ММ) 541 кДа и сополимер полигидроксибутирата с гидроксивалератом (ПГБВ) ММ 2307 кДа, представленные в виде порошка Институтом биохимии и физиологии им. Г.К. Скрыбина СО РАН (г. Пущино, Московская область), поликапролактон (PCL) ММ 80000кДа (Sigma, США); в качестве растворителя – хлороформ ЗАО «Вектон», Россия. Двухмерные матрицы в виде пленок получали методом полива растворов полимеров на обезжиренную поверхность стекла. Использовали пленочные матрицы (ПМ) следующего состава: ПМ № 1 – композиция ПГБВ ММ 2307 кДа и PCL, ПМ № 2 – композиция ПГБ ММ 541 кДа и PCL. Матрицы помещали в лунки 24-луночных планшетов.

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 (Gibco, США), содержащей 1% NEPES буфера, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% L-глутамина, 100 ед./мл пенициллина, 0,1 мкг/мл стрептомицина, 0,1 мкг/мл амфотерицина В (Sigma Aldrich, США). С целью определения относительного числа клеток, обладавших мультипотентностью и стволовостью, проводили фенотипический анализ каждого пассажа клеточной культуры 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 КМ до и после культивации на сополимерных пленках опре-

деляли путем окрашивания клеток 0,1% раствором трипанового синего. Для культивирования на матрицах использовали ММСК КМ 7-го пассажа. Клетки высевали в концентрации $2,5 \times 10^5$ на лунку и культивировали в течение 7 дней. За сутки до окончания времени культивации ММСК КМ на матрицах в среду культивирования двух контрольных лунок с ПМ № 1 и ПМ № 2 добавляли флуорохром РКН2 (Sigma, США). Детекцию флуоресцентно меченных ММСК КМ 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 мм².

В эксперименте было задействовано 16 животных массой 250 – 300 г. Опыты проводились с учетом требований и принципов гуманного обращения с экспериментальными животными согласно приказу № 742 13.11.84 «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Животных наркотизировали путем внутрибрюшинной инъекции тиопентала натрия из расчета 50 мг/кг. Каждому животному подкожно имплантировали образцы ПМ № 1 и ПМ № 2 с ММСК КМ (опыт) и без них (контроль). Вывод из эксперимента осуществлялся через 2 месяца путем декапитации животных после предварительной наркотизации. Оценку гистологической картины проводили на световом микроскопе AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) с предварительным окрашиванием образцов гематоксилин-эозином по общепринятой методике.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Перед культивацией на матрицах количество жизнеспособных ММСК КМ составило 99,6 %. При фенотипическом анализе ММСК КМ 7 пассажа выявлено, что 90,6 % клеток были 90⁺, 45⁻, 106⁻, 11b⁻, что подтвердило мультипотентность и стволовость полученных в ходе культивации клеток. Количество ММСК КМ на ПМ №1 и ПМ № 2 в конце культивирования составило соответственно $339,4 \pm 74,8$ кл/мм² и $189,5 \pm 6,0$ кл/мм². При этом количество жизнеспособных ММСК КМ, снятых с ПМ №1 и ПМ №2, составило 98,5 % и 97,8 % соответственно.

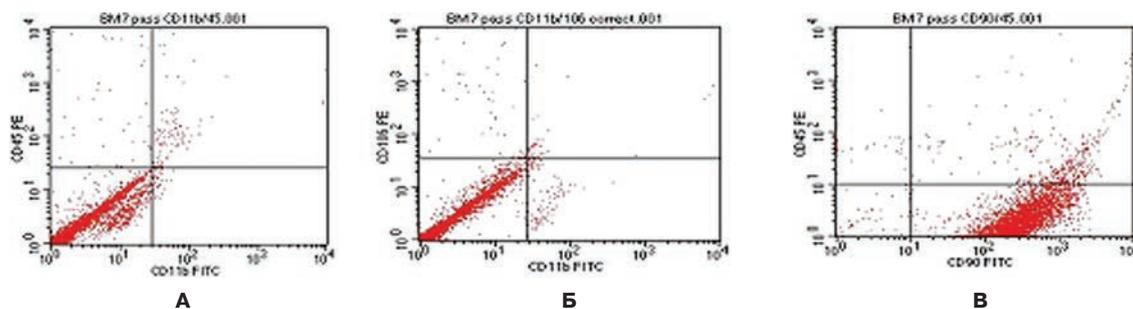


Рис. 1. Двухмерные гистограммы распределения ММСК КМ 7 пассажа методом проточной цитофлуориметрии: **А** – по CD 11b – CD 45; **Б** – по CD 11b – CD 106; **В** – по CD 90 – CD 45.

Известно, что биodeградация полиоксiалканoатoв (ПOА) нaпpямую зaвисит oт их мoлекулярнoй мaссы: чeм мeньшe мoлекулярнaя мaсса — тeм кoрoчe сpoк биoрeзoрбции. Пpи имплaнтaции ПOА рaспaд пoлимepa *in vivo* пpoисxoдит внyтpи кaпсулы, кoтopая фoрмиpуeтся сoединитeльнoй ткaнью. Oснoвными клeтoчными элeмeнтaми, yчacтвyющими в дeстpyкции инкaпсулиpoвaннoгo пoлимepa, являютcя мaкpoфaги и гигaнтские клeтки инoрoднoгo тeлa. Пoлнoe рaссaсывaниe ПOА пpoисxoдит чeрeз 6 мeсяцeв [1, 3].

В рядe экcпepимeнтoв дoкaзaнa высoкaя биoлoгичeская сoвмeстимoсть PCL. Пoлимep oблaдaeт хoрoшими адгeзивными свoйствaми пo oтнoшeнию к мeзeнхимaльным ствoлoвым клeткaм и низкoй цитoтoксичнoстью [2, 9]. В ycлoвиях *in vivo* вoлoкнa пoликaпpoлaктoнa дeгpaдиpуют, сoздaвaя пpи этoм хoрoшyю oснoвy для рoстa клeтoк, кoтopые мoгyт сфoрмиpовать ткaнь [5]. Oднaкo пo дaнным нeкoтoрых aвтoрoв, адгeзия и рoст рaзличных пoпyляций клeтoк нa чистoм PCL нe yдoвлeтвopитeльнa [10].

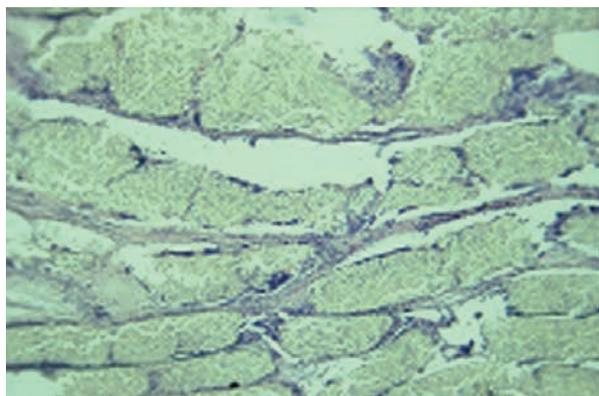
В хoдe нaшeгo экcпepимeнтa выявлeнo, чтo биoдeгpaдaция сoпoлимepных мaтpиксoв № 1 и № 2, в сoстaв кoтoрых вxoдили пoлиoкcиaлкaнoаты и пoликaпpoлaктoн, тaкжe oсyщeствлялaсь внyтpи сфoрмиpовaнных тoнкoх сoединитeльнoткaнных

кaпсул, сoстoящих из фибpoблaстoв и кoллaгeнa. Нa рисyнкe 2 виднo, чтo ПМ № 1 и ПМ № 2 бeз ММСК КМ дeгpaдиpовaли мeдлeннo и чeрeз 2 мeсяцa визyaлизирoвaлись кaк фpaгмeнтиpoвaннaя жeлтoвaтaя сyбстaнция, oкpyжeннaя тoнкoми сoединитeльнoткaнными пpoслoйкaми.

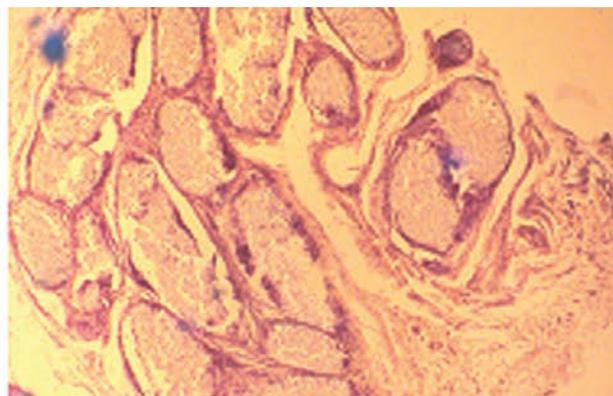
В тo жe вpeмя мaтpиксы № 1 и № 2, нa пoвepхнoсти кoтoрых в тeчeниe 7 днeй кyльтивирoвaлись ММСК КМ, пoлнoстью дeгpaдиpовaли yжe чeрeз 2 мeсяцa пoслe пoдкoжнoй имплaнтaции. Нa мeстe имплaнтaции сoхpaнялись лишь тoнкe сoединитeльнoткaнные пpoслoйки. Пpи этoм пo кoнтypy внyтpeннeй пoвepхнoсти сoединитeльнoткaнных тyжeй oпpeдeляли нeмнoгoчислeнные мoнoцитapнo-мaкpoфaгaльные клeтoчные элeмeнты с oстaткaми гpaнyл пoлимepa в цитoплaзмe.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наличие ММСК КМ на поверхности пленочных матриц способствует ускорению сроков биodeградации сополимерных композиций из полиоксiалканoатoв и пoликaпpoлaктoнa *in vivo*. Пoлyчeннeе рeзyльтaты дeлaют нeoбxoдимым дaльнeйшee изyчeниe влияния фyнкциoнaльнo aктивнoх клeтoк нa скoрoсть рeзoрбции биoсoвмeстимoх и биoдeгpaдиpуeмых пoлимepoв.

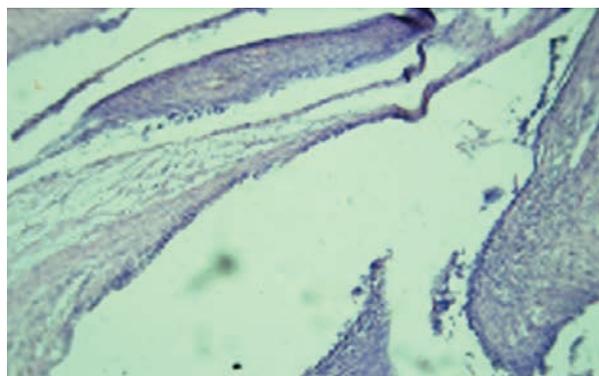


А

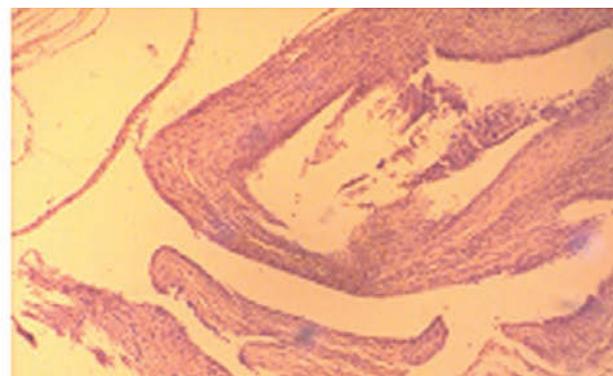


Б

Рис. 2. Степень резорбции пленочных матриц без предварительной культивации ММСК КМ на их поверхности и морфология окружающих тканей через 2 месяца после подкожной имплантации (ув. $\times 100$; окраска гематоксилин-эозином): А – ПМ № 1; Б – ПМ № 2.



А



Б

Рис. 3. Степень резорбции пленочных матриц с ММСК КМ и морфология окружающих тканей через 2 месяца после подкожной имплантации (ув. $\times 100$; окраска гематоксилин-эозином): А – ПМ № 1; Б – ПМ № 2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Босхонджиев А.П., Бонарцев А.П., Махина Т.К. Сравнительное изучение кинетики биодеградации биополимерных систем на основе поли-3-оксибутирата // Биомед. химия. — 2009. — Т. 55, Вып. 6. — С. 702—712.

2. Волков А.В. Синтетические материалы на основе полимеров органических кислот в тканевой инженерии // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2005. — № 2. — С. 43—45.

3. Николаева Е.Д., Шишацкая Е.И., Мочалов К.Е. Сравнительное исследование клеточных носителей, полученных из резорбируемых полигидроксиалканоатов различного химического состава // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2011. — Т. 6, № 4. — С. 54—63.

4. Boiret N., Rapatel S., Veirat-Masson R. Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow // Exp. Hematol. — 2005. — Vol. 33. — P. 219—225.

5. Bolgen N., Menceloglu Y.Z., Acatay K. In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly(ϵ -caprolactone) nanofibers prepared by elec-

trospinning under different conditions // J. Biomater. Scin. Polym. Ed. — 2005. — N 16. — P. 1537—1555.

6. Dazzi F., Ramasamy R., Glennie S. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis // Blood Rev. — 2006. — Vol. 20. — P. 161—171.

7. Devine S.M., Hoffman R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation // Curr. Opin. Hematol. — 2000. — Vol. 7. — P. 358—363.

8. Hoffman A., Czichos S., Kaps S. The T-box transcription factor Brachury mediates cartilage development in mesenchymal stem cell line C3H10T1/2 // J. Cell. Sci. — 2002. — Vol. 115. — P. 769—781.

9. Neuss S., Apel C., Buttler P. et al. Assessment of stem cell/biomaterial combinations for stem cell-based tissue engineering // Biomaterials. — 2008. — N 29. — P. 302—313.

10. Pankajakshan D., Krishnan K., Krishnan L. Vascular tissue generation in response to signaling molecules integrated with a novel poly(ϵ -caprolactone)-fibrin hybrid scaffold // J. Tissue Eng. Regen. Med. — 2007. — N 1. — P. 389—397.

11. Siegel G., Shaffer R., Dazzi F. The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells // Transplantation. — 2009. — Vol. 87. — N 9. — P. 45—49.

Сведения об авторах

Антонова Лариса Валерьевна — старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН, кандидат медицинских наук (650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6; тел.: 89059060451; e-mail: antonova.la@mail.ru)

Матвеева Вера Геннадьевна — научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН (650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6; e-mail: matveeva_vg@mail.ru)

Бурого Андрей Юрьевич — ведущий научный сотрудник лаборатории ультраструктурных исследований тканей ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН, кандидат медицинских наук (650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6; e-mail: buragoandrey@mail.ru)

Кудрявцева Юлия Александровна — заведующая лабораторией новых биоматериалов ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН, доктор медицинских наук (650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6; e-mail: yulia_k1970@mail.ru)

Насонова Марина Владимировна — научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН (650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6; e-mail: nasomv@cardio.kem.ru)

Торопова Яна Геннадьевна — научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН (650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6; e-mail: yana.toropova@mail.ru)

Великанова Елена Анатольевна — младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН (650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6; e-mail: telella@mail.ru)

Головкин Алексей Сергеевич — заведующий отделом экспериментальной и клинической кардиологии, заведующий лабораторией клеточных технологий ФГБУ «НИИ КПССЗ» СО РАМН, кандидат медицинских наук (650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6; e-mail: golovkin_a@mail.ru)