

© Коллектив авторов, 2013
УДК 611.13/.14:616-089.843

*И. В. Майбородин, А. И. Шевела, В. В. Морозов, Я. В. Новикова, В. А. Матвеева,
М. Н. Дровосеков, М. И. Баранник, С. В. Марчуков и И. В. Кузнецова*

ОСОБЕННОСТИ АНГИОГЕНЕЗА ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ ПЛЕНОК ИЗ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТА С АДсорБИРОВАННЫМИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ КОСТНОМЗГОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Центр новых медицинских технологий (зав. — проф. А. И. Шевела), Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

Методами световой микроскопии изучены процессы, происходящие в различных тканях у крыс после имплантации полимерных пленок на основе полигидроксиалканата (ПГА) с адсорбированными аутологичными мультипотентными стромальными стволовыми клетками костномозгового происхождения (АССККП). Обнаружено, что после имплантации ПГА с АССККП в окружающих тканях происходит увеличение числа сосудов в результате неоангиогенеза. В данном случае АССККП не мигрируют и не разрушаются в месте введения, а формируют кровеносные сосуды за счет дифференцировки в клетки их структур. Процессы ангиогенеза в тканях вокруг ПГА, в свою очередь, приводят к образованию большего числа кровеносных сосудов в грануляциях, формирующихся вокруг имплантированного инородного тела, большего объема самих грануляций и более толстой соединительнотканной капсулы, ограничивающей в дальнейшем полимер.

Ключевые слова: мультипотентные стромальные (мезенхимальные) клетки, полигидроксиалканат, имплантация, ангиогенез, гранулематозное воспаление

Высокий потенциал мультипотентных стромальных (мезенхимальных) стволовых клеток костномозгового происхождения (ССККП), способных формировать любые специализированные клетки, открывает перспективу создания новой отрасли медицины — регенераторной и заместительной клеточной терапии, позволяющей восстанавливать или даже создавать органы и ткани, утраченные или разрушенные в результате травм, хирургических вмешательств или инфекционных заболеваний.

Введение ССККП в организм многие исследователи осуществляют на различных носителях, в том числе трехмерных, в которых клетки лучше взаимодействуют между собой и могут обмениваться клеточными сигналами [8–10, 14].

Среди биополимеров особое место занимают биodeградируемые полигидроксиалканаты (ПГА) — полимеры гидроксипроизводных алкановых кислот (масляной, валериановой и др.), которые с середины 80-х годов прошлого века активно

изучают как материал для хирургии, тканевой инженерии и создания биоискусственных органов. ПГА могут представлять большой интерес для клинической медицины в связи с их механической прочностью, высокой биосовместимостью и медленной биodeградацией [4, 13]. Возможно, что для создания трехмерных структур, используемых при введении ССККП в организм, лучше подходят биodeградируемые полимерные материалы на основе ПГА, позволяющие создавать матрицы любых форм, имеющие достаточно глубокие и разветвленные поры и не обладающие антагонизмом против живых тканей. Однако, согласно нашим данным, материалы из ПГА являются не биodeградируемыми, а биоинертными [1].

Цель настоящего исследования — изучение процессов, происходящих в различных тканях после имплантации полимерных пленок на основе ПГА с адсорбированными аутологичными ССККП (АССККП).

Сведения об авторах:

Майбородин Игорь Валентинович (e-mail: imai@mail.ru), Шевела Андрей Иванович (e-mail: ashevela@mail.ru), Морозов Виталий Валерьевич (e-mail: doctor.morozov@mail.ru), Новикова Яна Владимировна (e-mail: yandoc@mail.ru), Матвеева Вера Александровна (e-mail: vam@niboch.nsc.ru), Дровосеков Михаил Николаевич (e-mail: dmn78.ru@mail.ru), Баранник Михаил Иванович (e-mail: barannikm@mail.ru), Марчуков Сергей Владимирович (e-mail: msv-1981@mail.ru), Кузнецова Ирина Владимировна (e-mail: k.iriniya.v@mail.ru), Центр новых медицинских технологий, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8

Материал и методы. Эксперименты проводили на 6-месячных самцах крыс инбредной линии Wag массой 180–200 г. Все манипуляции с животными осуществляли под общим ингаляционным эфирным наркозом в условиях чистой операционной с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». На каждую точку исследования использовали 6 крыс. ПГА (сополимер из 85% полигидроксibuтирата и 15% гидроксивалериата) в виде пленки толщиной 20 мкм был предоставлен для исследования Институтом биофизики СО РАН (г. Красноярск). АССККП 2-го пассажа, полученные от крысы указанной линии, трансфицировали ДНК плазмиды pEGFP-N1 (Clontech Laboratories Inc., США), содержащей ген зеленого флюоресцентного белка (GFP), как было описано ранее [3].

ПГА в виде пленок толщиной 20 мкм до адсорбции АССККП стерилизовали в забуференном растворе для культур клеток в автоклаве при 120 °С и давлении в 1 атм в течение 20 мин. Для пассивной адсорбции АССККП ПГА помещали во взвесь этих клеток в культуральной среде на 2 ч, что было достаточным для формирования монослоя.

Имплантация в полость брюшины. После обработки кожи животных спиртом производили разрез по срединной линии живота (лапаротомия) длиной 2–3 см. На расстоянии не менее 2 см от разреза справа к передней стенке брюшной полости (со стороны париетальной брюшины) фиксировали одним узловым швом (капрофил; Джонсон и Джонсон, США) ПГА в виде диска диаметром 1 см (без острых углов) с пассивно адсорбированными АССККП или без них.

Подкожная имплантация. Производили разрез кожи в области шеи сзади от основания черепа до лопаток длиной 1–2 см. Тупым способом (сомкнутым зажимом) формировали слепой канал длиной 1,5–2 см над правой лопаткой, в котором располагали ПГА такого же размера, как и при имплантации в полость брюшины, также с АССККП или без них.

Внутримышечная имплантация. Разрезали кожу в области передненаружной поверхности левого бедра длиной 1 см. Тупым способом (бранша пинцета) разделяли волокна мышц бедра, куда помещали пленку из ПГА, при этом диски из пленок диаметром 1 см перед имплантацией делили ножницами на 4 сектора, и один из них были с АССККП, другие без них.

Послеоперационные раны ушивали непрерывными швами, кожу и кожные швы обрабатывали спиртом. Воспалительных осложнений в месте послеоперационных швов обнаружено не было.

Через 4, 12 и 18 сут после операции имплантированные материалы вырезали вместе с окружающими тканями, фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,4) не менее 24 ч, обезвоживали в серии этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в парафин. Неокрашенные срезы толщиной 5–7 мкм изучали под световым микроскопом Axioimager M1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении до 1200 раз в режиме люминесценции с фильтром Alexa 488. Кроме того, изучали и срезы, окрашенные гематоксилином—эозином, по Ван Гизону и по Романовскому.

Измеряли толщину капсулы и слоя грануляций, определяли объемную плотность сосудов в грануляциях на срезе, для чего применяли квадратную тестовую систему, совмещаемую на экране компьютера с изображением, полученным при помощи цифровой видеокамеры микроскопа. Конечная площадь тестового квадрата была равна 3600 мкм² (сторона квадрата 60 мкм). С каждого объекта готовили не менее 5 сре-

зов, на каждом срезе проводили 3–5 измерений. Различия между средними величинами считали значимыми при $P \leq 0,05$.

Результаты исследования. Через 4 сут после операции вокруг пленок из ПГА были обнаружены грануляции и явления острого воспалительного процесса, причем среди лейкоцитов, инфильтрирующих ткани, было очень много сегментоядерных нейтрофилов. Обращает на себя внимание значимо большая (в 2,4 раза) объемная плотность сосудов в грануляциях после имплантации полимера с АССККП по сравнению с таковой без них ($11,4 \pm 1,3$ и $4,7 \pm 1,2\%$ соответственно, $P < 0,05$) (рис. 1, а, б). Сами пленки были деформированы.

При исследовании неокрашенных срезов при имплантации ПГА в полость брюшины и подкожную основу в тканях, окружающих полимерную пленку, в отраженном ультрафиолетовом свете были обнаружены ярко светящиеся отдельные клетки, цепочки из них и небольшие кольцевые структуры (см. рис. 1, в, г). Однако при имплантации полимера в мышечную ткань встречались только единичные клетки с ярко светящейся цитоплазмой и темным ядром (см. рис. 1, д, е). Внутримышечное введение ПГА сопровождалось миграцией имплантатов. У всех животных инородное тело было обнаружено под кожей различных отделов бедра и даже паховой области. Видимо, это связано с сокращением мышц и выдавливанием полимерной пленки при движениях животного.

В некоторых случаях к 12-м суткам имплантаты были окружены толстой капсулой из грубоволокнистой соединительной ткани, в которой присутствовали признаки фиброзирования и крупные многоядерные макрофаги (гигантские клетки инородных тел). Однако значительно чаще вокруг имплантатов были отмечены лейкоцитарная (лимфоцитарно-макрофагальная) инфильтрация тканей, грануляции и геморрагии. Пленки были еще более деформированы капсулой, в отдельных наблюдениях даже свернуты в кольцо, и иногда была отмечена фрагментация полимера на две части и больше. Толщина капсулы и слоя грануляций (рис. 2, а, б), а также объемная плотность сосудов в грануляциях были значимо ($P < 0,05$) больше при введении ПГА с адсорбированными АССККП, чем после имплантации полимера без клеток ($P < 0,05$). Капсула была толще в 2,4 раза (171 ± 49 и 404 ± 98 мкм), слой грануляций — в 3 раза (113 ± 54 и 338 ± 97 мкм), объемная плотность сосудов в грануляциях — больше в 5 раз ($4,1 \pm 1,2$ и $20,6 \pm 2,8\%$; $P < 0,05$).

На неокрашенных срезах тканей вокруг полимерных пленок присутствовали большие группы

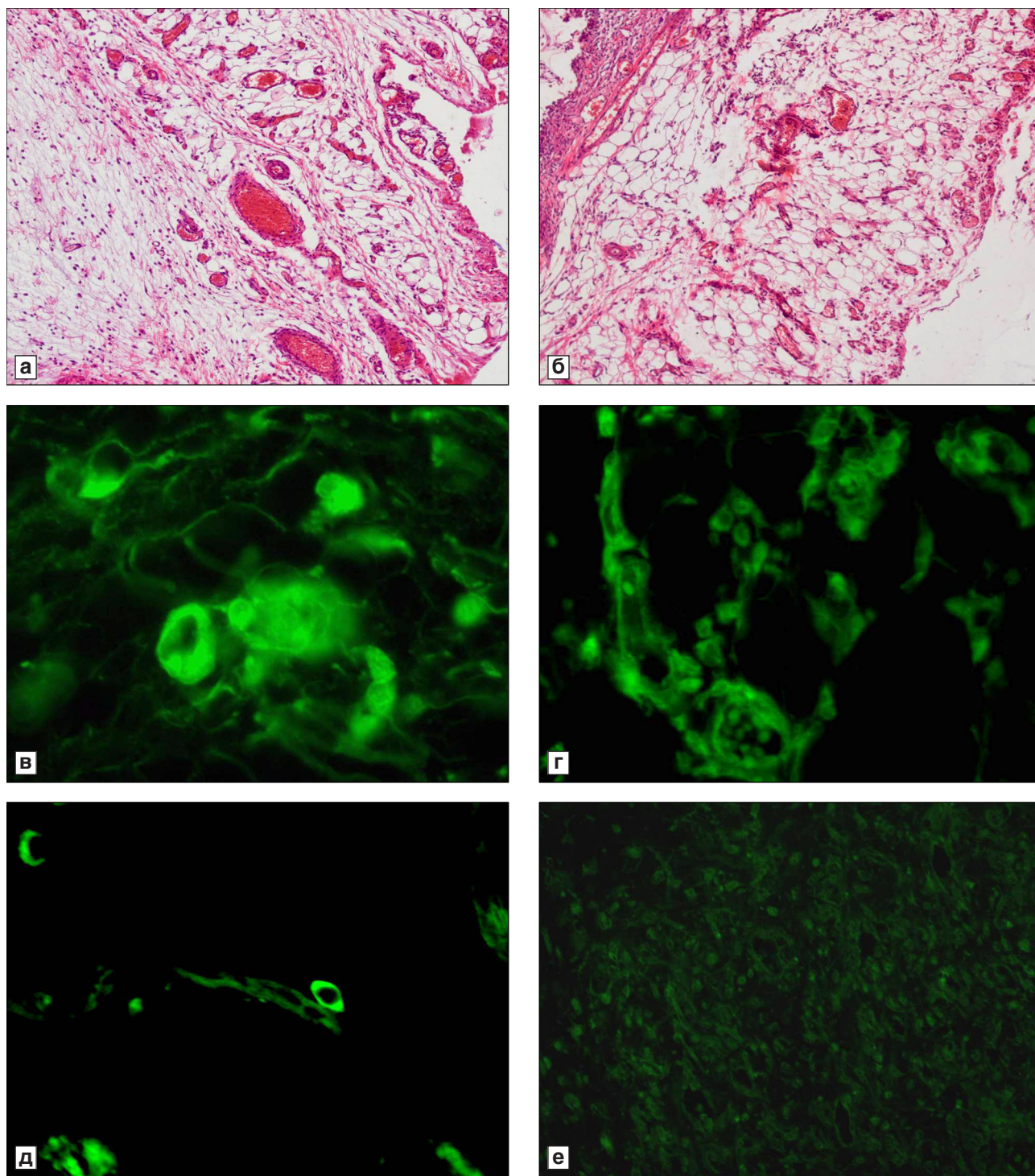
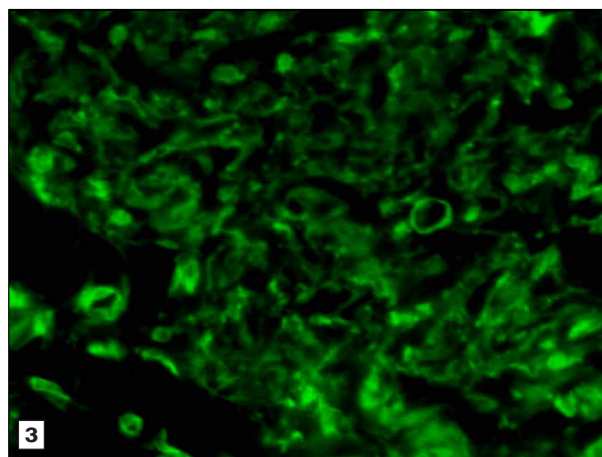
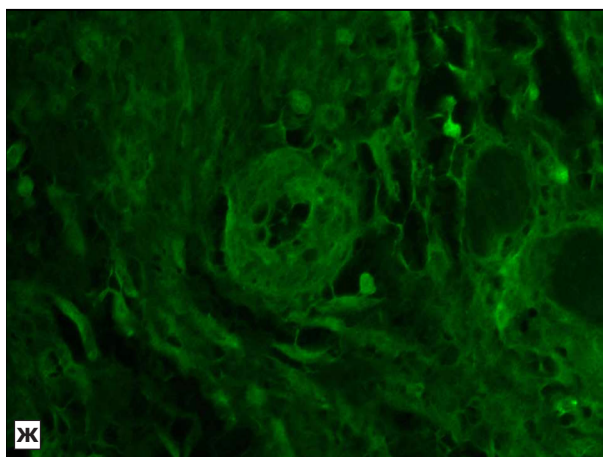
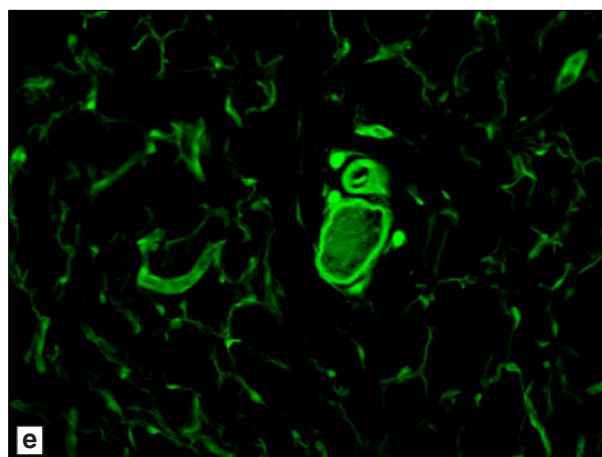
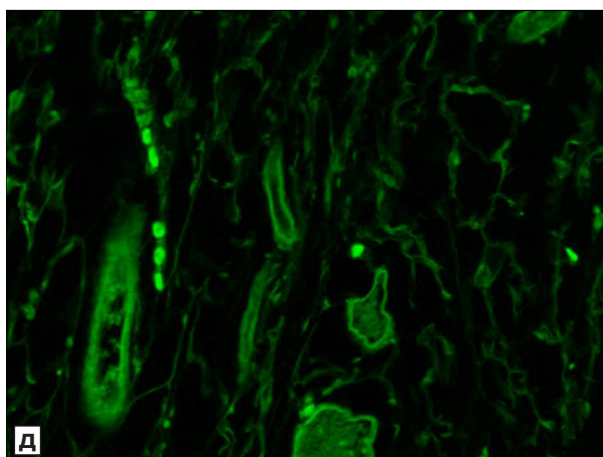
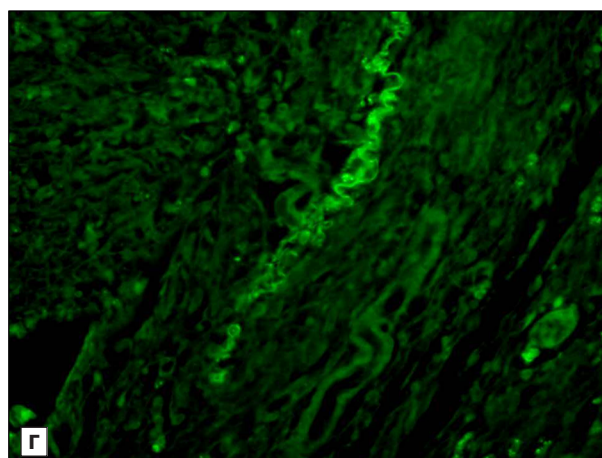
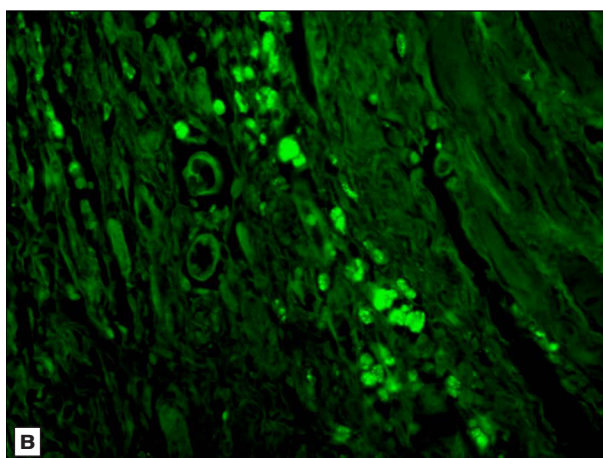
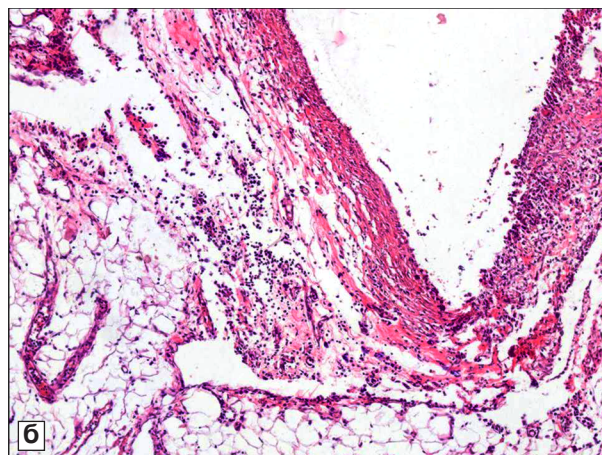
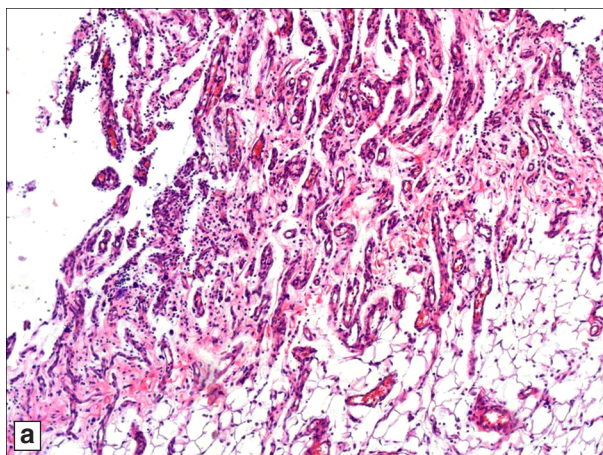


Рис. 1. Морфологические изменения через 4 сут после имплантации пленок из полигидроксиалканоата с адсорбированными мультипотентными стромальными стволовыми клетками костномозгового происхождения (а, в, д) и без них (б, г, е) в подкожную основу (а–г) и мышечную ткань бедра (д, е) крысы.

а — большое число различных по размерам кровеносных сосудов в рыхлой волокнистой соединительной ткани; б — грануляции из рыхлой волокнистой соединительной ткани с небольшим числом кровеносных сосудов вокруг имплантированной пленки; в — отдельные светящиеся клетки, цепочки светящихся клеточных элементов и кольцевидные структуры; г — ярко светящиеся объекты отсутствуют; д — отдельные клетки с ярким свечением цитоплазмы и темным крупным овальным ядром; е — ярко светящиеся объекты отсутствуют. а, б — окраска гематоксилином — эозином; в–е — неокрашенные срезы в отраженном свете с фильтром Alexa 488. Ув.: а, б — 200; в — 800; г, д — 600; е — 400



и цепочки светящихся клеток и отмечено уже четкое формирование молодых извитых кровеносных сосудов со светящимися оболочками (см. рис. 2, в, г, ж).

Спустя 18 сут после имплантации ПГА было отмечено образование еще более толстой фиброзной капсулы со склерозом окружающих тканей и развитием гранул инородного тела. В толще капсул всегда присутствовали участки геморрагий, в основном по краю имплантатов, и небольшие гранулемы инородных тел, видимо, способствующие лизису мелких фрагментов ПГА. Полимерные пленки были деформированы капсулой еще сильнее, часто происходило переламывание и фрагментация ПГА с образованием частей, имеющих острые края. В единичных случаях встречались обширные гранулемы инородных тел с толстой фиброзной капсулой вокруг, где происходило разрушение ПГА на мелкие фрагменты, окружение их соединительной тканью и поглощение макрофагами (гигантскими клетками инородных тел).

В данный срок было отмечено слабое свечение (практически на уровне фона) в стенке только некоторых кровеносных сосудов, значительно уменьшились также численность отдельных светящихся клеток и длина цепочек, сформированных такими клеточными элементами (см. рис. 2, д, е, з).

Обсуждение полученных данных. Формирование соединительнотканной капсулы вокруг имплантированного материала обусловлено реакцией организма на инородное тело — этот процесс заживления очень длительный. Контакт полимерной пленки с тканями организма сопровождается воспалением, обусловленным альтерацией, репарацией тканей и формированием соединительнотканной капсулы, что, в свою очередь, приводит к развитию и инволюции грануляционной ткани. Грануляции характеризуются наличием большого числа кровеносных сосудов, которые развиваются как вследствие разрастания уже существующих сосудов, так и роста новых, обусловленных миграцией клеток-

предшественников эндотелиоцитов и перицитов, имеющих костномозговое происхождение [5, 12].

После внедрения в подкожную основу полимера вместе с адсорбированными АССККП было обнаружено увеличение объемной плотности кровеносных сосудов в грануляциях, больший объем самих грануляций и большая толщина фиброзной капсулы, формирующейся вокруг инородного тела.

Доказательством того, что сосуды в грануляциях были сформированы именно в результате введения АССККП и из них, является свечение стенки этих сосудов. Ген GFP, введенный в ДНК АССККП, неизменным передается дочерним клеткам и клеткам следующих поколений. Эти клетки и структуры, сформированные из них, точно так же светятся в отраженном ультрафиолетовом свете. В случае имплантации ПГА без АССККП объектов с ярким свечением в окружающих тканях нет.

Свечение оболочек сосудов указывает на то, что именно введенные АССККП прямо, а не опосредованно (через цитокины или другие клеточные сигналы), участвуют в их формировании, возможно, из-за присутствия мультипотентных клеток, уже стимулированных к дифференцировке в эндотелиоцитарном или перицитарном направлениях. Также не исключено, что гипоксия тканей в результате перевязки структур вместе с сосудами стимулирует дифференцирование введенных АССККП в эндотелиоциты [7].

Кроме этого, присутствие в стенке сосудов очень ярких светящихся объектов указывает на то, что в данном случае введенные АССККП не мигрируют из места инъекции, не разрушаются и не служат только «строительным материалом» или «сигналом» к началу ангиогенеза для собственных клеток организма-донора. Во всех этих случаях, конечно, возможен выход из разрушенных АССККП светящегося белка и трансфицированного гена GFP и поглощение их соседними клетками. Однако белки и фрагменты ДНК, попавшие в клетки в результате фагоцитоза или

Рис. 2. Морфологические изменения через 12 сут (а–г, ж) и 18 сут (д, е, з) после имплантации пленок из полигидроксиалконоата с адсорбированными мультипотентными стромальными стволовыми клетками костномозгового происхождения (а, в–е) и без них (б, ж, з) в полость брюшины крыс.

а — большой объем грануляций со значительным числом кровеносных сосудов и признаками развития грубоволокнистой и фиброзной ткани вокруг имплантированной пленки; б — капсула из грубоволокнистой соединительной ткани с признаками фиброобразования и практически без грануляций в окружающих тканях; в — большие группы и цепочки ярко светящихся клеток в тканях, окружающих пленку; г — яркое свечение стенки извитого сосуда капиллярного типа; д — небольшие цепочки клеток, светящихся незначительно ярче фона; е — единичные крупные сосуды со светящимися стенками; ж — отсутствие светящихся объектов в тканях вокруг имплантированной пленки; з — в тканях вокруг пленки ярко светящихся объектов нет. а, б — окраска гематоксилином — эозином; в–з — неокрашенные срезы в отраженном свете с фильтром Alexa 488. Ув.: а, б — 200; в–е — 300; ж, з — 600

пиноцитоза, подвергаются деградации с потерей способности к люминесценции и встраиванию в геном, т. е. при разрушении введенных АССККП свечение должно быть минимальным (выход светящегося белка GFP из АССККП) и очень быстро полностью исчезнуть, тем более в данном случае не должно быть четко очерченных и ограниченных светящихся структур.

По-видимому, имплантация ПГА с АССККП ускоряет процесс ангиогенеза при развитии грануляций за счет привнесения в место повреждения тканей (операция и процессы отграничения инородного тела) клеточных элементов, способных к дифференцировке в любом, в том числе эндотелиоцитарном и перицитарном направлениях. Не исключено, что нарушения микроциркуляции при воспалении (прямое повреждение сосудов, пережатие сосудов инородным телом, отек, тромбозы и пр.) и сопровождающая гипоксия вызывают направленную дифференцировку введенных АССККП в направлении клеток-предшественников эндотелиоцитов и перицитов. Таким образом экономится время на миграцию собственных стволовых клеток, а ускорение роста сосудов приводит к улучшению оксигенации поврежденных тканей и способствует миграции лейкоцитов в участок воспаления для более быстрого и успешного лизиса тканевого и клеточного детрита. Имеются данные, что применение ССККП способствует ангиогенезу [2, 3, 6], гипоксия тканей *in vivo* и клеток *in vitro* стимулирует этот процесс [7].

Уменьшение со временем интенсивности свечения в сосудах после введения АССККП, видимо, объясняется постепенным восстановлением генома трансфицированных клеток или вытеснением собственными клетками аутологичных, но все-таки взятых у другой особи, клеток костного мозга.

Необходимо обратить внимание, что и при культивировании клеток, трансфицированных плазмидой pEGFP-N1, без селекции было показано снижение количества объектов, синтезирующих GFP, вследствие их вытеснения нетрансфицированными клетками [2, 3].

Возможно, что в случае острой воспалительной реакции с небольшим объемом поврежденной ткани применение АССККП и связанные с этим ангиогенез и быстрое развитие грануляций приведут к более быстрому очищению тканей от детрита. Однако в случае имплантации синтетических биоинертных материалов, а именно, из ПГА [1, 6] активное формирование сосудов

рядом с полимером приводит к большему объему грануляций, которые в дальнейшем способствуют формированию более толстой капсулы вокруг инородного тела.

Высокая активность воспаления, формирование толстой капсулы с признаками фиброобразования после имплантации ПГА с АССККП, скорее всего, являются неблагоприятными прогностическими признаками, указывающими на высокую вероятность развития в дальнейшем различных осложнений [11].

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Фундаментальных исследований президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине» (проект № 5.18 «Разработка технологий применения биodeградируемых полимеров на основе полигидроксикапранов в качестве матрицы для доставки стволовых клеток в организм») и Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы «Исследование генных и клеточных подходов в терапии заболеваний сердечно-сосудистой системы или опорно-двигательного аппарата» (ГК16.512.11.2099 «Исследование возможности использования генных и клеточных подходов в диагностике, профилактике и лечении тромбоэмболических осложнений сердечно-сосудистых заболеваний для снижения уровня смертности и ранней инвалидизации трудоспособного населения РФ»).

ЛИТЕРАТУРА

1. Майбородин И. В., Шевела А. И., Анищенко В. В. и др. Особенности реакции тканей крыс на внутрибрюшинные имплантаты из биodeградируемого полигидроксикапрана. Морфология, 2011, т. 139, вып. 2, с. 62–66.
2. Майбородин И. В., Якимова Н. В., Матвеева В. А. и др. Ангиогенез в рубце матки крыс после введения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения. Бюл. экспер. биол., 2010, т. 150, № 12, с. 705–711.
3. Майбородин И. В., Якимова Н. В., Матвеева В. А. и др. Морфологический анализ результатов введения аутологичных стволовых стромальных клеток костномозгового происхождения в рубец матки крыс. Морфология, 2010, т. 138, вып. 6, с. 47–55.
4. Шишацкая Е. И., Войнова О. Н., Горева А. В. и др. Реакция тканей на имплантацию микрочастиц из резорбируемых полимеров при внутримышечном введении. Бюл. экспер. биол., 2007, т. 144, № 12, с. 635–639.
5. Carmeliet P. and Luttun A. The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis. Thromb. Haemost, 2001, v. 86, № 1, p. 289–297.
6. Chang S. H., Tung K. Y., Wang Y. J. et al. Fabrication of vascularized bone grafts of predetermined shape with hydroxyapatite-collagen gel beads and autogenous mesenchymal stem cell composites. Plast. Reconstr. Surg., 2010, v. 125, № 5, p. 1393–1402.
7. Hu X., Yu S. P., Fraser J. L. et al. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart

- function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2008, v. 135, № 4, p. 799–808.
8. Kang J. M., Kang S. W., La W. G. et al. Enhancement of in vivo bone regeneration efficacy of osteogenically undifferentiated human cord blood mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2010, v. 93, № 2, p. 666–672.
9. Liu M., Xiang Z., Pei F. et al. Repairing defects of rabbit articular cartilage and subchondral bone with biphasic scaffold combined bone marrow stromal stem cells. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2010, v. 24, № 1, p. 87–93.
10. Re'em T., Tsur-Gang O. and Cohen S. The effect of immobilized RGD peptide in macroporous alginate scaffolds on TGFbeta1-induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 2010, v. 31, № 26, p. 6746–6755.
11. Rouanet P., Duchene M. and Quenet F. Cancer update on breast reconstruction. *Bull. Cancer*, 2002, v. 89, № 1, p. 125–129.
12. Shi Q., Rafii S., Wu M. H. et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 1998, v. 92, № 2, p. 362–367.
13. Shishatskaya E. I., Voinova O. N., Goreva A. V. et al. Biocompatibility of polyhydroxybutyrate microspheres: in vitro and in vivo evaluation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2008, v. 19, № 6, p. 2493–2502.
14. Xie J., Han Z., Naito M. et al. Articular cartilage tissue engineering based on a mechano-active scaffold made of poly (L-lactide-co-epsilon-caprolactone): In vivo performance in adult rabbits. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater*, 2010, v. 94, № 1, p. 80–88.

Поступила в редакцию 19.02.2012
Получена после доработки 25.06.2012

PECULIARITIES OF ANGIOGENESIS AFTER THE IMPLANTATION OF POLYHYDROXYALKANOATE FILMS WITH THE ADSORBED MULTIPOTENT STROMAL STEM CELLS OF A BONE MARROW ORIGIN

*I. V. Maiborodin, A. I. Shevela, V. V. Morozov,
Ya. V. Novikova, V. A. Matveyeva, M. N. Drovosekov,
M. I. Barannik, S. V. Marchukov and I. V. Kuznetsova*

The processes developing in various rat tissues after implantation of polymeric polyhydroxyalkanoate (PHA) film fragments with adsorbed autologous multipotent stromal (mesenchymal) cells of bone marrow origin (AMMSCBM), were studied by methods of light microscopy. After the implantation of PHA film with AMMSCBM, the number of blood vessels in the surrounding tissues was found to increase as a result of neoangiogenesis. In this case, AMMSCBM did not migrate and were not destroyed at the place of injection, but differentiated into the cells forming blood vessel structures. The processes of angiogenesis in the tissues around PHA implant, in turn, lead to development of a larger number of blood vessels in the granulations formed around the implanted foreign body, higher volume of granulations proper and subsequent development of a thicker capsule delimiting polymer implant.

Key words: *multipotent stromal (mesenchymal) cells, polyhydroxyalkanoate, implantation, angiogenesis, granulomatous inflammation*

The Center of New Medical Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, RAS Siberian Branch, Novosibirsk