

БИОСОВМЕСТИМОСТЬ СКАФФОЛДОВ ИЗ СМЕСЕЙ И СОПОЛИМЕРОВ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА И ПОЛИМОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В ТЕСТАХ С МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

Мишанин А. И.¹, Панина А. Н.¹, Больбасов Е. Н.²,
Твердохлебов С. И.², Головкин А. С.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», Томск, Россия

Контактная информация:

Головкин Алексей Сергеевич,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: golovkin_a@mail.ru

Статья поступила в редакцию
20.10.2021 и принята к печати 16.11.2021.

Резюме

Актуальность. Биodeградируемые полимеры являются одной из наиболее перспективных групп материалов, пригодных для создания тканеинженерных конструкций. Высокий интерес к биополимерам связан с возможностью создания, за счет использования смесей и сополимеров, скаффолдов с заданными свойствами. При тестировании создаваемых материалов базовым является определение ключевых параметров биосовместимости. **Цель.** В тестах *in vitro* с мезенхимальными стволовыми клетками человека провести сравнительную оценку биосовместимых свойств биополимерных скаффолдов, изготовленных из поликапролактона, полимолочной кислоты, их смесей и сополимеров методом электроспиннинга. **Материалы и методы.** При сокультивировании с мезенхимальными стволовыми клетками человека были оценены адгезионные свойства и параметры цитотоксичности скаффолдов, изготовленных из поликапролактона, полимолочной кислоты, сополимера L- и D- изоформ молочной кислоты, смесей поликапролактона и полимолочной кислоты и поликапролактона и полигликолевой кислоты, сополимеров поликапролактона и полимолочной кислоты и поликапролактона и полимолочной кислоты с добавлением полигликолевой кислоты. **Результаты.** После сокультивации наибольшее количество распластанных веретеновидных МСК на поверхности было на полимерах, содержащих полигликолевую кислоту. Кроме того, на поверхности сополимера с полигликолевой кислотой клетки имели наиболее близкую к контролю морфологию. Меньше всего живых клеток было обнаружено на поверхности скаффолдов из полимолочной кислоты, больше всего — на поверхности образцов из смеси поликапролактона и полимолочной кислоты. **Заключение.** Наилучшими адгезионными свойствами в экспериментах с мезенхимальными стволовыми клетками человека обладали биodeградируемые полимеры с добавлением полигликолевой кислоты.

Ключевые слова: Биodeградируемые полимеры, биосовместимость, полигликолевая кислота, поликапролактон, полимолочная кислота, скаффолд, смеси полимеров, сополимеры.

Для цитирования: Мишанин А.И., Панина А.Н., Больбасов Е.Н. и др. Биосовместимость скаффолдов из смесей и сополимеров поликапролактона и полимолочной кислоты в тестах с мезенхимальными стволовыми клетками. Трансляционная медицина. 2021;8(5):38-49. DOI: 10.18705/2311-4495-2021-8-5-38-49

BIOCOMPATIBILITY OF ELECTROSPINNING POLYCAPROLACTONE, POLYLACTIC ACID, THEIR BLENDS AND COPOLYMERS SCAFFOLDS IN IN VITRO TESTS IF MESENCHYME STEM CELLS

Mishanin A. I.¹, Panina A. N.¹, Bolbasov E. N.²,
Tverdokhlebov S. I.², Golovkin A. S.¹

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia

Corresponding author:

Alexey S. Golovkin,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.

E-mail: golovkin_a@mail.ru

Received 20 October 2021; accepted
16 November 2021.

Abstract

Background. Biodegradable polymers are one of the most promising groups of materials suitable for creating tissue-engineered scaffolds. The high interest in biopolymers is associated with the possibility of creating scaffolds with desired properties, through the use of mixtures and copolymers. The determination of the key parameters of biocompatibility is the basic purpose for testing created materials. **Objective.** To perform the comparative in vitro study of biocompatibility properties of biopolymer scaffolds produced using polycaprolactone, polylactic acid, their mixtures and copolymers by electrospinning technology. **Design and methods.** The adhesion properties and cytotoxicity of scaffolds made from polycaprolactone, polylactic acid, copolymer of L- and D-isoforms of lactic acid, their mixtures and co-polymers with the addition of polyglycolic acid were investigated after scaffolds co-cultivation with human mesenchyme stem cells (MSC). **Results.** The largest number of spread spindle-shaped MSCs was on the surface of polymers containing polyglycolic acid. Besides, the cells on the surface of the copolymer with polyglycolic acid had the morphology closest to the control. The lowest number of living cells was found on the surface of polylactic acid scaffolds, and the highest on the surface of samples from of polycaprolactone and polylactic acid blend. **Conclusion.** Thus, all tested polymers had good adhesion properties in experiments with human mesenchyme stem cells were possessed by biodegradable polymers with the addition of polyglycolic acid.

Key words: Biocompatibility, biodegradable polymers, copolymers, polycaprolactone, polyglycolic acid, polylactic acid, polymer blends, scaffolds.

For citation: Mishanin AI, Panina AN, Bolbasov EN, et al. Biocompatibility of electrospinning polycaprolactone, polylactic acid, their blends and copolymers scaffolds in in vitro tests if mesenchyme stem cells. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2021; 8(5):38-49. (In Russ.) DOI:10.18705/2311-4495-2021-8-5-38-49

Актуальность

В настоящее время терапия многих заболеваний основана на принципах регенерации, зачастую предполагая введение в организм пациента тканеинженерных конструкций. Методы тканевой инженерии позволяют управлять регенерацией

органа посредством моделирования оптимальных свойств используемого в качестве каркаса материала. Современная парадигма биосовместимости предполагает активное участие биоматериалов протезов в запуске репаративных процессов организма реципиента, включающих пролиферацию,

миграцию и адгезию на поверхности имплантируемых конструкций клеток различных типов, а также, при необходимости, запуск их дифференцировки в желаемом направлении [1, 2].

Тканеинженерные эквиваленты тканей и органов должны быть как можно более приближены по своему составу и характеристикам к соответствующим структурам. Однако для многих задач медицинской практики до сих пор не разработаны подходящие материалы, пригодные для конструирования протезов. В связи с этим последние десятилетия активно ведутся исследования, направленные на поиск оптимальных биоматериалов для применения в различных областях медицины [3].

На протяжении многих лет тканеинженерные конструкции проектировали таким образом, чтобы биоматериалы, входящие в их состав, сохраняли инертность в организме пациента, минимизируя нежелательные иммунные реакции в отношении имплантата [4]. Однако в настоящее время большое распространение при создании различных протезов получил подход, предполагающий активное взаимодействие биоматериала с тканями реципиента для запуска физиологического ответа, активирующего пролиферацию и/или дифференцировку клеток в месте имплантации [3].

Одной из перспективных групп материалов, способных удовлетворить современным требованиям, которые предъявляют к изделиям медицинского назначения, применяемым в регенеративной медицине, стали биodeградируемые полимеры [5]. К ним относятся, среди прочих, различные алифатические полиэфиры, такие как поли-L-лактид (PLA), поли-D-лактид, поли-D,L-лактид (PLDL), полигликолид (PGS), поли-ε-капролактон (PCL) и их сополимеры, например, поли-D,L-лактид-ко-гликолид и полилактид-ко-капролактон. Они различаются по растворимости, кристалличности, температуре плавления, механическим свойствам, а также времени биodeградации [6].

На сегодняшний день такие биodeградируемые полимеры, как поликапролактон, полимолочная и полигликолевая кислоты, уже находят применение в медицинской практике. Так, полигликолевая кислота активно применяется хирургами в качестве шовного материала DEXON® с 1970 года [7]. Смеси, изготовленные с использованием полигликолида, тестируются в качестве скаффолдов для регенерации хрящей, костей, связок и зубов. Полимолочная кислота используется в качестве костного фиксатора Fixsorb® [8]. Поликапролактон используется для разработки систем адресной доставки лекарств в места повреждений [5]. В настоящий момент перечисленные полимеры считаются

наиболее перспективными для конструирования тканеинженерных протезов различных органов, однако многие исследователи подчеркивают необходимость их модифицирования и комбинирования в различных соотношениях для достижения желаемых свойств [2].

Одним из достоинств биodeградируемых полимеров, помимо того, что они способны элиминироваться из организма в процессе регенерации поврежденных органов, является возможность моделирования поверхности изготовленных из них скаффолдов. Одним из популярных методов изготовления скаффолдов, позволяющих контролировать их структуру и тем самым создавать оптимальное топографическое решение для конкретной прикладной задачи, является метод электроспиннинга [9].

Цель

В тестах *in vitro* с мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) человека провести сравнительную оценку адгезионных свойств биополимерных скаффолдов, изготовленных из поликапролактона, полимолочной кислоты, их смесей и сополимеров методом электроспиннинга.

Материалы и методы

Образцы скаффолдов из биodeградируемых полимеров

Все тестируемые скаффолды были изготовлены методом электроспиннинга с использованием установки NANON-01A (MECC CO. Япония) в Томском политехническом университете. Для изготовления скаффолдов вне зависимости от тестируемых групп были использованы следующие технологические параметры. Напряжение формирования 30 кВ, расстояние от инжектора до сборочного коллектора 140 мм. Тип инжектора — игла 22 G. Тип сборочного коллектора — стальной цилиндр из нержавеющей стали размером 10×200 мм. Частота вращения коллектора 50 об/мин. Скорость подачи прядильного раствора 6 мл/час. Прядильные растворы готовили, растворяя соответствующий полимерный материал в гексафторизопропанол (Sigma, США) при температуре 24 °C в течение 12 часов, используя герметичный стеклянный реактор, до получения однородной прозрачной вязкой жидкости. После формирования скаффолд отделяли от сборочного коллектора и помещали в вакуум 5×10^{-3} Па на 24 часа для удаления остаточных растворителей.

В исследование были включены скаффолды, изготовленные из следующих полимерных материалов:

- Поликапролактон (Polycaprolactone (PURASORB® PC 12, PURAC, Gorkum, Netherlands), PCL);

- Полимолочная кислота (Poly-L-lactic acid (PURASORB® PL 38, PURAC, Gorkum, Netherlands), PLA);
- Сополимер L- и D- изоформ молочной кислоты (L-lactide/D-lactide copolymer (PURASORB® PLDL 8038, PURAC, Gorkum, Netherlands), PLDL);
- Смесь поликапролактона и полимолочной кислоты (Polycaprolactone + Poly-L-lactic acid, PCL PLA);
- Смесь поликапролактона и полигликолевой кислоты (Polycaprolactone + Polyglycolide (PURASORB® PGS, PURAC, Gorkum, Netherlands), PCL PGS);
- Сополимер поликапролактона и полимолочной кислоты (L-lactide/Caprolactone copolymer (PURASORB® PLC 7015, PURAC, Gorkum, Netherlands), PLC7015);
- Сополимер поликапролактона и полимолочной кислоты с добавлением полигликолевой кислоты (L-lactide/Caprolactone copolymer + Polyglycolide, PLC7015 PGS).

Мезенхимальные стволовые клетки человека

Забор жировой ткани для получения МСК проводился в ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» у здоровых доноров. Исследование было одобрено Этическим комитетом Центра им. В. А. Алмазова (№ 12.26/2014; 1 декабря 2014 г.). Все биологические тесты были выполнены в соответствии с Хельсинкской Декларацией. От всех пациентов было получено информированное согласие на проведение процедуры. После забора материал — 1 г жировой ткани из окологрудинной области — помещали в одноразовую пробирку. В стерильных условиях культурального бокса ткань фрагментировали до однородной массы ресуспендированием и переносили в культуральные чашки диаметром 35 мм с раствором DMEM (Lonza, Бельгия):коллагеназа 1 типа (Worthington, США) в соотношении 1:1. Инкубацию в растворе проводили при 37 °C в течение 30 минут — 1 часа. После этого суспензию центрифугировали при 500g 5-10 минут. Надосадочную жидкость удаляли, к осадку добавляли среду для культивирования и переносили на флаконы 75 см² (BD, США).

Для культивирования МСК использовали среду α -MEM (Modified Eagle's Medium) (ПанЭко, Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Hyclone, США), 100 мкг/мл стрептомицина (Invitrogen, США), 100 ЕД/мл пенициллина (Invitrogen, США), 2 mM L-глутамин (Invitrogen, США). Клетки культивировали во влажной атмосфере с 5 % содержанием CO₂ при 37 °C до достижения ими 70-80 % конфлюэнтного монослоя. Для дезинтеграции монослоя клетки сначала промыва-

ли стерильным 0,01M фосфатно-солевым буфером (PBS) (Биолот, Россия) (pH 7,3-7,5), затем добавляли 0,125 % раствор трипсина-ЭДТА (Gibco, США) и помещали в CO₂-инкубатор на 3-5 минут. После этого к суспензии открепившихся клеток добавляли полную питательную среду с сывороткой для ингибирования трипсина и снимали клетки с флакона, затем центрифугировали при 300g в течение 5 минут, осадок ресуспендировали в свежей питательной среде. Подсчет клеток проводили в камере Нойбауэра. До проведения экспериментов МСК культивировали в стерильных флаконах 75 см². Для экспериментов использовали МСК 3-5 пассажей.

Оценка адгезии клеток на биodeградируемых скаффолдах

Стерильные фрагменты скаффолдов стандартной формы и размеров помещали в лунки 24-луночного плоскодонного планшета (Corning, США). Далее в лунки вносили суспензию клеток в концентрации 100 000 клеток на лунку. Контролями служили лунки с покровными стеклами. Планшет помещали во влажную атмосферу с 5 % содержанием CO₂ при 37 °C на трое суток, после чего проводили фиксацию образцов с адгезированными на них клетками. Для этого кусочки скаффолдов перекладывали в чистые лунки и быстро отмывали в PBS от остатков питательной среды в течение нескольких секунд. После этого из лунок отбирали PBS и вносили 4 % раствор параформальдегида (ПФА) (Sigma, США) на 15-20 минут. Затем образцы с фиксированными клетками промывали в PBS от остатков ПФА 3 раза по 3 минуты. Планшеты с образцами в PBS хранили до проведения окраски и дальнейшего исследования при 4 °C.

Для оценки адгезии клеток на скаффолдах из биodeградируемых полимеров проводили иммуноцитохимическое окрашивание образцов антителами к белку цитоскелета винкулину. Образцы с клетками обрабатывали 0,05 % раствором Triton X-100 (AppliChem, Германия) на PBS в течение 3 минут. Затем проводили 3 отмывки по 3 минуты в PBS. Для уменьшения неспецифического связывания антител образцы обрабатывали 1 % раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Amresco, США) на PBS в течение 30 минут. По истечении инкубации раствор BSA удаляли и вносили в лунки первичные мышинные моноклональные антитела к человеческому винкулину (VLN01) (Invitrogen, США) в разведении 1:200 в 1 % BSA-PBS и инкубировали 1 час при комнатной температуре. После этого образцы трехкратно отмывали в PBS и вносили вторичные козы анти-мышинные антитела IgG, меченные флуоро-

хромом Alexa Fluor 488 (Life Technologies, США) в разведении 1:1000 в 1→ BSA-PBS на 1 час при комнатной температуре. Далее проводили 3 отмывки в PBS от остатков антител. Для окрашивания ядер клеток использовали интеркалирующий краситель DAPI (AppliChem, Германия). Стоковый раствор (5 мг/мл) разводили в PBS в соотношении 1:30 000. Окрашивание проводили в течение 15 секунд, после чего образцы трехкратно отмывали от остатков DAPI в PBS. До проведения визуализации образцы хранили в PBS в темноте при +4 °С. Покровные стекла с клетками из контрольных лунок монтировали на предметные стекла с использованием среды для заключения препаратов.

Визуализацию клеток на полимерных скаффолдах проводили при помощи инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert (Zeiss, Германия) и совместимого фотоаппарата Canon. Кусочки материалов с клетками помещали между двумя предметными стеклами. Флуоресценцию DAPI и Alexa Fluor 488 регистрировали с использованием соответствующих фильтров. Фотографировали по 10 разных полей зрения при увеличениях x20 и x40 для каждого технического повтора. В каждом эксперименте (биологическом повторе) проводили по 3 технических повтора с каждым типом образцов.

Полученные изображения были проанализированы с использованием программного обеспечения FIJI, для чего были разработаны макросы для подсчета количества ядер клеток, окрашенных DAPI, а также для расчета суммарной площади клеток

на образцах по выделению областей с высоким флуоресцентным сигналом по зеленому каналу (в котором регистрировалось свечение вторичных антител к винкулину) (рис. 1). Далее рассчитывали среднюю площадь, занимаемую одной клеткой на образце, в программе MS Excel по формуле:

$$\text{Средняя площадь одной клетки, мкм}^2 = \frac{\text{площадь изображения, мкм}^2}{\text{суммарная площадь клеток на образце, мкм}^2}$$

Для расчетов использовали изображения, полученные при увеличении x20. Для иллюстративного материала подготавливали изображения, полученные при увеличении x40, с использованием плагина ScientiFig для FIJI.

Оценка жизнеспособности МСК при сокультивировании с биodeградируемыми скаффолдами

На 3 сутки после посева клеток на полимерные скаффолды образцы отмывали от остатков среды в PBS и обрабатывали 3 % раствором трипсина в течение 5-7 минут, ориентируясь на степень открепления клеток в контрольных лунках. Затем к клеткам добавляли раствор 10 % ЭТС на PBS для нейтрализации фермента. Клетки ресуспендировали и переносили в пробирки, центрифугировали в течение 3 минут при 300g, удаляли надосадочную жидкость. К осадку добавляли аннексин V, меченный FITC (BioLegend, США), йодид пропи-

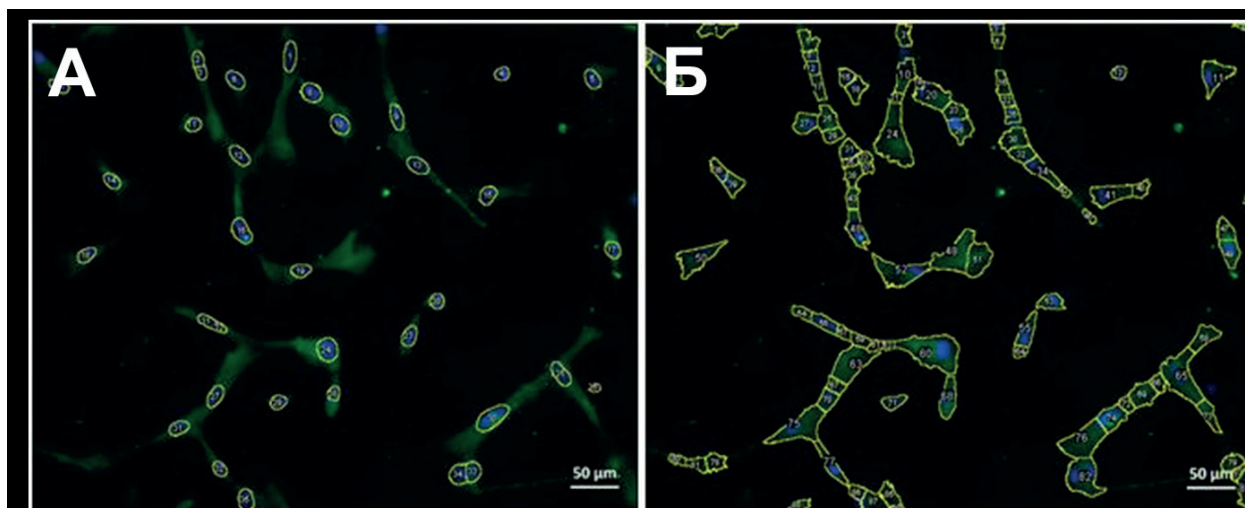


Рис. 1. Пример работы макроса по подсчету ядер, окрашенных DAPI (А), и выделению контуров клеток, окрашенных антителами к винкулину (Б), по интенсивности флуоресценции в соответствующих каналах

Figure 1. An example of the macros operation for counting nuclei stained with DAPI (A) and stained with antibodies to vinculin (B), according to the fluorescence intensity in the corresponding channels

дия (PI) (BioLegend, США) и кальцийсодержащий буфер (BioLegend, США) в соответствии с рекомендациями производителей. Содержимое тщательно перемешивали и инкубировали 20 минут в темноте при комнатной температуре. До проведения анализа клетки хранили в темноте при 4 °C.

Затем процент живых клеток, клеток в раннем апоптозе, а также клеток на поздних стадиях апоптоза и погибших определяли, используя метод проточной цитометрии (Guava EasyCyte, Millipore, Германия). Первоначальное гейтирование клеток проводили в линейных шкалах с использованием прямого и бокового светорассеивания. Настройки усиления по соответствующим каналам флуоресценции проводили с использованием интактных клеток, окрашенных изолированно аннексином V или PI, помещая негативные клетки в первую декаду логарифмической шкалы по соответствующему каналу детекции. Настройку компенсации осуществляли с использованием клеток с индуцированным апоптозом (перекись водорода 100 мкмоль), в силу отсутствия клеток, находящихся на ранних и поздних стадиях апоптоза в интактных культурах. Анализ результатов в каждой пробе выполняли после сбора не менее 3000 событий.

Для оценки и подсчета результатов использовали программное обеспечение Kaluza (Beckman Coulter). В каждом эксперименте проводили по 3

технических повтора. Статистическую обработку полученных данных проводили в компьютерной программе STATISTICA 7.0. При анализе результатов с проточного лазерного цитометра использовали t-критерий Стьюдента, результаты представляли в виде среднего значения и ошибки среднего: $M \pm m$. При анализе результатов, полученных посредством флуоресцентной микроскопии, использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни, результаты представляли в виде медианы и интерквартильного размаха: Me (25;75).

Результаты

Адгезионные свойства биodeградируемых полимеров, сополимеров и смесей

PCL и PLA, служившие базовыми образцами для сравнения с остальными полимерными скаффолдами, различались по адгезионным свойствам в отношении МСК. Количество МСК на поверхности скаффолда из PLA, относительная суммарная площадь клеток, а также степень распластанности клеток на этом образце были выше по сравнению с соответствующими параметрами для PCL (табл. 1). Как смесь, так и сополимер PCL и PLA имели наименьшее количество МСК на своей поверхности по сравнению с чистыми полимерами. Кроме того, клетки на поверхности PCL PLA имели более округлую форму, чем на PCL или PLA. МСК на поверхности PLC7015 и PLDL были менее распласта-

Таблица 1. Адгезия мезенхимальных стволовых клеток к биodeградируемым полимерам. Me (25; 75)

Table 1. Adhesion of mesenchymal stem cells to biodegradable polymers

Образец	Количество клеток на единицу площади образца (1 мм ²)	Суммарная площадь, занимаемая клетками на образце, %	Средняя площадь, занимаемая одной клеткой на образце, мкм ²
контроль	530 (427; 661)	38.5 (35.9; 42.6)	772 (607; 878)
PCL	51 (35; 64) •†	1,5 (1,1; 2,5) •†	326 (264; 377) •†
PLA	76 (64; 143) •*	3,0 (2,4; 6,1) •*	389 (354; 425) •*
PCL PLA	22 (13; 29) •*†	0,5 (0,3; 0,8) •*†	226 (201; 274) •*†
PLDL	67 (51; 86) •	2,1 (1,6; 3,0) •†	319 (292; 379) •†
PLC7015	21 (13; 32) •*†	0.6 (0.4; 1.0) •*†	286 (234; 390) •
PCL PGS	73 (51; 89) •	2,5 (2,1; 3,2) •	389 (313; 443) •
PLC7015 PGS	140 (60; 207) •*	4.9 (2.8; 6.8) •*	456 (299; 569) •

Достоверность различий: •-p < 0,001 по сравнению с контролем; *-p < 0,01 по сравнению с PCL; †-p < 0,01 по сравнению с PLA

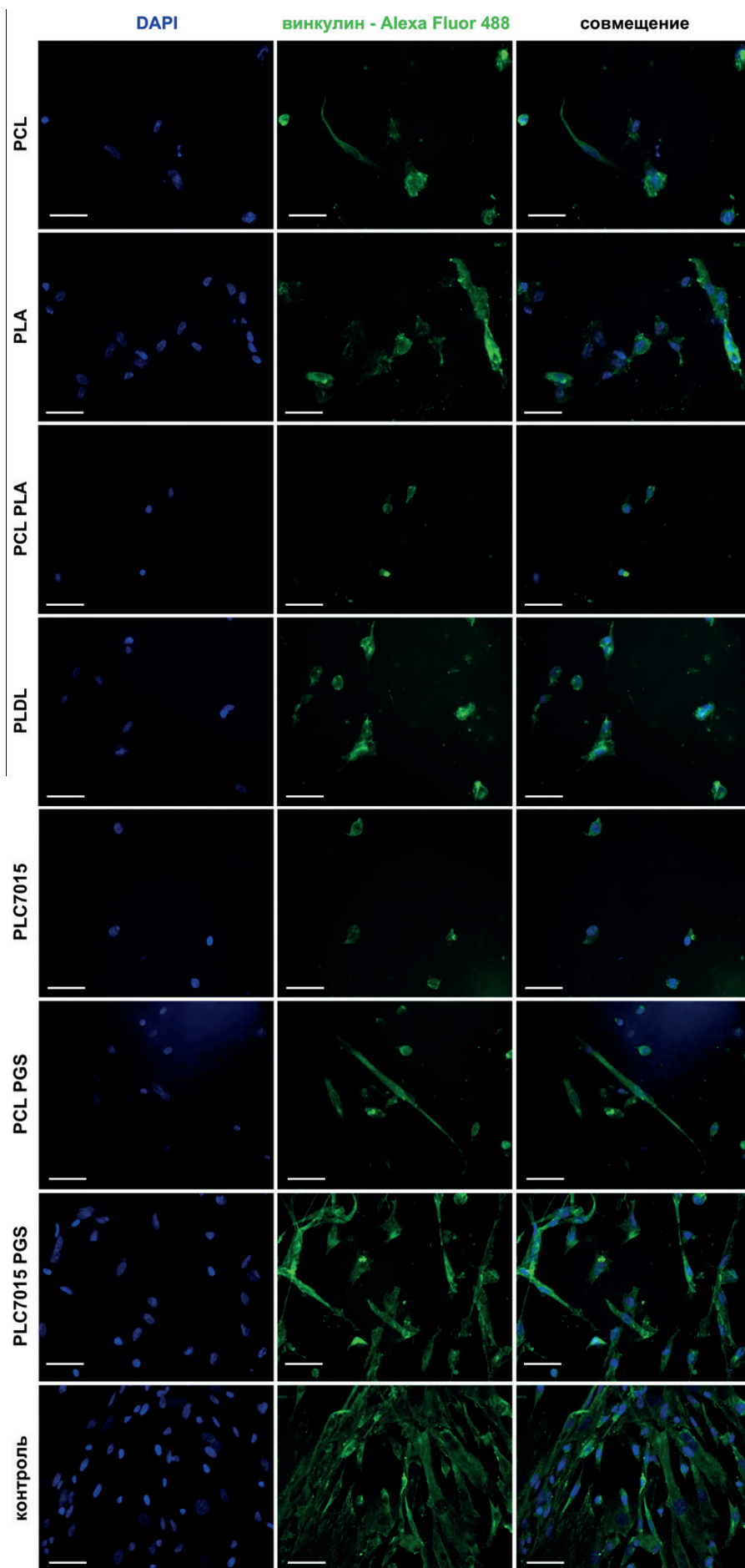


Рис. 2. Адгезия МСК на поверхности биodeградируемых полимерных скаффолдов.

Первый столбец — ядра клеток, окрашенные DAPI; второй столбец — цитоплазматическая локализация винкулина в МСК (визуализация конъюгированного с вторичными антителами флуорохрома Alexa Fluor 488 по каналу FITC); третий столбец — совмещение каналов. Масштабная линейка — 50 мкм

Figure 2. MSC adhesion on the surface of biodegradable polymer scaffolds.

The first column is cell nuclei stained with DAPI; the second column — cytoplasmic localization of vinculin in MSCs (visualization of Alexa Fluor 488 fluorochrome conjugated with secondary antibodies by the FITC channel); the third column is the alignment of the channels. Scale bar — 50 microns

ны, чем на PLA, однако существенных различий с PCL не имели (рис. 2).

Наибольшим количеством распластанных веретеновидных МСК на поверхности обладали полимеры, содержащие полигликолевую кислоту (PCL PGS, PLC7015 PGS) (рис. 2). На поверхности PLC7015 PGS МСК имели наиболее близкую к контролю морфологию. В том числе, у некоторых клеток были обнаружены фокальные контакты с поверхностью полимера в виде отчетливых коротких полос локализации винкулина в цитоплазме отростков клеток, схожие с контролем (рис. 3). На поверхности других полимерных скаффолдов отчетливых сайтов фокальной адгезии клеток не наблюдалось.

Жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток при сокультивировании с биodeградируемыми скаффолдами

По сравнению с контролем МСК на стекле, на поверхности всех исследуемых скаффолдов, кроме PLC7015 и PLC7015 PGS, количество живых клеток было ниже. Меньше всего живых клеток было обнаружено на поверхности PLA, больше всего — на поверхности PCL PLA (табл. 2).

Обсуждение

Проведенное тестирование биополимеров с позиции их адгезионного потенциала и жизне-

способности адгезировавшихся клеток продемонстрировало некоторую противоречивость результатов. Так, для полимолочной кислоты неплохой адгезионный потенциал сочетался с повышенной клеточной гибелью. PLDL обладал средней биосовместимостью при сокультивировании. PCL PLA обладал низкими адгезионными свойствами в отношении МСК, однако на его поверхности было обнаружено наибольшее количество жизнеспособных клеток. Такие параметры, как количество МСК, а также суммарная площадь, ими занимаемая, были снижены при культивировании этих клеток на поверхности PLC7015. С другой стороны, площадь, занимаемая одной клеткой на образце, была сравнима с PCL, который показал себя лучше по остальным характеристикам.

Для того чтобы быть признанными в качестве оптимальных материалов для создания тканеинженерных конструкций, новые биоматериалы должны успешно пройти множественные *in vitro* и *in vivo* испытания. При этом такие характеристики материалов, как жесткость, способность к резорбции в организме и скорость биodeградации, топография поверхности, обращенной к клеткам и тканям организма, смачиваемость и наличие модификаций, могут как увеличить шансы скаффолда на приживание, так и привести к неудачным операциям. К конструированию искусственного

Таблица 2. Жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток при сокультивировании с биodeградируемыми полимерами

Table 2. Viability of mesenchymal stem cells when co-cultivated with biodegradable polymers

Образец	Живые клетки, %	Клетки, находящиеся на ранних стадиях апоптоза, %	Погибшие клетки и клетки, находящиеся на поздних стадиях апоптоза, %
контроль	95.1 ± 0.6	2.5 ± 0.4	2.3 ± 0.3
PCL	89.6 ± 0.7 •	5.6 ± 0.3 •	4.8 ± 0.5
PLA	82.3 ± 2.2 •	8.1 ± 0.7 •	9.5 ± 1.4 •
PCL PLA	91.8 ± 0.3 •†	4.8 ± 0.4 †	3.3 ± 0.1 †
PLDL	89.7 ± 1.3 †	4.7 ± 0.6 †	5.5 ± 0.7 †
PLC7015	92.4 ± 1.3 †	3.0 ± 1.0 †	4.5 ± 0.2 •†
PCL PGS	83.9 ± 2.6	7.1 ± 0.7 •	8.8 ± 2.1
PLC7015 PGS	91.2 ± 1.3	3.3 ± 0.1 *†	5.5 ± 1.5

•-p < 0,01 по сравнению с контролем;

*-p < 0,01 по сравнению с PCL;

†-p < 0,05 по сравнению с PLA.

эквивалента каждого конкретного органа или ткани организма предъявляются разные требования, и, соответственно, ожидаются разные результаты тестирования [5, 10].

Оценка адгезионных и цитотоксических свойств биоматериалов, потенциально пригодных к созданию, например, протезов сосудов малого диаметра, основана на том, что скаффолды должны обладать способностью к эндотелизации

и привлечению к месту имплантации прогениторных клеток [11]. Соответственно, применительно к нашей экспериментальной модели, перспективные биодеградируемые скаффолды должны обладать высоким адгезионным потенциалом и низкими цитотоксическими свойствами.

По результатам исследования поликапролактон обладал низкой биосовместимостью в отношении МСК. Это согласуется с большим массивом литера-

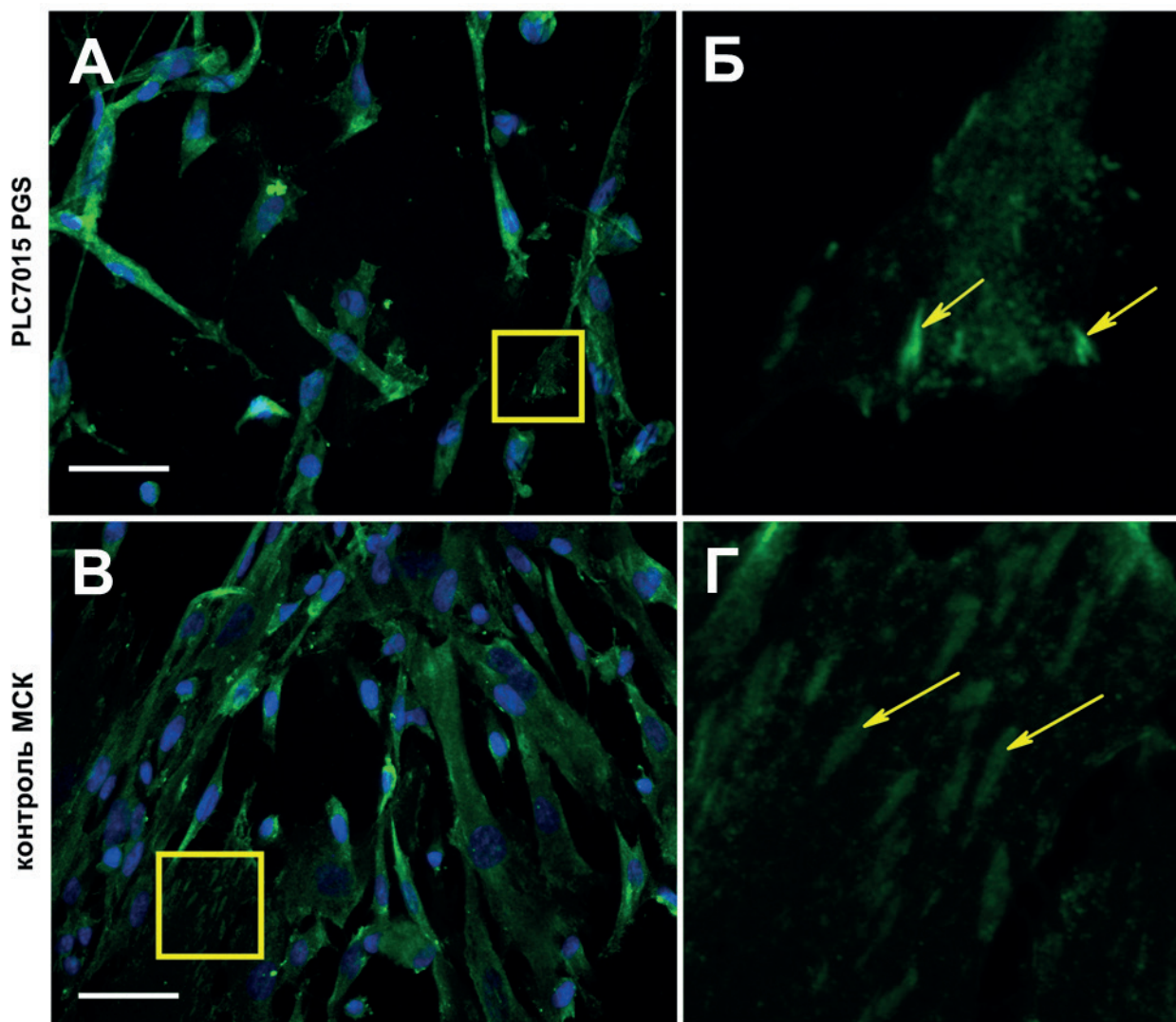


Рис. 3. Фокальные контакты, формируемые МСК на поверхности PLC7015 PGS и в контрольных лунках на стекле.

А, В — увеличение микроскопа $\times 40$; Б, Г — вставки, обозначенные рамкой на соответствующих фотографиях слева. Стрелки указывают на фокальные контакты МСК с поверхностью субстрата, видимые как короткие полосы локализации винкулина в цитоплазме. Масштабная линейка — 50 мкм

Figure 3. Focal contacts formed by MSCs on the surface of the PLC7015 PGS and in the control wells on the glass.

А, В — microscope magnification $\times 40$; В, D — inserts indicated by a frame in the corresponding photographs on the left. Arrows indicate focal contacts of MSCs with the substrate surface, visible as short bands of vinculin localization in the cytoplasm. Scale bar — 50 microns

турных данных, подтверждающих необходимость модификации этого полимера с целью увеличения его адгезионных свойств и, в целом, повышения биосовместимости [12, 13]. Однако встречаются исследования, в которых PCL проявлял себя лучше, чем другие полимеры. Например, PCL по сравнению с PLA и сополимером PLA и PGS показал себя лучше в экспериментах по оценке биосовместимости с макрофагами [14]. Скорее всего, биосовместимость PCL определяется в первую очередь параметрами топографии поверхности материала, такими как толщина фибрилл, размер пор, а также выбранной клеточной моделью.

Нами было показано, что PLA показала лучшие адгезионные свойства по сравнению с PCL. В то же время анализ жизнеспособности клеток на поверхности PLA выявил повышенное количество клеток в стадии раннего и позднего апоптоза и некроза. Это не согласуется с большей частью исследований, в которых PLA, напротив, является материалом сравнения в качестве наименее токсичного при исследованиях биосовместимых свойств *in vitro* [5, 15]. Однако многими исследователями подчеркиваются потенциальные отрицательные эффекты продукта деградации PLA — молочной кислоты на запуск воспалительного процесса *in vivo* [6]. В одном из исследований была показана цитотоксичность молочной кислоты *in vitro* в отношении МСК костного мозга крысы при превышении порога ее концентрации в культуральной среде, равного 20 ммоль/л. При этом было установлено, что критическое влияние на жизнеспособность клеток оказывает изменение уровня pH, сопровождающее увеличение содержания этого соединения в среде [16]. В другом исследовании оказалась значимой также роль самой молочной кислоты как химического соединения [17]. Возможно, происходит накопление молочной кислоты при сокультивировании материала с клетками или, по крайней мере, pH среды изменяется до критического значения, в частности из-за метаболической активности клеток. Авторы двух последних вышеприведенных экспериментальных статей рекомендуют при изготовлении тканеинженерных конструкций использовать PLA с небольшим молекулярным весом и большим размером пор для обеспечения быстрого и более эффективного элиминирования молочной кислоты из организма.

Особенности параметров биосовместимости материалов, а также присущих им физико-механических свойств определили стратегию дальнейшего развития технологий изготовления тканеинженерных конструкций из биodeградируемых полимеров, подразумевающую создание различных смесей и сополимеров. Такой подход призван

сохранить достоинства и приуменьшить недостатки каждого отдельного компонента [5].

В теории, изготовление механических смесей PLA и PCL позволяет контролировать пластичность итогового материала в зависимости от соотношения компонентов [18]. PCL имеет хорошую эластичность, но слишком большую жесткость. Напротив, PLA отличается хрупкостью, что может привести к спаданию, например, протеза сосуда, изготовленного из этого полимера. Как результат, возможно развитие истончений, аневризм, тромбозов протезов сосудов [19]. Примененная модель с равным соотношением компонентов, использованная в нашем исследовании для изготовления смеси PCL и PLA, дала противоречивые результаты.

Смесь PCL и PLA, в противоположность PLA, обладала сниженным адгезионным потенциалом, но при этом характеризовалась повышенным удельным содержанием живых клеток на поверхности материала. Высокая доля жизнеспособных клеток на поверхности этого скаффолда согласуется с литературными данными, подчеркивающими улучшение биосовместимых свойств PLA при добавлении PCL [18]. В теории, PCL в смеси с PLA приобретает более гидрофильные свойства, благоприятные для адгезии клеток. С другой стороны, снижается вероятность накопления чрезмерного количества кислых продуктов деградации PLA из-за снижения ее содержания в конечном полимере. В подтверждение этих гипотез можно привести исследование, в котором было показано, что морфология клеток NIH 3T3 при культивировании на поверхности смеси PCL и PLA была более близкой к контролю, чем при культивировании на PLA [20]. Вместе с тем, авторы данного исследования также проводили оценку влияния разных режимов электроспиннинга на свойства смесей PCL и PLA и показали, что условия формирования имеют значение при оценке биосовместимых свойств полученных скаффолдов. Кроме того, соотношение компонентов в смесях, примененных в исследовании (80:20 PLA:PCL), отличалось от использованного нами (70:30 PLA:PCL).

Сополимер PLC и PLA обладал относительно низким адгезионным потенциалом. В результате очевидна необходимость модификаций этого сополимера для увеличения биосовместимых свойств. Исследования в этом направлении уже проводятся и показывают улучшение результатов при введении в сополимер PCL и PLA дополнительных компонентов [21].

Интересные результаты были получены при культивировании МСК на поверхности PLDL. Удовлетворительные адгезионные свойства сочетались с высокой долей живых клеток на поверхности об-

разцов. Литературные данные подтверждают близкую к контролю морфологию клеток различных типов при культивировании на поверхности PLDL, а также высокую жизнеспособность клеток [22, 23].

В нашем исследовании мы также тестировали биосовместимые свойства смеси PCL и PGS. Полигликолевая кислота отличается выраженными адгезионными свойствами, однако в связи с трудностями в подборе растворителей возникают проблемы в создании смесей, содержащих этот полимер [5]. PCL PGS показал средние биосовместимые свойства в отношении МСК, характеризуясь небольшим количеством распластанных клеток на своей поверхности. Однако следует отметить, что при культивировании на этом материале мы наблюдали активное проникновение отростков клеток в толщу скаффолда, из-за чего клетки на фотографиях в ряде случаев казались округлыми. В условиях *in vivo* этот процесс осуществляется при взаимодействии клеток с внеклеточным матриксом и активной миграции клеток, поэтому такие наблюдения *in vitro* могут свидетельствовать о запуске миграционной активности клеток в системе сокультивирования с PCL PGS.

Считается, что PGS является перспективным полимером для улучшения биосовместимых свойств не только PCL, но и PLA. Отсутствие дополнительной метильной группы в химической структуре PGS делает этот полимер менее гидрофобным и менее устойчивым к гидролизу по сравнению с PLA [24]. В связи с этим полимеры имеют разное время деградации, и при изготовлении смесей и сополимеров PLA и PGS появляется возможность регулировать этот параметр для каждой конкретной задачи, варьируя соотношение компонентов. При увеличении скорости деградации таких смесей и сополимеров также снижается вероятность воспалительных реакций в ответ на накопление молочной и гликолевой кислот, так как они будут быстрее элиминироваться из организма [6]. В связи с этим полигликолевую кислоту было решено добавить также к сополимеру PLC7015.

PLC7015 PGS характеризовался высоким адгезионным потенциалом в отношении МСК. Это согласуется с литературными данными. Так, было показано, что при добавлении к поликапролактону сополимера PGS и PLA цитотоксический эффект материала в отношении различных типов клеток млекопитающих снижался [14].

Средние размеры (площади) клеток при культивировании в контрольных лунках соответствовали литературным данным [25, 26]. Однако при сокультивировании с биodeградируемыми скаффолдами практически во всех случаях площадь одной клетки оказывалась меньше описанной физиологической

нормы для *in vitro* культивирования. Это коррелировало с отсутствием признаков активной адгезии клеток на материалах — распластности и формирования комплексов фокальной адгезии. В случае с МСК наблюдали образование фокальных контактов с PLC7015 PGS, но степень распластности клеток была ниже по сравнению с контролем.

Выводы

Наилучшими адгезионными свойствами в экспериментах с мезенхимальными стволовыми клетками человека обладали биodeградируемые полимеры из поликапролактона и сополимера поликапролактона и полимолочной кислоты с добавлением полигликолевой кислоты (PCL PGS, PLC7015 PGS).

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Благодарности / Acknowledgments

Работа выполнена в рамках Государственного задания №2021-40.

Список литературы / References

- Williams DF. There is no such thing as a biocompatible material. *Biomaterials*. 2014; 35(38): 10009–14. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.08.035.
- Khademhosseini A, Langer R. A decade of progress in tissue engineering. *Nat Protoc*. 2016; 11(10): 1775–81. DOI: 10.1038/nprot.2016.123.
- Place ES, Evans ND, Stevens MM. Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nat Mater*. 2009; 8(6): 457–70. DOI: 10.1038/nmat2441.
- Santos AR, Ferreira BMP, Duek EAR, Dolder H, Wada MLF. Use of blends bioabsorbable poly(L-lactic acid)/poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) as surfaces for Vero cell culture. *Brazilian J Med Biol Res*. 2005; 38(11): 1623–32. DOI: 10.1590/s0100-879x2005001100009.
- Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical applications of biodegradable polymers. *J Polym Sci Part B Polym Phys*. 2011 Jun; 49(12): 832–64. DOI: 10.1002/polb.22259.
- Tesfamariam B. Bioresorbable vascular scaffolds : Biodegradation , drug delivery and vascular remodeling. *Pharmacol Res*. 2016; 107: 163–71. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.03.020.
- Katz AR, Turner RJ. Evaluation of tensile and absorption properties of polyglycolic acid sutures. *Surg Gynecol Obstet*. 1970; 131(4): 701–16.
- Ueda H, Tabata Y. Polyhydroxyalkanoate derivatives in current clinical applications and trials. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003; 55(4): 501–18. DOI: 10.1016/s0169-409x(03)00037-1.
- Sell SA, McClure MJ, Garg K, Wolfe PS, Bowlin GL. Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue

- engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009; 61(12): 1007–19. DOI: 10.1016/j.addr.2009.07.012.
10. Viknianshchuk AN, Mishanin AI, Tverdokhlebov SI, et al. Approaches to biomaterials testing according to modern biocompatibility paradigm. *Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine.* 2017; 4(1): 29–40. In Russian. [Викнянчук А.Н., Мишанин А.И., Твердохлебов С.И. и др. Подходы к тестированию биоматериалов с позиции современной парадигмы биосовместимости. *Трансляционная медицина.* 2017; 4(1): 29–40]. DOI: 10.18705/2311-4495-2017-4-1-29-40.
11. Tsaryk R, Peters K, Unger RE, Feldmann M, Hoffmann B, Heidenau F, et al. Improving cytocompatibility of Co28Cr6Mo by TiO2 coating: Gene expression study in human endothelial cells. *J R Soc Interface.* 2013; 10(86): 20130428. DOI: 10.1098/rsif.2013.0428.
12. Antonova LV, Matveyeva VG, Borisov VV, et al. Impact of various modifications of biodegradable membranous scaffolds surface on multipotent mesenchymal stromal cells adhesion and viability. *Biulleten sibirskoi meditsiny=Bulletin of Siberian Medicine.* 2012; 11(4): 5–12. In Russian. [Антонова Л.В.; Матвеева В.Г.; Борисов В.В. и др. Влияние различных вариантов модификации поверхности биodeградируемых пленочных матриц на адгезию и жизнеспособность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. *Бюллетень сибирской медицины.* 2012; 4: 5–13]. DOI: 10.20538/1682-0363-2012-4-5-12.
13. Alvim Valente C, Cesar Chagastelles P, Fontana Nicoletti N, Ramos Garcez G, Sgarioni B, Herrmann F, et al. Design and optimization of biocompatible polycaprolactone/poly (l-lactic-co-glycolic acid) scaffolds with and without microgrooves for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res — Part A.* 2018; 106(6): 1522–34. DOI: 10.1002/jbm.a.36355.
14. Potnis P. A., Tesfamariam B. WSC, Potnis PA, Tesfamariam B, Wood SC. Induction of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase and apoptosis by biodegradable polymers in macrophages: implications for stents. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011; 57(6): 712–20. DOI: 10.1097/FJC.0b013e31821a4f1e.
15. Tsou CH, Kao BJ, Yang MC, Suen MC, Lee YH, Chen JC, et al. Biocompatibility and characterization of polylactic acid/styrene-ethylene-butylene/styrene composites. *Biomed Mater Eng.* 2015; 26(Suppl 1): S147–54. DOI: 10.3233/BME-151300.
16. He Y, Pan Z, Ding JD. Effects of degradation media of polyester porous scaffolds on viability and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Acta Polym Sin.* 2013; 58(6): 755–64. DOI: 10.3724/SP.J.1105.2013.12439.
17. Chen T, Zhou Y, Tan WS. Influence of lactic acid on the proliferation, metabolism, and differentiation of rabbit mesenchymal stem cells. *Cell Biol Toxicol.* 2009; 25(6): 573–86. DOI: 10.1007/s10565-008-9113-7.
18. Chen L, Bai Y, Liao G, Peng E, Wu B, Wang Y, et al. Electrospun Poly(L-lactide)/Poly(ε-caprolactone) Blend Nanofibrous Scaffold: Characterization and Biocompatibility with Human Adipose-Derived Stem Cells. *PLoS One.* 2013; 8(8): e71265. DOI: 10.1371/journal.pone.0071265.
19. Piechota-Polanczyk A, Jozkowicz A, Nowak W, Eilenberg W, Neumayer C, Malinski T, et al. The Abdominal Aortic Aneurysm and Intraluminal Thrombus: Current Concepts of Development and Treatment. *Front Cardiovasc Med.* 2015; 2(19). DOI: 10.3389/fcvm.2015.00019.
20. Zhang C, Zhai T, Turng LS. Electrospinning of poly(lactic acid)/polycaprolactone blends: Investigation of the governing parameters and biocompatibility. *J Polym Eng.* 2018; 38(4): 409–17. DOI: 10.1515/polyeng-2017-0194.
21. Tsou CH, Yao WH, Lu YC, Tsou CY, Wu CS, Chen J, et al. Antibacterial property and cytotoxicity of a poly(lactic acid)/nanosilver-doped multiwall carbon nanotube nanocomposite. *Polymers (Basel).* 2017; 9(3): 1–13. DOI: 10.3390/polym9030100.
22. Li RY, Liu ZG, Liu HQ, Chen L, Liu JF, Pan YH. Evaluation of biocompatibility and toxicity of biodegradable poly (DL-lactic acid) films. *Am J Transl Res.* 2015; 7(8): 1357–70.
23. Más BA, De Luna Freire DC, De Melo Cattani SM, Motta AC, Barbo MLP, De Rezende Duek EA. Biological Evaluation of PLDLA Polymer Synthesized as Construct on Bone Tissue Engineering Application. *Mater Res.* 2016; 19(2): 300–7. DOI: 10.1590/1980-5373-MR-2015-0559.
24. Santos Jr. AR. Tissue Engineering: Bioresorbable Polymers for Tissue Engineering. 2010; 225–46. Daniel Eberli (Ed.), ISBN: 978-953-307-079-7, InTech, DOI: 10.5772/8580.
25. Jiménez N, Krouwer VJD, Post JA. A new, rapid and reproducible method to obtain high quality endothelium in vitro. *Cytotechnology.* 2013; 65(1): 1–14. DOI: 10.1007/s10616-012-9459-9.
26. Biggs MJP, Fernandez M, Thomas D, Cooper R, Palma M, Liao J, et al. The Functional Response of Mesenchymal Stem Cells to Electron-Beam Patterned Elastomeric Surfaces Presenting Micrometer to Nanoscale Heterogeneous Rigidity. *Adv Mater.* 2017; 29(39). DOI: 10.1002/adma.201702119.

Информация об авторах:

Мишанин Александр Игоревич, младший научный сотрудник, Группа генно-клеточной инженерии, Институт молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава РФ;

Панина Алиса Николаевна, аспирант, Институт молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава РФ;

Большасов Евгений Николаевич, к.т.н., научный сотрудник, Томский политехнический университет;

Твердохлебов Сергей Иванович, к. ф.-м. н., доцент, руководитель лаборатории, Томский политехнический университет;

Головкин Алексей Сергеевич, д.м.н., руководитель группы генно-клеточной инженерии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава РФ.

Author information:

Mishanin Alexander I., researcher, Institute of molecular biology and genetics, Almazov National medical research centre;

Panina Alice N., PhD student, Institute of molecular biology and genetics, Almazov National medical research centre;

Bolbasov Evgeny N., PhD, researcher, Tomsk polytechnic university;

Tverdokhlebov Sergey I., PhD, assistant professor, Tomsk polytechnic university.

Golovkin Alexey S., DrSci, MD, group leader, Almazov National medical research centre.