

УДК 616-77

ОЦЕНКА ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО СОСУДИСТОГО ИМПЛАНТАТА НА ОСНОВЕ БИОДЕГРАДИРУЕМОЙ МАТРИЦЫ И МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В ХРОНИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO*

© 2022 г. Г. И. Попов^{1, *}, В. Н. Вавилов¹, П. В. Попрядухин², Г. Ю. Юкина¹, Е. Г. Сухорукова¹, А. А. Давыдов¹, Е. М. Иванькова², А. Е. Крюков², Н. В. Смирнова^{2, 3}, В. Е. Юдин^{2, 3}

¹Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 197022 Россия

²Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, 199004 Россия

³Санкт-Петербургский государственный политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251 Россия

*E-mail: trek-4300@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.05.2022 г.

После доработки 02.07.2022 г.

Принята к публикации 11.07.2022 г.

С целью создания тканеинженерного сосудистого имплантата получена биорезорбируемая трубчатая матрица из поли(L-лактида) и разработан метод посева и культивирования на ней мезенхимных стромальных клеток. В группе 1 крысам в брюшную аорту имплантировали матрицы без клеточного материала; в группе 2 – матрицы с предварительно культивированными мезенхимными клетками жировой ткани крысы. Сроки наблюдения в группе 1 составляли от 2 сут до 64 нед. ($n = 36$), в группе 2 – до 72 нед. ($n = 42$). Проходимость графтов в группе 1 составила 86%, в группе 2 – 97%. Морфологическое исследование имплантатов первой группы выявило постепенную биодеградацию биополимера и замещение волокон полимера соединительной тканью, однако после достижения тотальной резорбции полимера через 64 нед. во всех наблюдениях отмечено образование аневризмы зоны реконструкции. В группе 2 в имплантате определяли большее число клеток и вокруг него формировалась более толстая неоадвентиция, однако морфологическая картина на поздних сроках наблюдения качественно не отличалась от таковой в группе 1. На поздних сроках наблюдения во второй группе в четырех из девяти наблюдений (45%) развилась аневризма имплантата. Таким образом, предварительное культивирование мезенхимных стромальных клеток на матрице привело к выраженной клеточной реакции со стороны организма реципиента, что вероятно позволило снизить частоту образования аневризм, однако не обеспечило формирования структуры естественного сосуда.

Ключевые слова: тканевая инженерия, искусственный сосуд, биорезорбируемые матрицы, поли(L-лактид), мезенхимные стромальные клетки жировой ткани

DOI: 10.31857/S0041377122060098

В настоящее время согласно статистическим данным в мире продолжается рост сердечно-сосудистой заболеваемости (World health statistics 2021: Monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/342703>). Основным хирургическим методом лечения остаются реконструктивные операции с использованием синтетических протезов или аутологичных сосудов. Альтернативой имеющемуся пластическому материалу является разработка тканеинженерного сосудистого имплантата. Кон-

цепция его создания заключается в применении трех составляющих: биорезорбируемой матрицы, клеточного материала и сигнального воздействия механической и биологической природы (Sullivan et al., 2000). Предполагается, что под влиянием последних произойдет заселение клетками матрицы, их пролиферация и дифференцировка, что в совокупности с биорезорбцией материала каркаса приведет к формированию нового сосуда с морфологией естественного.

Ранее нами разработана относительно простая и эффективная методика посева и культивирования мезенхимных стромальных клеток жировой ткани (МСК-ЖТ) на матрице из поли(L-лактида) (ПЛА) (Попов и др., 2018). Необходимость предваритель-

Принятые сокращения: ГМКИТ – гигантские многоядерные клетки инородных тел; МСК-ЖТ – мезенхимные стромальные клетки (МСК) жировой ткани (ЖТ); ПЛА – поли(L-лактид).

ного посева клеточного материала на матрицу до сих пор остается спорным вопросом (Villalona et al., 2010; Row et al., 2017), для решения которого требуется проведение длительных хронических экспериментов с этапной оценкой гистологических данных, описанием основных процессов формирования новой сосудистой стенки и определения роли посеянных мезенхимных и соматических клеток реципиента.

Цель настоящей работы заключалась в изучении процессов формирования новой сосудистой стенки тканеинженерного имплантата малого диаметра на основе биодеградируемой матрицы из ПЛА *in vivo* и оценке роли предварительно культивированных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Получение матрицы. Пористые трубчатые 3D-матрицы получали из ПЛА Purasorb PL-10 (Corbion Purac, Нидерланды). ПЛА растворяли в трихлорметане (хлороформе) (Sigma-Aldrich, США), концентрация раствора составляла 15%. Полученные растворы с помощью инжекторного насоса подавали через электрод-фильтру в электрическое поле с напряженностью $E = 1.5 \times 10^4 - 4 \times 10^5$ В/м при расстоянии между электродами 0.15 м, осаждение микроволокон происходило на цилиндрическом электроде диаметром 1.1 мм. Скорость вращения последнего составляла 1500 об./мин. Затем выполняли термообработку в фиксированном состоянии (Popryadukhin et al., 2017).

Изучение структуры матрицы. Исследование образцов для определения распространения тканей в матрице и процессов резорбции осуществляли на сканирующем электронном микроскопе Supra 55VP (Carl Zeiss, Германия) в режиме регистрации вторичных электронов с предварительным нанесением тонкого слоя платины.

Стерилизация и хранение образцов. Стерилизацию матриц проводили низкотемпературной плазмой (35–60°C) и парами пероксида водорода в плазменном стерилизаторе (DGM Z200, Швейцария). Хранение образцов осуществляли в морозильной камере (при –24°C) для предупреждения их самопроизвольной кристаллизации и деструкции.

Получение и культивирование клеток. Использовали первичную культуру мезенхимных стромальных клеток (МСК) жировой ткани (ЖТ) крысы (МСК-ЖТ). Белую ЖТ, полученную методом липэктомии, подвергали гомогенизации, ферментативной обработке 0.2%-ным раствором коллагеназы (Sigma, США) и центрифугированию. Выделенные клетки культивировали в питательной среде MEM AlphaModification (Gibco, США), содержащей 15% фетальной сыворотки телят (Gibco, США) и антибиотики: 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco, США). Культивирование стромальных клеток производили в CO₂-инкубаторе (Thermo Fisher

Scientific, 3423, США) в атмосфере с влажностью 70%, содержанием CO₂ 5% и температурой 37°C. Использовали традиционную методику селекции по адгезии к пластику (Zhu et al., 2013).

Посев и культивирование клеток на матрице. Посев МСК-ЖТ на матрицу производили ранее разработанным фильтрационным способом; последующее динамическое культивирование проводили в разработанном проточном биореакторе в течение 7 сут (Попов и др., 2018). В этот период через внутренний просвет матрицы непрерывно прокачивалась культуральная среда в пульсовом режиме. Далее матрица переносилась в CO₂ инкубатор и последующее культивирование проходило в пробирке с культуральной средой в течение 7 сут. После окончания срока культивирования матрицу промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и в транспортном термостатированном контейнере доставляли в течение 30 мин в операционную.

Эксперименты на животных. Эксперименты *in vivo* проводили на самцах белых крыс породы Wistar в соответствии с правилами работ на экспериментальных животных (Хельсинская декларация Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными 1996 г.). Операции выполняли под общей интраперитонеальной анестезией (растворы: 0.1 мл Zoletil 100 и 0.0125 мл Rometar (20 мг/мл) из расчета на 0.1 кг массы животного). Выполняли Y-образную лапаротомию, мобилизацию инфаренального отдела аорты, ее протезирование биодеградируемым протезом. В группе 1 ($n = 36$) имплантировали матрицу из ПЛА без предварительного культивирования МСК-ЖТ, сроки наблюдения в этой группе составили 2 сут, 1, 2, 4, 12, 24, 48, 56 и 64 нед. (по 4 животных для каждого срока). В группе 2 ($n = 42$) применяли матрицу с МСК, сроки наблюдения составляли: 2 сут, 1, 2, 4, 12, 24, 48, 56, 64 (по 4 животных для каждого срока) и 72 нед. (6 животных). Антикоагулянты и дезагреганты не использовали. Прходимость оценивали с помощью классической методики – последовательное пережатие микрохирургическим пинцетом сосуда ниже дистального анастомоза, сдаивание крови в сосуде вторым пинцетом в каудальном направлении, контрольный запуск кровотока с оценкой скорости заполнения сосуда кровью (Acland, 1972). После операции животных содержали в виварии в отдельных клетках при свободном доступе к пище и воде. Проводили наблюдение за цветом и температурой кожных покровов задних конечностей животных, а также их двигательной активностью.

Морфологическое исследование. Материал фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине на PBS (рН 7.4) в течение 24 ч и обезвоживали с помощью изопропилового спирта и петролейного эфира. Срезы окрашивали гематоксилином Майера и эозином (Биовитрум, Россия). Визуализацию соединительной ткани осуществляли методом Маллори

(Биовитрум, Россия). Микроскопический анализ проводили с помощью светового микроскопа Leica DM750 (Германия), используя окуляр 10× и объективы с увеличением 4×, 10×, 40× и 100×. Запись цифровых изображений выполняли с помощью фотокамеры ICC50 (Leica, Германия).

Морфометрическое исследование. Толщину неинтимы и неoadвентиции, подсчет клеток производили на изображениях имплантата с помощью программы ImageScope Color (версия M), используя окуляр 10× и объектив 40×. Исследование выполняли на препаратах с продольным сечением матрицы. В одном поле зрения (0.3×0.25 мм) считали число ядер клеток во внутренней и наружной половинах стенки матрицы. Для этого проводили вертикальную линию длиной, равной толщине стенки матрицы. Программа автоматически определяла ее середину, далее чертили горизонтальную линию, которая разделяла стенку матрицы на две равные половины (внутреннюю и наружную). Клетки считали в каждой матрице по описанной схеме.

Иммуногистохимическое исследование. Для выявления макрофагов использовали первичные моноклональные мышинные антитела Anti-CD68 (ab 31630; Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 1000 при комнатной температуре и экспозиции длительностью 1 ч. Для выявления связавшихся первичных антител использовали мультимерную безбиотинную систему детекции (D&A, Reveal-Biotin-Free Polyvalent DAB, Spring Bioscience Corporation, США). Препараты докрашивали гематоксилином Майера (Биовитрум, Россия).

Для выявления актин-содержащих клеток после стандартной процедуры депарафинирования срезов препараты обрабатывали мышинными моноклональными антителами к гладкомышечному альфа-актину (клон 1A4, разведение 1 : 2000) (AbCam, Великобритания) в течение 10 мин при комнатной температуре. В качестве вторичных реагентов применяли набор MACH2 Mouse (Bioss medical, США). Для визуализации продукта иммуногистохимической реакции препараты обрабатывали 3',3'-диаминобензидином (DAB+, Dako, Дания).

Флуоресцентная микроскопия матриц из ПЛА с мезенхимными стромальными клетками жировой ткани. Треки МСК-ЖТ *in vivo* отслеживали с помощью метки РКН-26 (Sigma, США) согласно протоколу производителя.

Флуоресцентную микроскопию в красном спектре проводили на микроскопе LSM 5 Pascal (Carl Zeiss, Германия).

Статистический анализ. Полученные результаты обрабатывали с использованием статистической программы Statistica 7.0 Stat.Soft for Windows. Значимость различий оценивали с помощью критерия знаковых рангов Уилкоксона для независимых выборок, различия считали значимыми при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Структура матрицы. Полученная матрица имела внутренний диаметр 1.1 мм и толщину стенки 250 ± 11 мкм. По данным электронной микроскопии ее стенка состоит из микроволокон ПЛА диаметром 2.5 ± 0.5 мкм. Волокна не имеют определенной ориентации, между ними располагаются поры размером 55 ± 12 мкм. Последние соответствуют среднему размеру МСК и превышает таковые всех соматических клеток крысы.

Посев и культивирование клеток на матрице. Фильтрационный посев МСК-ЖТ приводил к распределению клеток во всем объеме матрицы. Формировался градиент их распространения от максимального на внутренней поверхности трубки до минимального на ее внешней поверхности. Последующее культивирование в условиях проточного биореактора приводило к распространению клеток во внешние слои графта (Попов и др., 2018). Таким образом, удалось добиться равномерного распределения клеток в объеме матрицы.

Эксперименты на животных. Проведение опытов по протезированию брюшной аорты в первой группе не вызывало больших трудностей. Среднее время выполнения оперативного вмешательства составило 92.5 ± 11.3 мин. При манипулировании протезом в операционной ране не происходило значимой его деформации, при прокалывании и проведении атравматической иглы дефекты не образовывались, при формировании и затягивании узлов стенка графта не прорезывалась.

В группе 2 среднее время операции составило 98.3 ± 12.9 мин и требовало максимальной аккуратности и внимательности, так как стенка ПЛА матрицы после 14 сут культивирования в питательной среде становилась более мягкой. После пуска кровотока в обеих группах происходило пропитывание стенки матрицы элементами крови и фибрином, что приводило к изменению окраски матрицы на красный цвет, однако значимого кровотечения сквозь стенку матрицы и в области анастомозов не было. В первые сутки после операции животные начинали активно двигать задними конечностями; признаков ишемии не наблюдали. Пройодимость имплантатов в группе 1 составляла 86%; пять раз зарегистрировали тромбоз матрицы: на 3 сут ($n = 3$) и на 7 сут ($n = 2$) после операции. В группе 2 проходимость имплантатов составила 97%: тромбоз в отсутствие признаков ишемии задних конечностей зарегистрирован на 2-ой неделе эксперимента при заборе материала.

Макроскопическая оценка сосудистых графтов. Макроскопически у животных обеих групп на всех сроках выведения в зоне имплантации матрицы отсутствовали признаки острого воспаления и какие-либо патологические изменения окружающих тканей. Органы брюшной полости и забрюшинного пространства имели нативный вид. Лимфоаденопатии не было. Рубцовые процессы в области операции не выра-

жены. Снаружи имплантаты покрывались тонкой соединительнотканной капсулой (неоадвентицией) с множеством мелких сосудов. С течением времени окраска матриц приобретала оттенки нативных тканей (рис. 1, 2).

В группе 1 через 64 нед. во всех случаях в зоне имплантации ПЛА матрицы развились аневризмы различной степени выраженности (рис. 1а). В группе 2 образование аневризмы в зоне операции зарегистрировано в одном случае через 56 нед. ($n = 4$), в двух случаях — через 64 нед. ($n = 4$), а также в двух случаях отмечено образование аневризмы через 72 нед. ($n = 6$), тогда как интактные имплантаты по своему внешнему виду не отличались от брюшной аорты крысы (рис. 2а).

Флуоресцентная микроскопия. В группе 2 через 2, 7 и 14 сут после операции при флуоресцентной микроскопии в красном спектре выявляли МСК-ЖТ в стенке матрицы, меченные красителем РКН-26; последние преобладали в ее внутренних слоях. С течением времени отмечено снижение интенсивности сигнала. Через 14 сут регистрировали единичные меченые МСК-ЖТ.

Гистологическое исследование. На 2-е сут эксперимента в препаратах обеих групп отсутствовали признаки острой воспалительной реакции. Внутренняя поверхность графтов выстлана неравномерным слоем фибрина, заполняющим также пространство между волокнами полимера. В стенке матриц выявляли нейтрофилы, лимфоциты, лейкоциты и эритроциты. В группе 1 в наружной половине стенки матрицы определяли $85 \pm 10,2$, во внутренней — $47,2 \pm 5,6$ клеток в поле зрения. В группе 2 наблюдали большее число клеток и практически равномерное их распределение в наружной и во внутренней частях стенки матрицы: $159,8 \pm 13,7$ и $154,2 \pm 12,9$ клеток соответственно в поле зрения (рис. 3). Снаружи поверхность матриц окружена единичными фибробластами, лимфоцитами и макрофагами. Наличие последних более отчетливо прослеживали в препаратах группы 2.

На сроках 1–2 нед. после имплантации гистологическая картина не претерпевала значимых изменений. В зоне анастомозов выявляли распространение эндотелиальных клеток с аорты на графт. Наружная и внутренняя части стенки матрицы были заселены клетками: в группе 1 — $127,0 \pm 7,1$ и $62,2 \pm 7,5$ соответственно в поле зрения, а в группе 2 — $170,0 \pm 10,3$ и $120,5 \pm 10,5$ соответственно в поле зрения (рис. 3). На этих сроках эксперимента в обеих группах выявляли α -актин-содержащие клетки (миофибробласты и гладкомышечные), располагающиеся в формирующемся субэндотелиальном слое и в неоадвентиции, а также единичные среди волокон матрицы. Отметим, что в группе 2 α -актин-содержащих клеток больше, и они располагаются во всей стенке матрицы. В обеих группах CD-68⁺-клетки (макрофаги, моноциты, гигантские многоядерные клетки инородных тел

(ГМКИТ)) равномерно распределены в стенке матрицы. Они выявляются непосредственно вокруг волокон полимера, при этом в неоадвентиции ГМКИТ формируют неравномерный вал вдоль поверхности матрицы. Отличительной особенностью имплантатов группы 2 является развитие выраженной неоадвентиции вокруг матрицы. Клеточный состав последней представлен фибробластами, макрофагами, единичными ГМКИТ и лимфоцитами.

Через 4 нед. эксперимента в зоне анастомозов определяли ровный переход интимы с брюшной аорты на матрицу без признаков миоинтимальной гиперплазии. Вся внутренняя поверхность матрицы выстлана эндотелием. Субэндотелиальный слой выражен слабо. Число клеток в стенке матрицы по-прежнему превалировало в группе 2, где наблюдали их равномерное распределение (рис. 3). Отметим, что α -актин-содержащие клетки в обеих группах преобладали в субэндотелиальном слое, но также встречались в неоадвентиции. С этого срока наблюдения отмечали более равномерное распространение CD-68⁺-клеток в основном в наружной половине стенки матрицы и неоадвентиции, гораздо чаще встречались ГМКИТ. В группе 1 большую часть клеток также регистрировали в наружной части стенки матрицы. Более толстую неоадвентицию выявляли вокруг имплантатов группы 2. Неоадвентиция содержала многочисленные кровеносные сосуды, по краю графта располагались ГМКИТ.

Через 12 нед. эксперимента в обеих группах в зоне анастомозов интима брюшной аорты ровно переходит на интралюминальную поверхность матрицы. Неинтима состоит из эндотелиальных клеток и сформированного субэндотелиального слоя, представленного α -актин-содержащими клетками. Расположение CD-68⁺-клеток в стенке матрицы соответствует таковому на предыдущем сроке. Выявляются первые признаки биорезорбции полимера матрицы в обеих группах: отдельные волокна распадаются на фрагменты. В группе 2 клеток в матрице больше и, в отличие от группы 1, они равномерно распределены по всему объему графта (рис. 3). По внешнему краю имплантатов группы 2 располагались многочисленные ГМКИТ, снаружи они покрыты более толстой неоадвентицией, содержащей множество сосудов (табл. 1).

Через 24 нед. эксперимента в имплантатах обеих групп продолжает увеличиваться толщина неоинтимы (табл. 1). При этом в зоне анастомозов с брюшной аортой признаки миоинтимальной гиперплазии отсутствуют. В остальном гистологическая картина соответствует вышеописанной.

В группе 1 через 64 нед. ($n = 4$) эксперимента стенка имплантата представлена соединительной тканью и резидуальными фрагментами волокон ПЛА. На внутренней поверхности сформирована неоинтима, состоящая из эндотелия и субэндотелиального слоя с α -актин-содержащими клетками

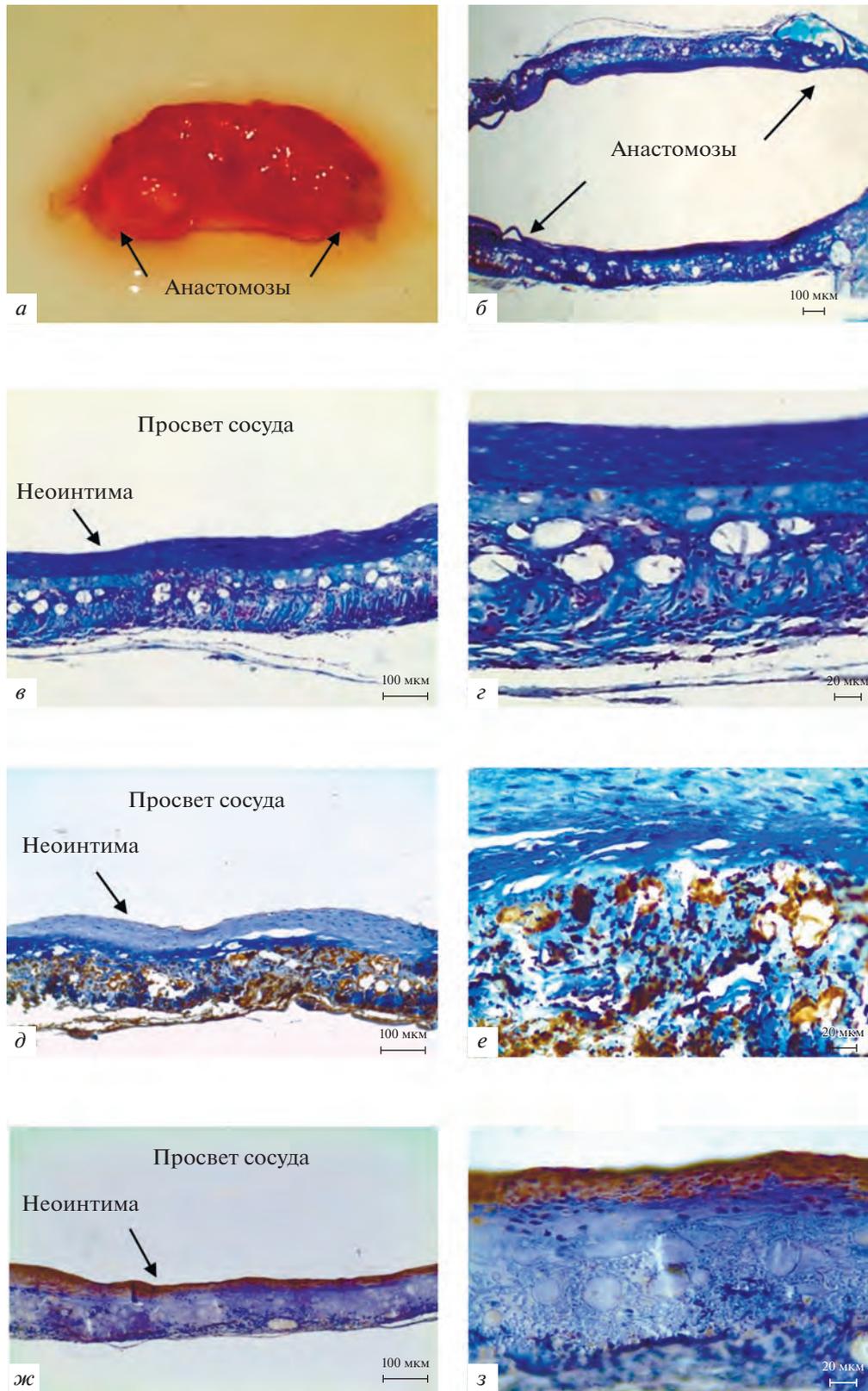


Рис. 1. Тканеинженерный сосудистый имплантат, полученный на основе матрицы из поли(L-лактида) (ПЛА) через 64 нед. после имплантации (группа 1). а – Фотография имплантата. б–з – Гистологические препараты: б–г – окраска по Маллори; д, е – иммуногистохимическое (ИГХ) выявление антигена к CD-68 (коричневый цвет); ж, з – ИГХ-выявление антигена к α -SMA (коричневый цвет). Увел об.: 4 \times (б), 10 \times (в, д, ж), 40 \times (г, е, з); и, к – электронная микроскопия имплантата.

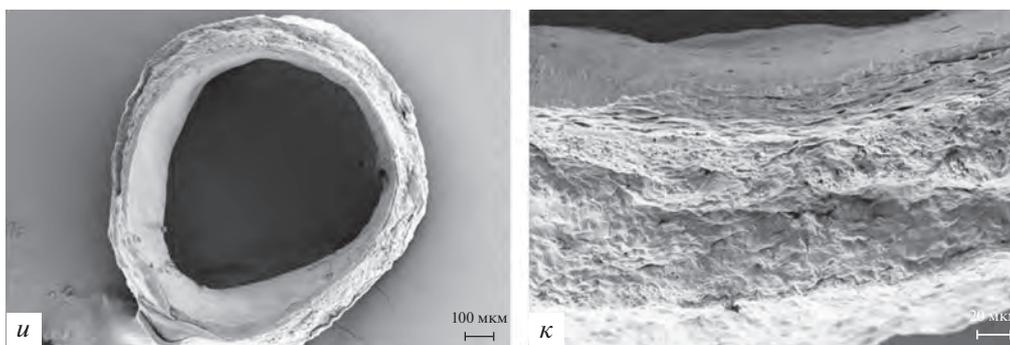


Рис. 1. Окончание

(рис. 1б, г, ж, з). Неомедия и неоадвентиция представлены в основном фибробластами, волокнами соединительной ткани и единичными α -актин-содержащими клетками. Клетки CD-68⁺ в подавляющем большинстве располагаются преимущественно в стенке матрицы и в составе неоадвентиции на границе с полимером (рис. 1в, д, е). В группе 2 через 72 нед. ($n = 6$) стенка имплантатов, в которых не было аневризмы ($n = 4$), представлена неоинтимой, основным средним слоем, сформированным на месте ПЛА матрицы, и толстой неоадвентицией (рис. 2). Неоинтима на внутренней поверхности графта состояла из эндотелиальных клеток и субэндотелиального слоя, выполненного из фибробластов, гладкомышечных клеток и коллагеновых волокон. Основным средним слоем представлен фибробластами и фиброцитами, и волокнами соединительной ткани (в основном коллагеновыми). Между ними выявлялись фрагменты полимера. Неоадвентиция состоит в основном из коллагеновых волокон, в ней определяются в небольшом количестве лимфоциты, макрофаги и ГМКИТ. В неоадвентиции отмечено формирование *vasa vasorum*. Дальнейшего увеличения числа клеток в стенке и толщины неоадвентиции не

происходит (рис. 3). В случае образования аневризмы зоны реконструкции выявляли истонченную стенку, состоящую из фибробластов, остатков ПЛА и единичных коллагеновых волокон.

ОБСУЖДЕНИЕ

Применение разработанных матриц в качестве сосудистых протезов показало их высокую надежность. При работе в операционной ране и выполнении сосудистого анастомоза не нарушалась целостность стенки графтов. Несмотря на их высокую пористость, после пуска кровотока не развивалось кровотечение сквозь стенку или по линии анастомоза. Проприодимость имплантатов в группе 1 составляла 86%; в группе 2 – 97%. Высокие показатели проходимости, вероятно, обусловлены наличием неоинтимы, которая состояла из эндотелия, распространяющегося на поверхность матрицы из зон анастомозов с брюшной аортой, и вновь сформированного субэндотелиального слоя. При этом здесь во всех случаях отсутствовали признаки миоинтимной гиперплазии, что, скорее всего, объясняется высокой пористостью, множеством переплетающихся мик-

Таблица 1. Морфометрическое исследование неоинтимы и неоадвентиции в имплантированных матрицах

Время, нед.	Толщина неоинтимы, мкм		Толщина неоадвентиции, мкм	
	Группа 1	Группа 2	Группа 1	Группа 2
2 сут	–	–	–	–
1	8.6 ± 1.8	9.1 ± 1.8	152 ± 10.3	636.0 ± 12.7 ^а
2	9.5 ± 1.2	10.3 ± 2.0	336.1 ± 13.4	684.0 ± 7.8 ^б
4	11.9 ± 1.1	13 ± 1.4	525.8 ± 15.4	728.4 ± 15.9 ^в
12	23.1 ± 4.1	28.4 ± 3.1	616.2 ± 19.6	932.0 ± 44.1 ^г
24	75.6 ± 8.5	95.6 ± 3.4	621.2 ± 11.8	961.6 ± 23.9 ^д
48	357.6 ± 13.0	327 ± 13.5	652.6 ± 10.5	818.0 ± 27.5 ^е
64	366.2 ± 13.0	299 ± 11.2	654.2 ± 11.4	821.0 ± 19.3 ^ж

Отличия от аналогичных показателей в группе 1 статистически значимы при: ^а $P = 0.0285$, ^б $P = 0.0285$, ^в $P = 0.0285$, ^г $P = 0.0285$, ^д $P = 0.0285$, ^е $P = 0.0285$, ^ж $P = 0.0285$.

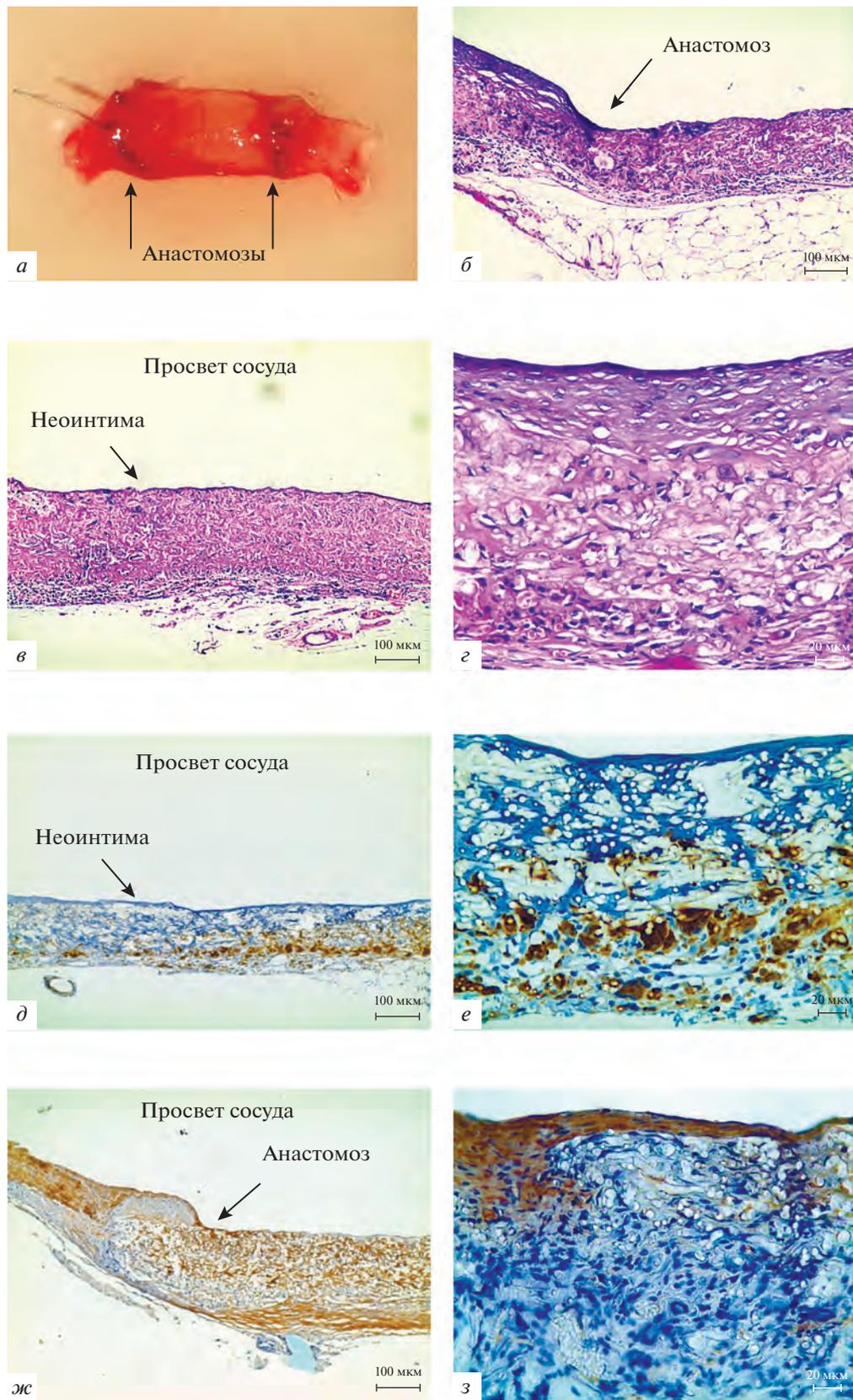


Рис. 2. Тканеинженерный сосудистый имплантат, полученный на основе матрицы из ПЛА и МСК-ЖТ через 72 нед. после имплантации (группа 2). *а* – Фотография имплантата. *б–з* – Гистологические препараты: *б–г* – окраска гематоксилином-эозином; *д, е* – ИГХ-выявление антигена к CD-68 (коричневый цвет); *ж, з* – ИГХ-выявление антигена к α SMA (коричневый цвет). Увел об.: 10 \times (*б, в, д, ж*) или 40 \times (*г, е, з*).

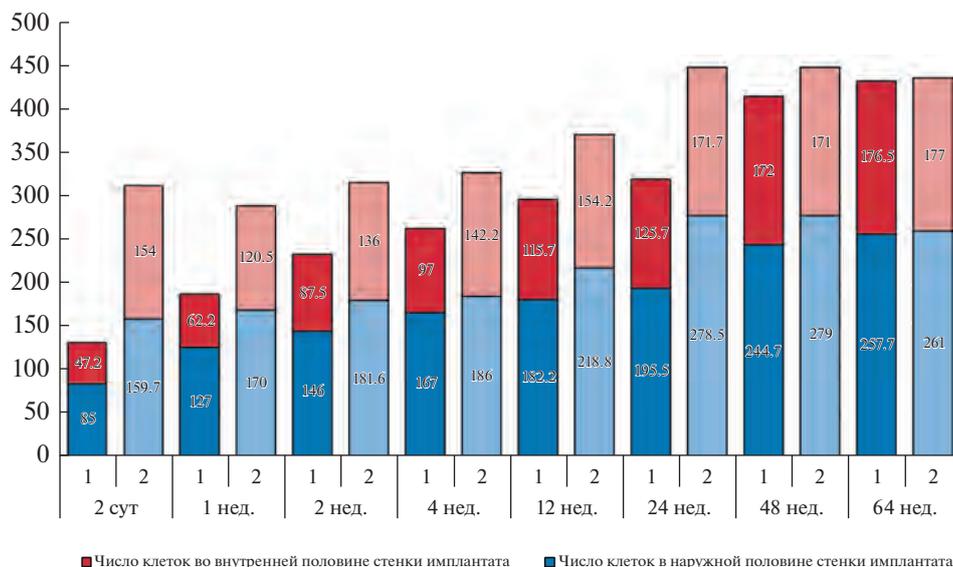


Рис. 3. Морфометрические показатели препаратов групп 1 и 2 (2 сут–64 нед.). На столбцах указано число клеток в наружной (синий и голубой цвета) и внутренней (красный и розовый цвета) половинах стенки имплантата.

роволокон и постепенной биодеградацией матрицы (Курьянов и др., 2008). Высокий уровень проходимости в группе 2, вероятно, обусловлен супрессией адгезии тромбоцитов мезенхимными стромальными клетками за счет наличия на их поверхности гепарансульфат-протеогликанов (Hashi et al., 2007; Krawiec, Vorp, 2012).

Гистологическое исследование имплантатов выявило различия двух групп на ранних сроках наблюдения. В группе 1 происходило постепенное проникновение клеток (фибробласты, макрофаги) в стенку матрицы с ее наружной поверхности, тогда как в группе 2 отмечали присутствие клеток в большом количестве и равномерное их распределение в стенке матрицы. Возможным объяснением являются цитокины и факторы роста (VEGF, bFGF, PDGF-BB, TGF- β и пр.), секретируемые культивированными на матрице МСК и привлекающие клетки соединительной ткани (Калинина, 2011). Другим вероятным механизмом может быть изменение свойств полимера (в частности) и матрицы в целом после длительного культивирования в питательной среде (например, увеличение гидрофильности), а также присутствие элементов среды в стенке матрицы. Рекрутирование клеток реципиента также привело к быстрому образованию более толстой неоадвентиции на наружной поверхности матрицы.

Однако на поздних сроках не наблюдали значимого качественного различия в морфологии имплантатов.

Иммуногистохимическое исследование выявило неспецифический иммунный ответ на инородное тело в виде распространения CD-68⁺-клеток в зоне расположения полимера. Основной средний слой

имплантатов после тотальной резорбции полимера представлен соединительной тканью, при этом α -актин-содержащие клетки (гладкомышечные, миофибробласты) отчетливо находили только в субэндотелиальном слое и неоадвентиции. В итоге аневризма имплантата формировалась в группе 1 во всех случаях через 16 мес., а в группе 2 – в 4 из 9 наблюдений (45%) на поздних сроках. Последнее, по-видимому, обусловлено вышеописанной разницей в динамике формирования новой сосудистой стенки.

Таким образом, разработанные биодеградируемые матрицы малого диаметра пригодны для имплантации в сосудистое русло. Предварительное культивирование на них МСК-ЖТ приводит к повышению показателей проходимости, привлечению клеток реципиента в структуру имплантата и формированию толстой соединительнотканной неоадвентиции, однако не обеспечивает образования структуры естественного сосуда. В настоящее время предварительное культивирование соматических клеток на матрице *in vitro* (эндотелиальных, гладкомышечных) представляется возможным решением этой насущной задачи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-73-30003).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа с животными выполнена в соответствии с правилами использования экспериментальных животных (согласно принципам Европейской конвенции, Страсбург, 1986 г. и Хельсинской декларации Всемирной меди-

цинской ассоциации о гуманном обращении с животными, 1996 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Калинина Н.И., Сысоева В.Ю., Рубина К.А., Парфенова Е.В., Ткачук. 2011. Мезенхимальные стромальные клетки в процессах роста и репарации тканей. *Acta naturae*. Т. 3. № 4. С. 32. (Kalinina N.I., Syssoeva V.Yu., Rubina K.A., Parfenova E.V., Tkachuk. 2011. Mesenchymal stem cells in the processes of tissue growth and repair. *Acta naturae*. V. 3. № 4. P. 32.)
- Курьянов П.С., Разуваев А.С., Вавилов В.Н. 2008. Гиперплазия интимы в зоне сосудистого анастомоза. *Ангиология и сосудистая хирургия*. Т. 14. № 4. С. 146. (Kuryanov P.S., Razuvaev A.S., Vavilov V.N. 2008. Intimal hyperplasia in the area of vascular anastomosis. *Angiol. Vascular Surgery*. V. 14. № 4. P. 146.)
- Попов Г.И., Крюков А.Е., Попрядухин П.В., Нащечкина Ю.А., Иванькова Е.М., Вавилов В.Н., Юдин В.Е., Смирнова Н.В. 2018. Выбор оптимальных методов посева и культивирования мезенхимных стволовых клеток на биоразлагаемой матрице из L-полилактида. *Цитология*. Т. 60. № 4. С. 279. (Popov G.I., Kryukov A.E., Popryadukhin P.V., Nashedkina Yu.A., Ivankova E.M., Vavilov V.N., Yudin V.E., Smirnova N.V. 2018. Determining optimal methods of cell seeding and cultivation on l-poly lactide biodegradable scaffold. *Tsitologiya*. V. 60. № 4. P. 279.)
- Acland R.D. 1972. Signs of patency in small vessel anastomosis. *Surgery*. V. 72. P. 744.
- Hashi C.K., Zhu Y., Yang G., Young W.L., Hsiao B.S., Wang K., Chu B., Li S. 2007. Antithrombogenic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* V. 104. P. 11915.
- Krawieca J.T., Vorp D.A. 2012. Adult stem cell-based tissue engineered blood vessels: A review. *Biomaterials*. V. 33. P. 3388.
- Popryadukhin P.V., Popov G.I., Yukina G.Yu., Dobrovolskaya I.P., Ivan'kova E.M., Vavilov V.N., Yudin V.E. 2017. Tissue-engineered vascular graft of small diameter based on electrospun polylactide microfibers. *Int. J. Biomater.* Article ID 9034186. <https://doi.org/10.1155/2017/9034186>
- Row S., Santandreu A., Swartz D.D., Andreadis S.T. 2017. Cell-free vascular grafts: Recent developments and clinical potential. *Technology (Singap. World Sci.)*. V. 5. P. 13.
- Sullivan S.J., Brockbank K.G.M. 2000. Small-diameter vascular grafts. In: *Principles of tissue engineering*. Second edition. Acad. Press. P. 447.
- Villalona G.A., Udelsman B., Duncan D.R., McGillicuddy E., Sawh-Martinez R.F., Hibino N., Painter C., Mirensky T., Erickson B., Shinoka T., Breuer C.K. 2010. Cell-seeding techniques in vascular tissue engineering. *Tiss. Eng. Part B. Rev.* V. 16. P. 341.
- Zhu Y., Carido M., Meinhardt A., Kurth T., Karl M.O., Ader M., Tanaka E.M. 2013. Three-dimensional neuroepithelial culture from human embryonic stem cells and its use for quantitative conversion to retinal pigment epithelium. *PLoS One*. V. 8. P. e54552. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054552>

Evaluation of Tissue-Engineered Vascular Grafts Based on the Biodegradable Scaffold and Mesenchymal Stem Cells in the Long-Term *in vivo* Experiment

G. I. Popov^{a, *}, V. N. Vavilov^a, P. V. Popryadukhin^b, G. Yu. Yukina^a, E. G. Sukhorukova^a, A. A. Davydov^a, E. M. Ivankova^b, A. E. Kryukov^b, N. V. Smirnov^{b, c}, and V. E. Yudin^{b, c}

^aPavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, 197022 Russia

^bInstitute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199004 Russia

^cPeter the Great St. Petersburg State Polytechnic University, St. Petersburg, 195251 Russia

*e-mail: trek-4300@yandex.ru

In order to create a tissue-engineered vascular graft, the bioresorbable tubular scaffold from poly(L-lactide) and the method for mesenchymal stem cells seeding and culturing were developed. In group 1, scaffolds without pre-seeded cells were implanted into the abdominal rat aorta; in group 2 scaffolds with pre-cultured rat adipose-derived mesenchymal cells were used. Follow-up in the group 1 was from 2 days to 64 weeks ($n = 36$), in the group 2 up to 72 weeks ($n = 42$). Patency in the group 1 – 86% (31/36), in the group 2 – 97% (41/42). Histology revealed gradual polymer biodegradation and replacement with connective tissue, however, after 64 weeks a total polymer resorption was achieved and an aneurysm formation was noted in all cases in the group 1. Cells amount and neoadventitia thickness were above in the group 2, however the graft morphology did not fundamentally differ from the group 1. Aneurysm formation was noted only in 45% of grafts at the later stages of follow-up in the group 2. Thus, the preliminary cultivation of mesenchymal stem cells on the scaffold led to a pronounced host cellular reaction, which probably made it possible to reduce the incidence of aneurysm formation, but did not ensure the formation of a natural vessel structure.

Keywords: tissue engineering, artificial vessel, bioresorbable scaffold, poly(L-lactide), adipose-derived mesenchymal stem cells