

DOI: 10.15825/1995-1191-2018-2-82-90

БИОСОВМЕСТИМЫЕ И МАТРИКСНЫЕ СВОЙСТВА ПОЛИЛАКТИДНЫХ ГУБОК

В.И. Севастьянов¹, А.М. Григорьев¹, Ю.Б. Басок¹, Л.А. Кирсанова¹,
В.Н. Василец^{1, 2}, А.П. Малкова³, Г.А. Духина³, Т.Е. Григорьев^{4, 5},
Ю.Д. Загоскин⁴, К.В. Токаев⁶, Т.К. Токаев⁷

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГБУН «Институт энергетических проблем химической физики РАН им. В.А. Тальрозе», Черноголовка, Российская Федерация

³ АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», Москва, Российская Федерация

⁴ ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Российская Федерация

⁵ ФГБУ «Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук», Москва, Российская Федерация

⁶ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

⁷ ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Российская Федерация

Целью работы явилось исследование биосовместимых и матриксных свойств образцов полилактидных губок как потенциальных материалов при создании имплантируемых медицинских изделий, клеточно- и тканеинженерных конструкций. **Материалы и методы.** Биосовместимость полилактидных губок в виде пористых дисков (ПД ПЛА), полученных методом лиофилизации, оценивали *in vitro* методами УФ-спектроскопии, рН-метрии, по цитотоксичности относительно фибробластов мыши NIH/3T3 при культивировании в статических условиях. При исследовании биосовместимости *in vivo* использовали метод подкожной имплантации образцов крысам. Матриксные свойства ПД ПЛА (способность поддерживать адгезию и пролиферацию клеток) исследовали с использованием мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч), культивируемых в проточном биореакторе. **Результаты.** В условиях проведенных экспериментов *in vitro* полилактидные губки, полученные методом лиофильной сушки, соответствуют требованиям, предъявляемым к биосовместимым медицинским изделиям, по показателям изменения рН и оптической плотности водного экстракта из ПД ПЛА, а также по цитотоксичности образцов относительно фибробластов мыши NIH/3T3. При культивировании МСК ЖТч в гепатогенной среде в присутствии ПД ПЛА наблюдается активная адгезия и пролиферация МСК ЖТч как на поверхности, так и в объеме пористого матрикса. Вместе с тем при подкожной имплантации образцов процесс резорбции ПД ПЛА сопровождается асептической воспалительной реакцией тканей, прилегающих к имплантату. **Заключение.** Таким образом, следует с большой осторожностью по положительным результатам исследований *in vitro* биологической безопасности и матриксных свойств имплантатов рекомендовать их для создания биомедицинских клеточно- и тканеинженерных конструкций. Показана необходимость предварительного изучения биомеханических характеристик имплантата.

Ключевые слова: полилактиды, пористый матрикс, цитотоксичность, имплантационный тест, мезенхимальные стволовые клетки, биореактор.

Для корреспонденции: Севастьянов Виктор Иванович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел.: (499) 196-88-74, (916) 173-41-84. E-mail: viksev@yandex.ru

For correspondence: Sevastianov Viktor Ivanovich. Address: 1, Shchukinskaya st., Moscow, 123182, Russian Federation.
Tel.: (499) 196-88-74, (916) 173-41-84. E-mail: viksev@yandex.ru

BIOCOMPATIBLE AND MATRIX PROPERTIES OF POLYLACTIDE SCAFFOLDS

V.I. Sevastianov¹, A.M. Grigoriev¹, Yu.B. Basok¹, L.A. Kirsanova¹, V.N. Vasilets^{1, 2}, A.P. Malkova³, G.A. Dukhina³, T.E. Grigoriev^{4, 5}, Yu.D. Zagoskin⁴, K.V. Tokaev⁶, T.K. Tokaev⁷

¹ V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

² V.L. Talrose Institute for Energy Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Russian Federation

³ Institute of Biomedical Research and Technology, Moscow, Russian Federation

⁴ National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, Russian Federation

⁵ A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation

⁶ National Medical Research Center of Phthisiopulmonology and Infection Diseases of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

⁷ Moscow City Research and Practical Center for Tuberculosis Treatment, Moscow Health Department, Moscow, Russian Federation

Aim. A study of biocompatible and matrix properties of polylactide scaffolds as a materials for medical implanted articles as well as scaffolds for cell and tissue engineering constructions. **Materials and methods.** Biocompatibility of polylactide scaffolds in the form of porous disks obtained by freeze drying method was estimated *in vitro*: by UV spectroscopy, pH measurements and cytotoxicity to NIH/3T3 mice fibroblasts in static conditions. Biocompatibility of scaffolds *in vivo* was investigated by its implantation under mice skin. Matrix properties of polylactide scaffolds (cell adhesion and proliferation) were studied in dynamic conditions with mesenchymal stromal cells of human adipose tissue (MSC ADh) in perfusion bioreactor. **Results.** As a result of *in vitro* investigations it was shown that polylactide scaffolds obtained by freeze drying are satisfied to demands presenting biocompatible medical articles with respect to pH measurements, extraction tests and cyto toxicity to mice fibroblasts NIH/3T3. Cultivation of MSC ADh in perfusion bioreactor in hepatogenic media is accompanying by good adhesion and proliferation both on the surface and in the bulk of porous disks. However implantation of polylactide scaffolds under mice skin is accompanying by resorption and leads to the inflammation reaction of adjacent tissues. **Conclusions.** Positive results obtained only by *in vitro* testing of biocompatibility and matrix properties are not enough to recommend the material to be used as a scaffolds for cell and tissue engineering constructions. The preliminary study of biomechanical characteristics of the implant is recommended.

Key words: polylactide scaffold, cytotoxicity, implantation test, mesenchymal stromal cells, bioreactor.

ВВЕДЕНИЕ

Биорезорбируемые синтетические полимеры, такие как полигидроксикарбоновые кислоты (полигликолиды, полилактиды и их сополимеры), широко применяют для создания 3D-пористых матриксов, используемых при изготовлении тканеинженерных конструкций в тканевой инженерии и регенеративной медицине [1].

Имплантаты, изготовленные из этого класса полимеров, характеризуются достаточно хорошими биосовместимыми свойствами. Средние сроки полной резорбции этих полимеров в организме, зависящие от множества различных физико-химических, биологических, морфологических и геометрических факторов [2], колеблются от нескольких месяцев до нескольких лет [3]. Для изготовления пористых матриксов используются различные технологии, такие как лиофилизация [4], гель-сублимационная сушка [5] выщелачивание [7], электроспиннинг [7],

сверхкритический CO₂ [8], термически индуцированное фазовое разделение [9] и 3D-принтирование [1, 10]. Полученные при этом пористые материалы могут быть использованы как в качестве 3D-матриксов в клеточно- и тканеинженерных конструкциях [10], так и для разработки систем доставки лекарств путем введения лекарственных средств внутрь матрикса [11]. Наиболее часто полилактидные полимерные матриксы используются при создании тканеинженерных конструкций для выращивания хрящевой ткани [10], костной [12] и мышечной ткани [13]. Например, авторы [12] культивировали бычьи хондроциты на пористом матриксе из полилактидгликолида, покрытого коллагеном. Полученную таким образом клеточно-инженерную конструкцию имплантировали подкожно мышам на срок от 2 до 8 недель. После этого квазихрящевую ткань эксплантировали и исследовали ее гистологию и физико-механические свойства. По всем гистологическим и физико-механическим

параметрам полученные образцы были близки к хрящевой ткани. В частности, жесткость и модуль Юнга образца составляли 69 и 55% от соответствующих величин, наблюдаемых для нативного хряща. Особый интерес представляет создание тканеинженерных конструкций на основе полилактидов с участием мезенхимальных стволовых клеток. Авторы [14] исследовали клеточно-инженерную конструкцию, состоящую из полученного методом электроспиннинга матрикса из полилактида с желатином и стволовых клеток костного мозга. Данную конструкцию помещали в гепатогенную питательную среду, содержащую факторы роста гепатоцитов, и выдерживали в течение семи дней. Показано, что матрикс из полилактида стимулирует активную адгезию и пролиферацию стволовых клеток костного мозга, а также частичную дифференцировку их в гепатоцито-подобные клетки при культивировании в стационарных условиях.

Имеются также отдельные публикации по применению резорбируемых имплантатов из полимерных материалов для коллапсохирургического лечения легкого [15].

Известно, что биосовместимые и функциональные свойства имплантатов из ПЛА, в том числе используемых для клеточной инженерии, зависят от технологии их изготовления, которая может существенно влиять на структурные и физико-химические свойства объема и поверхности изделия [16].

Целью данной работы явилось исследование *in vitro* и *in vivo* биосовместимых и матриксных свойств полилактидных губок, полученных методом лиофильной сушки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поли-L-лактид (ПЛА) (NatureWorks, США, молекулярная масса 200 кДа) растворяли в 1,4-диоксане в течение одних суток при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Концентрация полимера в растворе составляла 3 вес.%. Раствор замораживали при температуре -20°C и подвергали лиофилизации с использованием лиофильной сушки MartinChrist ALPHA 2-4LSC в течение 2 суток с последующим изготовлением образцов полилактидных губок в форме пористых дисков из ПЛА (ПД ПЛА) диаметром 25 мм, высотой 5 мм. Образцы стерилизовали автоклавированием при 121°C в течение 20 минут. Никаких изменений в форме и структуре образца после стерилизации не выявлено.

На рис. 1 показана микрофотография низкотемпературного скола ПД ПЛА, полученного методом сканирующей электронной микроскопии при низком ускоряющем напряжении 1 кВ. Как видно из микрофотографии, средний диаметр взаимосвязанных пор ~ 100 мкм, толщина стенок около 1 мкм, пористость $\sim 97\%$.

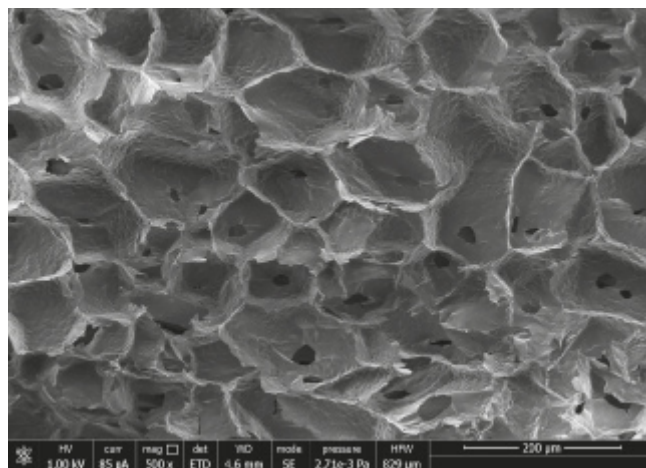


Рис. 1. Микрофотография низкотемпературного скола ПД ПЛА. Сканирующий электронный микроскоп Helios D435

Fig. 1. SEM image of low temperature cleavage of poly(lactide) disk. Scanning electron microscope Helios D435

При тестировании физико-химических (санитарно-химических) свойств ПД ПЛА [17] объектами исследования служили водные вытяжки из образцов, полученные в следующих условиях: соотношение площади поверхности ПД ПЛА и объема экстрагирующей жидкости – $1,6 : 1 \text{ см}^2/\text{мл}$, продолжительность экстракции – 1 сутки при температуре 37°C . В качестве экстрагирующей жидкости и контрольного раствора использовали дистиллированную воду ($\text{pH} = 6,1$). При анализе вытяжек определяли изменение водородного показателя (ΔpH) на анализаторе жидкости Seven Compact S220-Basic и спектр ультрафиолетового поглощения от 220 до 360 нм (спектрофотометр «Lambda 25»), позволяющего оценить суммарное количество веществ, мигрирующих из образцов.

Значения pH вытяжек рассчитывали как среднее арифметическое трех параллельных определений, pH контрольного раствора – как среднее арифметическое двух параллельных определений с учетом оценки приемлемости полученных результатов при доверительной вероятности 0,95. Изменение pH (ΔpH) рассчитывали по формуле:

$$\Delta\text{pH} = \text{pH}_в - \text{pH}_к,$$

где $\text{pH}_в$ – pH вытяжки; $\text{pH}_к$ – pH контрольного раствора.

Допустимые значения изменения pH водных вытяжек: $\Delta\text{pH} = \pm 1,0$.

Измерения спектров УФ-поглощения водных вытяжек в диапазоне длин волн от 220 до 360 нм, позволяющих оценить по значению оптической плотности суммарное количество веществ, мигрирующих из образцов, проводили в кварцевых кюветах ($l = 10$ мм). В качестве раствора сравнения использова-

ли дистиллированную воду. Максимальное значение оптической плотности (D) в измеряемом диапазоне длин волн рассчитывали как среднее арифметическое двух параллельных определений с учетом оценки приемлемости полученных результатов при доверительной вероятности 0,95. Допустимое значение оптической плотности $D = 0,300 \pm 0,030$.

Цитотоксичность образцов ПД ПЛА исследовали в соответствии с ГОСТ ISO 10993-5-2011 [18] методом прямого контакта образцов с культурой фибробластов мыши линии NIH 3T3, полученных из коллекции перевиваемых соматических клеток позвоночных ГУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН» (ГУ НИИВ РАМН).

В асептических условиях фибробласты мыши высевали в культуральные плоскостонные 6-луночные планшеты и инкубировали (24 ± 2) ч при температуре 37°C в стандартных условиях во влажной атмосфере, содержащей (5 ± 1)% CO_2 . На поверхность образовавшегося (80 ± 10)% монослоя клеток помещали исследуемые образцы. Через (24 ± 2) ч инкубации визуально оценивали морфологию и лизис клеток по стандартной методике с использованием биологического микроскопа Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Япония). Отрицательным контролем была эмбриональная телячья сыворотка, положительным контролем – стандартный раствор цинка в азотной кислоте (9,95 мг Zn в 1–2 вес.% HNO_3 , разведение 1 : 200 раствором 0,9% NaCl для инъекций). Полученные результаты цитотоксической реакции культуры NIH/3T3 интерпретировали с использованием таблицы.

Для оценки биосовместимости образцов ПД ПЛА *in vivo* использовали имплантационный тест [19]. Эксперименты выполняли на половозрелых аутбредных крысах (самках). ПД ПЛА и контрольные образцы (образцы отшлифованного нейтрального стекла) имплантировали крысам в подкожную ткань. Для

каждого периода оценки биологической реакции (2 и 4 недели) использовали по 5 животных. За каждым животным наблюдали в течение всего периода исследования, регистрируя данные о любых патологических признаках, включая местные и системные реакции, отклонения в поведении животных. В конце эксперимента животных подвергали эвтаназии методом декапитации (с предварительной анестезией). Имплантат извлекали вместе с достаточным количеством окружающей его ткани для оценки местной тканевой реакции, фиксировали в 10–15% растворе нейтрального формалина с последующей заливкой в парафин. Готовили срезы толщиной 5–7 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином по стандартной методике. Биологическую реакцию оценивали путем классификации и документирования макроскопической и гистологической реакций в исследуемые интервалы времени. Гистологические препараты исследовали методом световой микроскопии с помощью биологического микроскопа Leica DM 1000 (Leica Microsystems CSC GmbH, Германия). Оценку тканевых реакций проводили, сопоставляя данные по имплантации образца ПД ПЛА с контрольным.

Матриксные свойства ПД ПЛА (способность поддерживать адгезию и пролиферацию клеток) исследовали с использованием мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч), культивируемых в модифицированном варианте проточного биореактора [20].

Культуры МСК ЖТч были получены из подкожной жировой клетчатки при информированном согласии от здоровых доноров в ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России. Клетки выделяли из жировой ткани по стандартной методике [21]. В эксперименте использовали клетки 3-го пассажа, которые культивировали в ростовой среде для клеток печени. В состав ростовой среды входили: культуральная среда Williams'E («Thermo Fisher scientific», США), эмбриональная телячья сыворотка (HyClone®, HyClone UK Ltd) – 10%; HEPES («Thermo Fisher scientific», США) – 1%, антибиотик-антимикотик («Thermo Fisher scientific», США) – 1%; Cell Maintenance Supplement («Thermo Fisher scientific», США).

Образцы ПД ПЛА предварительно инкубировали в той же культуральной среде в течение суток в CO_2 -инкубаторе при стандартных условиях. На поверхность ПД ПЛА наносили $2,9 \times 10^6$ клеток МСК ЖТч 3-го пассажа. Полученные клеточно-инженерные конструкции (КИК) помещали в две культуральные ячейки биореактора (по одной в каждую) и инкубировали в статике в течение 2 ч для прикрепления клеток к поверхности ПД ПЛА. Дальнейшую инкубацию КИК в биореакторе проводили в проточном режиме со скоростью потока культуральной среды 0,2 мл/мин при 37°C в стандартных условиях во влажной ат-

Таблица

Степень ответной реакции клеток
Value of cell response

Степень реакции	Реакция	Описание реакционной зоны
0	Отсутствует	Нет никакой реакции клеток вокруг образца и под ним
1	Незначительная	Некоторые клетки под образцом имеют измененную морфологию или разрушены
2	Нерезкая	Зона лизиса клеток ограничивается площадью под образцом
3	Умеренная	Зона лизиса распространяется на 1 см вокруг образца
4	Резкая	Зона лизиса распространяется больше чем на 1 см вокруг образца

мосфере, содержащей $(5 \pm 1)\%$ CO_2 с однократной сменой ростовой среды на 7-е сутки инкубации. Количество адгезированных клеток на ПД ПЛА и их пролиферативную активность оценивали на 7-е и 14-е сутки инкубации КИК в биореакторе в режиме потока. Гистологический анализ образцов проводили путем окрашивания гематоксилином и эозином согласно стандартной методике. Образцы, фиксированные в 10% забуференном растворе формалина, промывали в течение 15 мин в проточной воде и обезвоживали в спиртах восходящих концентраций (в двух сменах 70%, 80%, 96% этанола; по 5 мин в каждой смене спиртового раствора), выдерживали по 5–7 мин в смеси этанола и хлороформа, в хлороформе и заливали в парафин. Срезы толщиной 4–5 мкм, полученные с помощью микротомы Leica RM3255, депарафинировали, регидратировали и окрашивали. Анализ и фотосъемку полученных препаратов проводили, используя микроскоп Nikon Eclipse («Nikon Corporation», Япония), оснащенный цифровой фотокамерой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из полученных для образцов ПД ПЛА значений изменений pH водных вытяжек ($\Delta\text{pH} = 0,22 \pm 0,01$) и оптической плотности в диапазоне длин волн 220–360 нм ($0,056 \pm 0,005$) следует, что исследуемые образцы по данным санитарно-химическим (физико-химическим) показателям соответствуют требованиям ГОСТ Р 52770-2016 [19].

Исследования цитотоксичности *in vitro* ПД ПЛА показали, что вокруг дисков образуется монослой

клеток 3Т3/NIH без признаков лизиса клеток (реакция отсутствует, см. табл. 1). Следовательно, в условиях данного эксперимента образцы ПД ПЛА не оказывают цитотоксического действия на культуру фибробластов мыши линии NIH/3Т3 и соответствуют требованиям ГОСТ ISO 10993-5–2011 [18].

При проведении имплантационного теста [19] через 14 сут в препаратах контрольных образцов (рис. 2, а) на месте извлеченного имплантата определяется соединительно-тканная капсула, окруженная рыхлой соединительной тканью, в которой наблюдаются новообразованные сосуды, макрофаги и одиночные гигантские клетки инородных тел (ГКИТ). Выявляется очаговое перикапсулярное кровоизлияние. В гистологических препаратах образцов полилактидной губки (рис. 2, б) на данном сроке наблюдения вокруг ПД ПЛА наблюдается формирование соединительно-тканной капсулы. Капсула неплотная, неодинаковой толщины, местами разволокненная. В окружающей ткани обнаруживаются многочисленные новообразованные кровеносные сосуды, макрофаги и немногочисленные ГКИТ.

Периферическая зона диска активно резорбируется многочисленными ГКИТ. Определяются участки частичной фрагментации полилактидного диска. В центральной части образца, сохраняющей ячеистую структуру, наблюдается появление фибробластов, макрофагов и кровеносных сосудов. Выявляются перикапсулярные и субкапсулярные кровоизлияния.

В гистологических препаратах контрольных образцов (рис. 3, а) на месте извлеченного имплантата

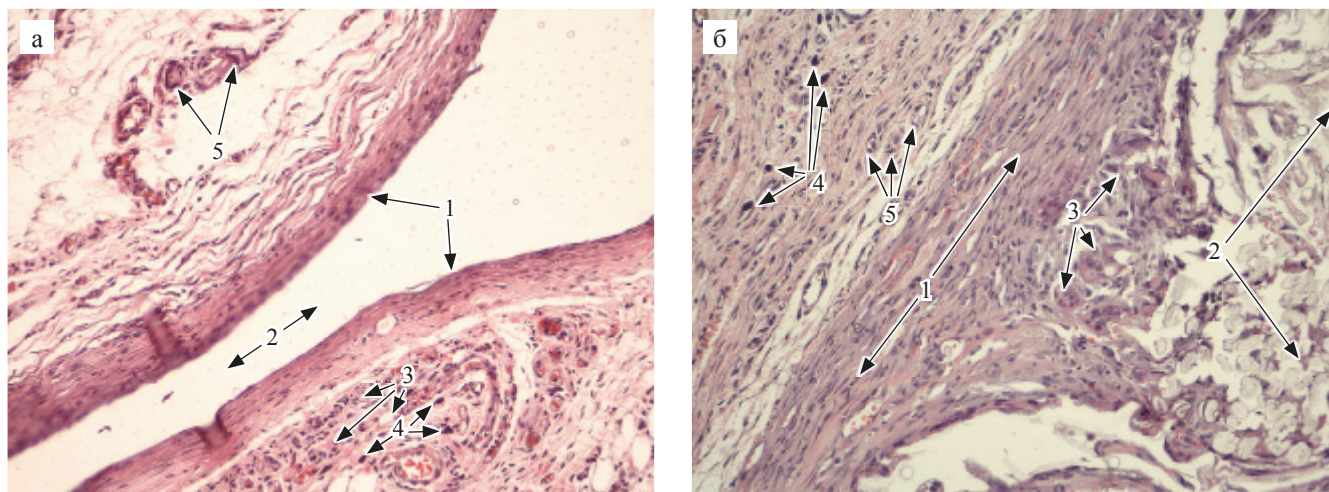


Рис. 2. Гистологическая картина реакции соединительной ткани на имплантат: а – контрольный образец (отшлифованное нейтральное стекло): 1 – соединительная капсула; 2 – место извлеченного имплантата; 3 – кровеносные сосуды; 4 – макрофаг; 5 – ГКИТ; б – образец ПД ПЛА: 1 – соединительная капсула; 2 – ПД ПЛА; 3 – ГКИТ; 4 – макрофаг; 5 – кровеносные сосуды. Срок подкожной имплантации 14 суток. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$

Fig. 2. Histological picture of connective tissue reaction to implant: а – control sample (polished neutral glass): 1 – connecting capsule; 2 – place of explantation; 3 – blood vessels; 4 – neutrophil; 5 – macrophage; б – sample of PLA: 1 – connective capsule; 2 – porous disk; 3 – foreign body giant cells; 4 – macrophage; 5 – blood vessels. Time of implantation – 2 weeks. Painted by hematoxyline and eosine. $\times 200$

через 28 суток определяется сформированная плотная соединительно-тканная капсула с превалированием межклеточного компонента и пенитрированная капиллярами. В окружающей капсулу ткани обнаруживаются новообразованные кровеносные сосуды и немногочисленные макрофаги. Гигантские клетки инородных тел на данном сроке наблюдения не выявляются.

В препаратах образцов ПД ПЛА наблюдается дальнейшая активная макрофагальная резорбция полилактидной губки. Большая часть имплантированного образца занята ГКИТ и компонентами соединительной ткани. В сохранивших первоначальную структуру участках ПД ПЛА выявляются макрофаги и фибробласты. Соединительно-тканная капсула вокруг имплантата неплотная, неодинаковой толщины, пенитрированная кровеносными сосудами и частично разволокненная. В окружающей капсулу ткани обнаруживаются многочисленные новообразованные сосуды, макрофаги (примерно в том же количестве, что и на предыдущем сроке) и одиночные, что свидетельствует о продолжающейся воспалительной реакции. Выявляются перикапсулярные и субкапсулярные кровоизлияния.

Из полученных результатов следует, что при подкожной имплантации образцов ПД ПЛА на 28-е сутки продолжается воспалительная реакция с образованием соединительно-тканной капсулы вокруг резорбирующегося имплантата. Интенсивная резорбция ПД ПЛА связана, с одной стороны, высокопористой структурой имплантата и снижением pH среды, обусловленным продуктом гидролитической деструкции

ПЛА – молочной кислотой [22], а с другой – существенным вкладом клеточной деструкции за счет появления в зоне воспаления макрофагов и ГКИТ. Столь активная воспалительная реакция в эксперименте *in vivo* на фоне отсутствия цитотоксичности *in vitro* и активной неоваскуляризации может быть следствием контактного травмирования прилежащих мягких тканей. При автоклавировании образцы нагревали до 121 °С в течение 20 минут, что привело к значительному повышению степени кристалличности ПД ПЛА, так как температура стеклования данного полилактида около 60° С. Учитывая изначально высокий модуль упругости ПД ПЛА – около 1,6 МПа, материал после стерилизации может значительно превышать модуль упругости прилежащих мягких тканей. Данное исследование показывает важность предварительного изучения биомеханических характеристик имплантата с учетом конкретной области его применения.

При исследовании матричных свойств ПД ПЛА относительно МСК ЖТч забор образцов из культуральных ячеек биореактора проводили на 7-е и 14-е сутки эксперимента, по два образца для каждого интервала времени. При визуальном осмотре никаких изменений во внешнем виде и механической прочности образцов выявлено не было. Отсутствие макроскопических признаков деструкции ПД ПЛА в культуральных средах в проточном биореакторе на 14-е сутки эксперимента подтверждает определяющую роль клеточной деструкции образцов при их подкожной имплантации на ранних сроках (до 28-х суток).

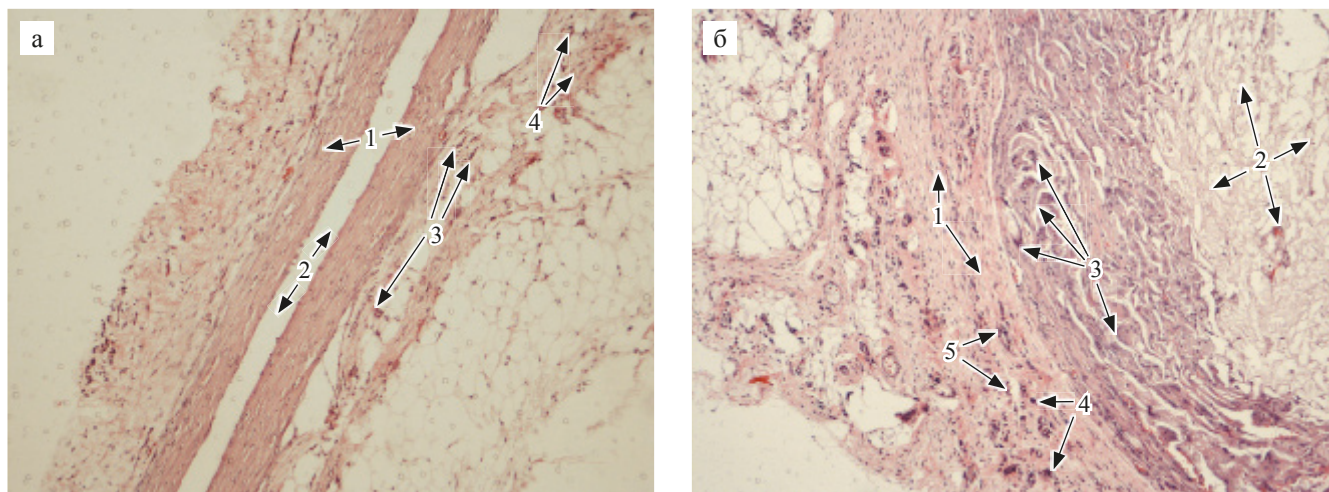


Рис. 3. Гистологическая картина реакции соединительной ткани на имплантат: а – контрольный образец (отшлифованное нейтральное стекло): 1 – соединительная капсула; 2 – место извлеченного имплантата; 3 – кровеносные сосуды; 4 – макрофаг; б – образец ПД ПЛА: 1 – соединительная капсула; 2 – ПД ПЛА; 3 – ГКИТ; 4 – макрофаг; 5 – кровеносные сосуды. Срок подкожной имплантации 28 суток. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$

Fig. 3. Histological picture of connective tissue reaction to implant: a – control sample (polished neutral glass): 1 – connecting capsule; 2 – place of explantation; 3 – blood vessels; 4 – macrophage; б – sample of PLA: 1 – connective capsule; 2 – porous disk; 3 – foreign body giant cells; 4 – macrophage; 5 – blood vessels. Time of implantation – 4 weeks. Painted by hematoxyline and eosine. $\times 200$

На 7-е сут инкубирования в проточном биореакторе образца КИК, состоящего из ПД ПЛА и МСК ЖТч, в гистологической картине КИК наблюдали мелкоячеистую структуру полилактидной губки, на периферии которого были выявлены многочисленные тяжи МСК ЖТч. Причем на некоторых участках ПД ПЛА из-за скоплений клеток элементы структуры образца выделить невозможно (рис. 4). Морфология адгезированных на ПД ПЛА клеток фибробластоподобная, характерная для нормального роста культуры МСК ЖТч на поверхности культурального пластика. Видна активная пролиферация клеток, о чем свидетельствует наличие митозов в клетках в центральной части препарата (рис. 5). Отметим, что клетки распределены по всей толщине образца с максимальной плотностью на периферии диска. На 14-е сут наблюдали сформировавшиеся клеточные пласты на поверхности ПД ПЛА (рис. 6 и 7).

Для сравнения отметим, что авторы работы [14] проводили дифференцировку МСК костного мозга человека в гепатоцитарном направлении на сетках из поли-L-молочной кислоты со средним диаметром волокна 410 нм в стационарных условиях. О произошедшей дифференцировке клеток свидетельствовала экспрессия гепатоцит-специфичных маркеров: α -фетопротеина, альбумина и цитокератина С18. Также полученные гепатоцит-подобные клетки проявляли метаболическую и синтетическую активность, что выражалось в активности цитохрома Р450 и выработке альбумина на 28-е сутки эксперимента. Однако авторы отметили более низкий уровень лекарственно-индуцированной активности цитохрома Р450 по

сравнению со взрослыми гепатоцитами. Кроме того, в отличие от нашей проточной схемы описываемые гепатоцит-подобные клетки располагались только на поверхности матрикса, не проникая между волокнами.

Torok et al. [23] культивировали первичные гепатоциты крыс на дисках из поли-L-молочной кислоты с размером пор от 200 до 400 мкм в проточном биореакторе. Было показано, что в таких условиях гепатоциты демонстрируют детоксикационную активность СУР3А4 при метаболизме лидокаина с образованием моноэтилглицинксилидида. Также была установлена способность обезвреживания аммиака клетками и сохранение в них запасов гликогена по окончании эксперимента. Однако срок культивирования живых гепатоцитов не превышал 6 суток.

Авторы [24] установили, что сокультивирование гепатоцитов с МСК костного мозга в динамических условиях позволило сохранить большинство функций клеток печени в течение 2 недель. Отметим, что проточный биореактор наиболее эффективно имитирует физиологические условия, обеспечив питание клеток, транспорт к ним газов и выведение продуктов обмена веществ за счет постоянной замены культуральной среды.

Показанная в нашей работе активная пролиферация МСК ЖТч в условиях потока, происходящая как на поверхности, так и в объеме ПД ПЛА, указывает на перспективность культивирования в проточном биореакторе клеточно-инженерной конструкции на основе ПД ПЛА.

Однако из полученных неудовлетворительных результатов при оценке биосовместимости ПД ПЛА в

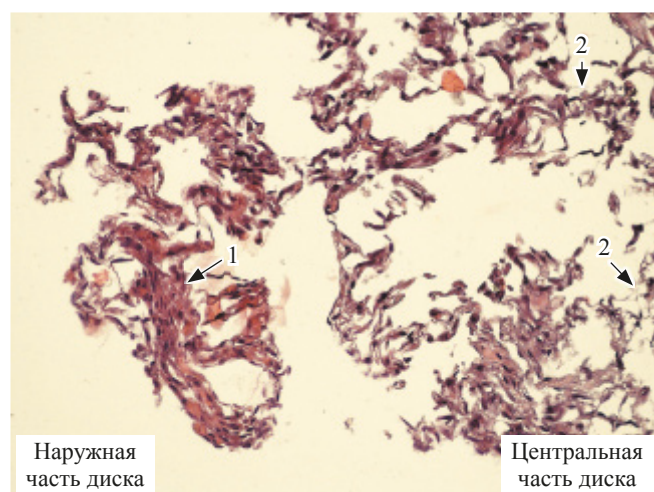


Рис. 4. Гистологическая картина клеточно-инженерной конструкции на основе ПЛА через 7 суток культивирования в условиях потока при скорости 0,2 мл/мин: 1 – скопления клеток; 2 – фрагменты диска. Окрашивание гематоксилином и эозином. $\times 200$

Fig. 4. Histological picture of tissue engineering construction based on PLA after 7 days of cultivation at flow rate 0.2 ml/min: 1 – cell accumulation; 2 – disk fragments. Painted by hematoxyline and eosine. $\times 200$

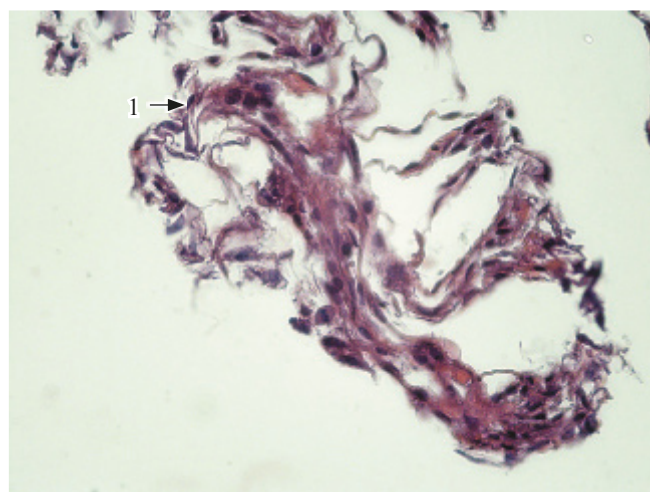


Рис. 5. Гистологическая картина клеточно-инженерной конструкции на основе ПЛА через 7 суток культивирования в условиях потока при скорости 0,2 мл/мин: 1 – скопления клеток. Окрашивание гематоксилином и эозином. $\times 400$

Fig. 5. Histological picture of tissue engineering construction based on PLA after 7 days of cultivation at flow rate 0.2 ml/min: 1 – cell accumulation. Painted by hematoxyline and eosine. $\times 400$

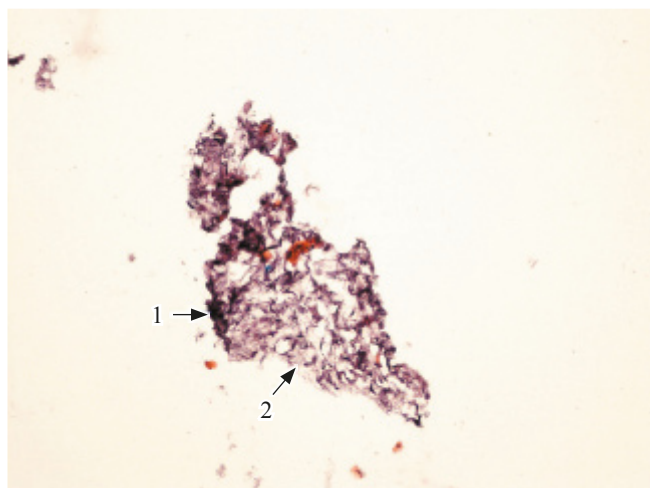


Рис. 6. Гистологическая картина клеточно-инженерной конструкции на основе ПД ПЛА через 14 суток культивирования в условиях потока при скорости 0,2 мл/мин: 1 – скопления клеток; 2 – фрагменты диска. Окрашивание гематоксилином и эозином. $\times 100$

Fig. 6. Histological picture of tissue engineering construction based on PLA after 14 days of cultivation at flow rate 0.2 ml/min: 1 – cell accumulation; 2 – disk fragments. Painted by hematoxyline and eosine. $\times 100$

имплантационном тесте следует, что нельзя только по исследованиям биологической безопасности и матричных свойств имплантатов *in vitro* рекомендовать их для создания биомедицинских клеточно- и тканеинженерных конструкций. Также стоит отметить, что при разработке матриксов необходимо учитывать влияние методик стерилизации на свойства материала, а также возможность модифицировать матриксы природными соединениями или биологически активными веществами для снижения интенсивности воспалительной реакции, приводящей, как было показано, к драматическому ускорению процессов биодеструкции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В условиях проведенных экспериментов *in vitro* полилактидные губки, полученные методом лиофильной сушки, соответствуют требованиям, предъявляемым к биосовместимым медицинским изделиям, по показателям изменения pH и оптической плотности водного экстракта из ПД ПЛПА, а также по цитотоксичности образцов относительно фибробластов мыши NIH/3T3 при культивировании в статических условиях и относительно МСК ЖТч, культивируемых в проточном биореакторе. При культивировании МСК ЖТч в гепатогенной среде в присутствии ПД ПЛА наблюдается активная адгезия и пролиферация МСК ЖТч как на поверхности, так и в объеме пористого матрикса. Вместе с тем при подкожной имплантации образцов процесс резорбции ПД ПЛА сопровождается асептической воспалительной реакцией тканей, прилегающих к имплантату. Столь активная воспалительная

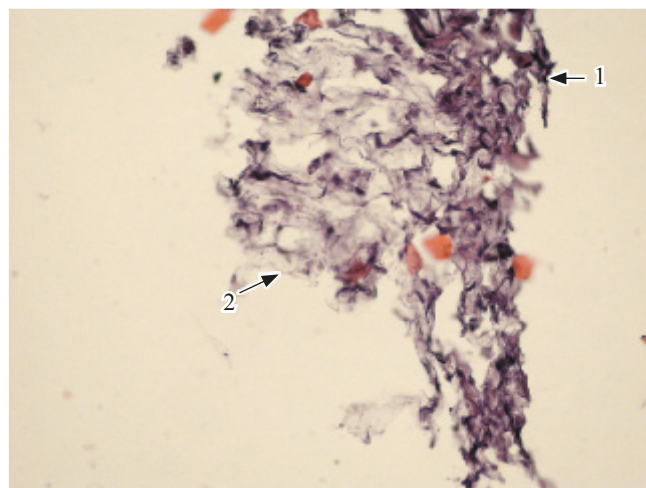


Рис. 7. Гистологическая картина клеточно-инженерной конструкции на основе ПД ПЛА через 14 суток культивирования в условиях потока при скорости 0,2 мл/мин: 1 – скопления клеток; 2 – фрагменты диска. Окрашивание гематоксилином и эозином. $\times 200$

Fig. 7. Histological picture of tissue engineering construction based on PLA after 14 days of cultivation at flow rate 0.2 ml/min: 1 – cell accumulation; 2 – disk fragments. Painted by hematoxyline and eosine. $\times 200$

реакция в эксперименте *in vivo* на фоне отсутствия цитотоксичности *in vitro* и активной неоваскуляризации может быть следствием контактного травмирования прилежащих мягких тканей. Данное исследование показывает необходимость предварительного изучения биомеханических характеристик имплантата с учетом конкретной области его применения

В этой связи правомерно требование Федерального закона от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» использовать при разработке биомедицинского клеточного продукта только прошедшие государственную регистрацию, т. е. разрешенные к клиническому применению медицинские изделия.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Биосовместимые материалы: учебное пособие / Под ред. В.И. Севастьянова и М.П. Кирпичникова. М.: МИА, 2011: 544. Biosovmestimie materiali: uchebnoe posobie / Pod red. V.I. Sevastianova i M.P. Kirpichnikova. M.: MIA, 2011: 544.
2. Vert M. Bioresorbable polymers for temporary therapeutic applications. *Angew. Macromol. Chem.* 1989; 166/167: 155–168.
3. Hutmacher D, Markus MS, Hürzeler B, Schliephake H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR

- applications. *Int. J. Oral & Maxillofacial Implants*. 1996; 11: 667–678.
4. Peters MC, Mooney DJ. Synthetic extracellular matrices for cell transplantation in Porous materials for tissue engineering, eds.: Dean-Mo Liu, Vivek Dixit. *Materials Science Forum*. 1997; 250: 43–52.
 5. Медведев ДД, Недосеев СЛ, Нустратов ВМ, Смирнов ВП, Петяев ВА, Шварцкопф ПВ и др. Плазмобразующие полимерные среды для инерциального термоядерного синтеза и биоинженерии. *Вопросы атомной науки и техники. Сер. Термоядерный синтез*. 2010; 1: 22–31. Medvedev DD, Nedoseev SL, Nistratov VM, Smirnov VP, Petyaev VA, Shvarckopf PV i dr. Plazmoobrazuyushchie polimernye sredy dlya inercial'nogo termoyadernogo sinteza i bioinzhenierii. *Voprosy atomnoj nauki i tekhniki. Ser. Termoyadernyj sintez*. 2010; 1: 22–31.
 6. Gong Y, Zhou Q, Gao C, Shen J. In vitro and in vivo degradability and cytocompatibility of poly(L-lactic acid) scaffold fabricated by a gelatin particle leaching method. *Acta Biomater*. 2007; 3: 531–540.
 7. Spadaccio C, Rainer A, Trombetta M, Vadalá G, Chello M, Covino E et al. Poly-L-lactic acid/hydroxyapatite electrospun nanocomposites induce chondrogenic differentiation of human MSC. *Annals of Biomedical Engineering*. 2009; 37: 1376–1389.
 8. Pisanti P, Yeatts A.B, Cardea S, Fisher JP, Reverchon E. Tubular perfusion system culture of human mesenchymal stem cells on poly- L- Lactic acid scaffolds produced using a supercritical carbon dioxide-assisted process. *J. Biomed. Mat. Soc. Part A*. 2012; 100A: 2563–2572.
 9. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*. 2007; 32: 762–798.
 10. Севастьянов ВИ. Клеточно-инженерные конструкции в тканевой инженерии и регенеративной медицине. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2015; 17 (2): 127–130. Sevastianov VI. Kletочно-injenernie konstruksii v tkanevoi ingenerii i regenerativnoi meditsine. *Vestnik transplantologii i iskusstvennikh organov*. 2015; 17 (2): 127–130.
 11. Антонов ЕН, Богородский СЭ, Кротова ЛИ, Попов ВК, Белов ВЮ, Курсаков СВ и др. Формирование компонентов инъекционной формы ацетилсалициловой кислоты пролонгированного действия с помощью сверхкритического диоксида углерода. *Сверхкритические флюиды: Теория и практика*. 2016; 11 (2): 4–13. Antonov EN, Bogorodskii SE, Krotova LI, Popov VK, Belov VY, Kursakov SV i dr. Formirovanie komponentov in'ektsionnoi formi atsetilsalitsilovoi kisloti prolongirovannogo deistviya s pomoshiju sverhkriticheskogo dioksida ugleroda. *Sverhkriticheskie Fluidi. Teorija i praktika*. 2016; 11 (2): 4–13.
 12. Kellomaki M, Niiranen H, Puumanen K, Ashammakhi N, Waris T, Tormala P. Bioabsorbable scaffolds for guided bone regeneration and generation. *Biomaterials*. 2000; 21: 2495–2505.
 13. Coutu DL, Yousefi AM, Galipeau J. Three-dimensional porous scaffolds at the crossroads of tissue engineering and cell-based gene therapy. *J. Cell. Biochem*. 2009; 108: 537–546.
 14. Bishi DK, Mathapati S, Venugopal JR, Guhathakurta S, Cherian KM, Verma RS et al. A patient-inspired ex vivo liver tissue engineering approach with autologous mesenchymal stem cells and hepatogenic serum. *Adv. Healthcare Mater*. 2016; 5: 1058–1070.
 15. Giller DB, Tokaev KV, Giller GV, Martel II, Glotov AA, Anilines II et al. Surgical management and results of treatment of caseous pneumonia (Review of literature and own observations). *Thoracic and cardiovascular surgery*. 2010; 1: 54–58.
 16. Farah S, Anderson DG, Langer R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications – a comprehensive review. *Adv. Drug Delivery Reviews*. 2016; 107: 367–392.
 17. ГОСТ Р 52770-2016 «Изделия медицинские. Требования безопасности. Методы санитарно-химических и токсикологических испытаний». GOST R 52770-2016 «Izdeliya meditsinskie. Trebovaniya besopastnosti. Metodi sanitarno-chimicheskikh i toksikologicheskikh ispitaniy».
 18. ГОСТ ISO 10993-5-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы in vitro». GOST ISO 10993-5-2011 «Izdeliya meditsinskie. Otsenka biologicheskogo deistviya meditsinskih izdelii. Chast 5. Issledovaniya na tsitotoksichnost: metodi in vitro».
 19. ГОСТ ISO 10993-6-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследование местного действия после имплантации». GOST ISO 10993-6-2011 «Izdeliya meditsinskii. Otsenka biologicheskogo deistviya. Chast 6. Issledovanie mestnogo deistviya posle implantatsii».
 20. Sevastianov VI, Basok YuB, Grigoryev AM, Kirsanova LA, Vasilets VN. A perfusion bioreactor for making tissue-engineered constructs. *Biomedical Engineering*. 2017; 51 (3): 162–165.
 21. Surguchenko VA, Ponomareva AS, Kirsanova LA, Skaleckij NN, Sevastianov VI. The cell-engineered construct of cartilage on the basis of biopolymer hydrogel matrix and human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (in vitro study). *J. Biomed. Mat. Soc. Part A*. 2015; 103 (2): 463–470.
 22. Maiborodin IV, Kuznetsova IV, Beregovoi EA, Shevela AI, Barannik MI, Maiborodina VI et al. Reaction of rat tissues to implantation of lactic acid-based biodegradable polymer. *Bull. Exper. Biol. Med*. 2014; 156 (6): 874–879.
 23. Török EI, Vogel C, Lütgehetmann M, Ma PX, Dandri M, Petersen J et al. Morphological and functional analysis of rat hepatocyte spheroids generated on poly(L-lactic acid) polymer in a pulsatile flow bioreactor. *Tissue Eng*. 2006; 12 (7): 1881–1890.
 24. Rebelo SP, Costa R, Silva MM, Marcelino P, Brito C, Alves PM. Three-dimensional co-culture of human hepatocytes and mesenchymal stem cells: improved functionality in long-term bioreactor cultures. *J. Tissue Eng. Regen. Med*. 2017; 11 (7): 2034–2045.

Статья поступила в редакцию 12.04.2018 г.
The article was submitted to the journal on 12.04.2018