

Влияние различных вариантов модификации поверхности биodeградируемых пленочных матриксов на адгезию и жизнеспособность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

Антонова Л.В., Матвеева В.Г., Борисов В.В., Кремено С.В., Насонова М.В., Кудрявцева Ю.А., Головкин А.С.

Impact of various modifications of biodegradable membranous scaffolds surface on multipotent mesenchymal stromal cells adhesion and viability

Antonova L.V., Matveyeva V.G., Borisov V.V., Kremeno S.V., Nasonova M.V., Kudryavtseva Yu.A., Golovkin A.S.

НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН, г. Кемерово

© Антонова Л.В., Матвеева В.Г., Борисов В.В. и др.

Создание гибридного сосудистого графта на основе биосовместимых и биodeградируемых полимеров — один из возможных способов решить проблему отсутствия на рынке сосудистых протезов малого диаметра, необходимых для аортокоронарного шунтирования. Хорошие адгезивные свойства относительно культивируемых клеток и низкая цитотоксичность биополимеров способны улучшить биосовместимость сосудистых графтов на их основе. Исследовано влияние белковой модификации поверхности пленочных матриксов из полиоксиалканоатов и поликапролактона на их адгезивные свойства и цитотоксичность относительно мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. В работе использовались пленочные матриксы (ПМ) следующего состава: ПМ № 1 — полигидроксибутират/валерат с молекулярной массой (ММ) 2 307 кДа с поликапролактоном ММ 80 000 кДа, ПМ № 2 — состав идентичен ПМ № 1, но изготовление матрикса выполнено с помощью магнитной мешалки, ПМ № 3 — полигидроксибутират ММ 541 кДа с поликапролактоном ММ 80 000 кДа и ПМ № 4 — чистый поликапролактон ММ 80 000 кДа. Выявлено, что предварительная модификация поверхностей матриксов 75, 50, 25%-м растворами эмбриональной телячьей сыворотки позволила достоверно снизить цитотоксичность ПМ № 4 и улучшить адгезивные свойства ПМ № 1, 2, 4. Предварительная обработка фибронектином в концентрации 10 мкг/мл в наибольшей степени повлияла на улучшение адгезивных свойств ПМ № 1—4.

Ключевые слова: гибридные сосудистые графты, биосовместимость, полиоксиалканоаты, поликапролактон, мезенхимальные стволовые клетки.

Designing a hybrid vascular graft using biocompatible and biodegradable polymers is one of the ways to fill the market with vascular grafts of a small diameter necessary for coronary artery bypass surgery. Good adhesive properties of cultivated cells and low cytotoxicity of biopolymers can improve biocompatibility of polymer-based vascular grafts. The impact of protein modification of membranous polyhydroxyalkanoate and polycaprolactone scaffolds surface on their adhesive properties and cytotoxicity to multipotent mesenchymal stromal cells was evaluated. We used the following compositions of membranous scaffolds: № 1 polyhydroxybutyrate valerate MM 2 307 kDa with polycaprolactone MM 80 000 kDa, № 2 had the same composition but was made using a magnetic stirrer, №3 polyhydroxybutyrate MM 541 kDa with polycaprolactone MM 80 000 kDa and № 4 polycaprolactone MM 80 000 kDa only. Premodification of scaffolds surfaces with 75, 50 and 25% fetal calf serum was found to significantly reduce cytotoxicity of scaffold № 4 and improve the adhesive properties of scaffolds № 1, 2 and 3. Premodification with fibronectin (10 µg/ml) mostly improved the adhesive properties of scaffolds № 1—4.

Key words: hybrid vascular grafts, biocompatibility, polyhydroxyalkanoates, polycaprolactone, mesenchymal stem cells.

УДК 616.132-77:[615.462:677.076.426]:576.52

Введение

Одной из основных проблем сердечно-сосудистой хирургии остается отсутствие функционально надежных сосудистых графтов малого диаметра (от 2 до

5 мм). Ежегодная мировая потребность в протезах малого диаметра только для аортокоронарного шунтирования составляет около 450 тыс. штук (69,5% от всех протезов кровеносных сосудов). Одним из перспективных направлений современных научных исследований является разработка и создание тканеинженерных конструкций сосудов на основе биodeградируемых полимеров. Подобные сосудистые графты должны обладать повышенными гемосовместимыми и биомеханическими свойствами, низкой тромбогенностью и иммуногенностью, достаточной скоростью биodeградации, отсутствием токсичности собственных продуктов деградации. К настоящему времени ни один из разработанных аналогов сосудов малого диаметра не обладает этими качествами в полной мере [1]. Предварительное культивирование эндотелиальных клеток на синтетической поверхности графта *in vitro* методами тканевой (клеточной) инженерии позволило бы имитировать интиму естественных сосудов, что может значительно продлить сроки службы сосудистого протеза.

Одной из немаловажных характеристик биосовместимости тканеинженерных материалов являются адгезивные свойства, обеспечивающие в последующем взаимодействие биополимерных каркасов с культивируемыми клетками [1, 4, 7, 10]. Адгезивные свойства зависят как от физико-химических свойств материалов, на основе которых создаются имплантаты, так и от способов модификации поверхности тканеинженерных матриц. Для достижения этой цели используются различные подходы, включая нанесение на поверхность биodeградируемых материалов белков внеклеточного матрикса и компонентов сыворотки и крови [2, 7, 9]. Данное направление приобретает особую актуальность в связи с возможностью использования субстратов аутологичного происхождения.

Цель настоящей работы — изучить влияние различных вариантов модификации поверхности биodeградируемых пленочных матриц (ПМ) на адгезию и жизнеспособность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК).

Материал и методы

Для получения матриц были использованы полигидроксibuтират (ПГБ) с молекулярной массой (ММ) 541 кДа и сополимер полигидроксibuтирата с гидроксивалератом (ПГБВ) ММ 2 307 кДа, предоставленные в виде порошка Институтом биохимии и физио-

логии им. Г.К. Скрыбина (г. Пущино), поликапролактон (ПКЛ) ММ 70 000—90 000 кДа (Sigma, США); в качестве растворителя — хлороформ производства ЗАО «Вектон» (Россия). Двухмерные матрицы в виде пленок получали методом полива растворов полимеров на обезжиренную поверхность стекла. Использовали пленки следующего состава: № 1 — композиция ПГБВ ММ 2 307 кДа и ПКА, № 2 — ПГБВ ММ 2 307 кДа и ПКЛ (после перемешивания на магнитной мешалке в течение 2 ч), № 3 — композиция ПГБ ММ 541 кДа и ПКЛ, № 4 — ПКЛ. Структуру поверхности полимерных пленок изучали методом сканирующей электронной микроскопии в условиях высокого вакуума на микроскопе Hitachi S 3400 N (Япония).

Пленочные матрицы помещали в 24-луночные планшеты в параллельных пробах. Матрицы имели форму круга, площадь которого была чуть меньше площади дна лунки 24-луночного культурального планшета и приблизительно соответствовала 1,8 см². Для повышения адгезивных свойств поверхности ПМ инкубировали в течение 4 ч на мешалке при температуре 22—24 °С, а затем в течение 18 ч при температуре 37 °С в присутствии субстратов следующего состава: неразведенная эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС; Gibco, США), 75, 50, 25 и 10%-й растворы ЭТС (Ф2, Ф10) в стерильном 0,9%-м растворе хлорида натрия, фибронектин в концентрациях 2 и 10 мкг/мл (ЭТС75, ЭТС50, ЭТС25, ЭТС10 соответственно) (Sigma, США), коллаген I типа в концентрациях 20 и 50 мкг/мл (10 и 25 мкг/см² соответственно; K10, K25) (Gibco, США).

Культуру ММСК получали из подкожной жировой ткани абдоминальной области крыс линии Wistar ферментативным способом с использованием 0,05%-го раствора коллагеназы (Collagenase from Clostridium histolyticum, Type IA, Sigma, США). Культивирование клеток проводили в среде DMEM (Gibco, США), содержащей 1% HEPES буфера, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 0,1 мкг/мл стрептомицина, 0,1 мкг/мл амфотерицина В (Sigma Aldrich, США), при температуре 37 °С и 5% CO₂. Смена среды осуществлялась 1 раз в 2—3 сут. Для культивирования на матрицах использовали ММСК третьего пассажа, предварительно оценив их жизнеспособность окрашиванием 0,1%-м раствором трипанового синего и проведя фенотипический анализ методом проточной цитофлуориметрии на цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, США) с использованием монокло-

нальных антител CD90, меченных FITC, и CD45, меченных PE. ММСК высевали в концентрации $2,5 \cdot 10^5$ клеток на лунку и культивировали в течение 7 сут. В первый планшет за сутки до снятия ММСК с матриц в среду культивирования добавляли флуорохром PKH2 (Sigma, США). Детекцию флуоресцентно меченных ММСК на матрицах проводили посредством флуоресцентной микроскопии на инвертированном микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия). Эффективность адгезии клеток к поверхности ПМ оценивали по количеству прикрепившихся клеток, видимых в четырех полях зрения микроскопа. Перед исследованием клеточного апоптоза и некроза ММСК второго планшета снимали с поверхности матриц при помощи 0,5%-го раствора трипсина-ЭДТА (Sigma Aldrich, США), инкубируя 10 мин при температуре 37 °С. После термостабилизации действие фермента прекращали путем добавления среды для культивирования в объеме 10% от объема раствора трипсина. После этого пробирки со взвесью клеток центрифугировали 10 мин при 716g. После удаления надосадочной жидкости клетки ресуспендировали в 4 мл культуральной среды и направляли на цитофлуориметрический анализ, предварительно окрашивая ММСК красителем Annexin V, меченным PE, в комбинации с 7-AAD (BD Biosciences, США). В качестве контроля выступали ПМ, поверхность которых не подвергалась белковой модификации.

Рассчитывались средние значения M и ошибка среднего m . Для группировки данных использовался кластерный анализ. На первом этапе применялся древовидный кластерный анализ (полная связь, евклидово расстояние). На втором этапе с учетом результатов древовидного анализа проводился кластерный анализ, метод K -средних Мак-Кина. Для оценки значимости вкладов различных показателей в формирование кластеров использовался дисперсионный анализ. При всех видах статистического анализа учитывался уровень статистической значимости 95% ($p < 0,05$). Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica 6.0.

Результаты

По результатам сканирующей электронной микроскопии (рис. 1) ПМ № 1 имел практически ровную поверхность без пор, ПМ № 2 — пористую структуру поверхности с размерами пор от 1,49 до 2,22 мкм, ПМ № 3 — поверхность по типу булыжной мостовой с немногочисленными порами размером от 1,49 до 2,21 мкм, ПМ № 4 — неравномерную чешуйчатую поверхность.

Анализ культуры ММСК методом проточной цитофлуориметрии показал, что она на 98,5% состояла из CD90⁺45⁻-клеток. Исходно число жизнеспособных

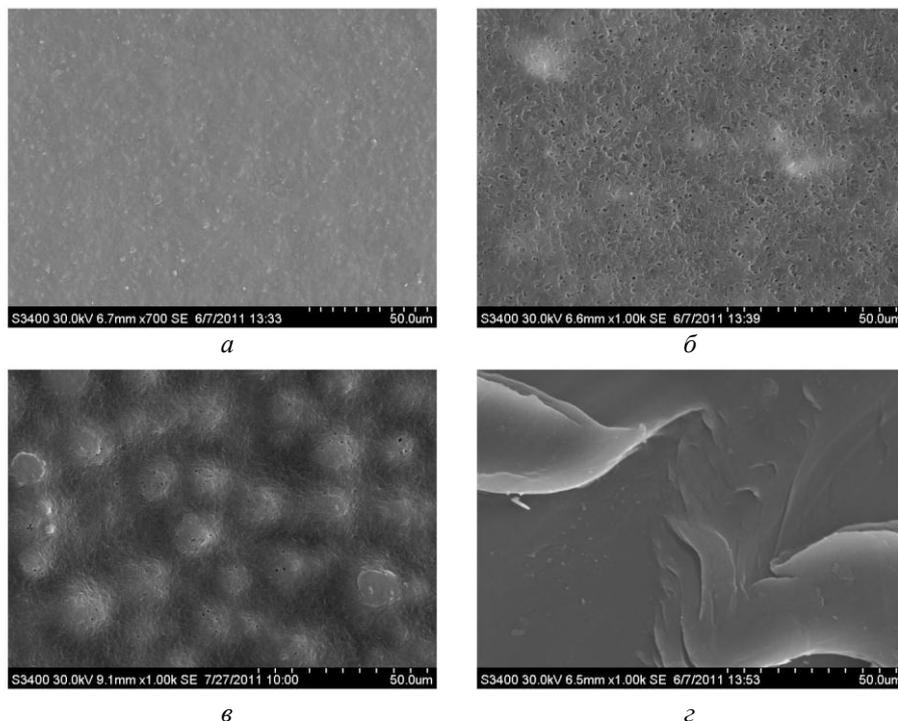


Рис. 1. Рельеф поверхности пленочных матриц различного состава: а — ПМ № 1; б — ПМ № 2; в — ПМ № 3; г — ПМ № 4. Сканирующая электронная микроскопия. Ув. 1 000

ММСК составило 97,0%. Через 7 сут культивации ММСК на поверхности ПМ выявлено, что иммобилизация клеток происходила в виде неоднородных очагов заселения, причем плотность заселения варьировала в зависимости от химического состава матриц и от способа белковой модификации (рис. 2). Из табл. 1 видно, что немодифицированные протеинами ПМ № 3 и 4 продемонстрировали неудовлетворительные адгезивные свойства. Однако после модификации поверхности ПМ № 4 различными концентрациями ЭТС, коллагена и фибронектина количество адгезированных ММСК достоверно увеличилось (в среднем в 3,3; 3,6 и 5,0 раза соответственно; $p < 0,01$). В случае с

ПМ № 3 лишь модификация фибронектином в различных концентрациях позволила в среднем в 4,8 раза увеличить количество адгезированных ММСК на данной матрице ($p < 0,01$). Хорошие адгезивные свойства продемонстрировали ПМ № 1 и 2, имеющие одинаковый химический состав, причем наличие пор на поверхности матрикса № 2 способствовало лучшей адгезии клеток при равных вариантах протеиновой модификации. Достоверная разница между средним количеством ММСК, адгезированных на ПМ № 1 и 2, получена при обработке неразведенной ЭТС ($p < 0,01$), а также 25%-м и 10%-м растворами ЭТС ($p < 0,05$; $p < 0,01$ соответственно).

Неразведенная ЭТС	75%-й раствор ЭТС	50%-й раствор ЭТС	25%-й раствор ЭТС	10%-й раствор ЭТС	Коллаген, 10 мкг/см ² (20 мкг/мл)	Коллаген, 25 мкг/см ² (50 мкг/мл)	Фибронектин, 2 мкг/мл	Фибронектин, 10 мкг/мл
-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	----------------------------------------------	----------------------------------------------	-----------------------	------------------------

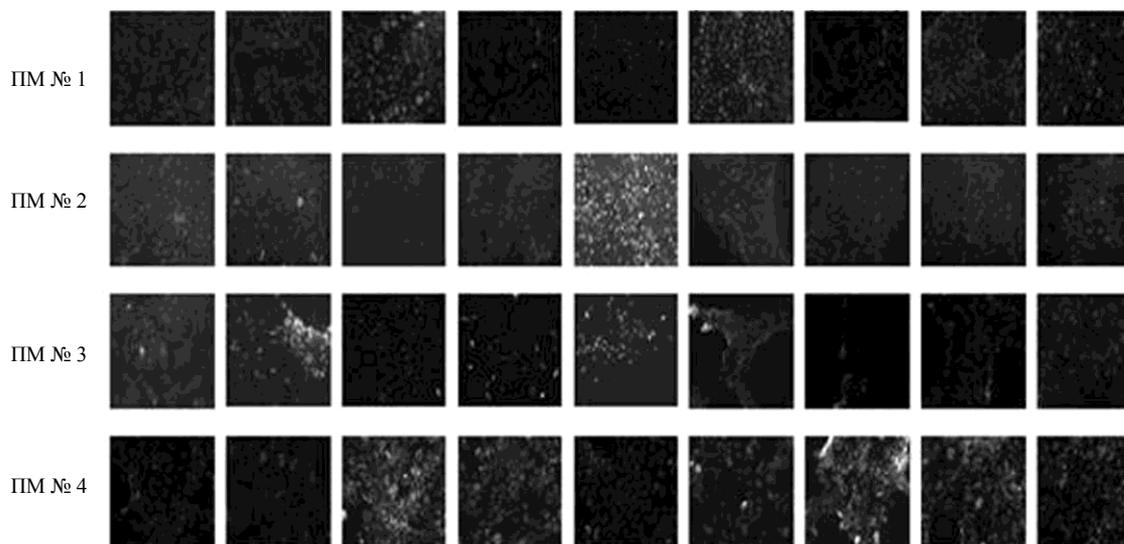


Рис. 2. Выраженность адгезии ММСК в зависимости от варианта протеиновой модификации и вида пленочного матрикса. Флуоресцентная микроскопия. Ув. 100

Таблица 1

Количество адгезированных ММСК в зависимости от вида пленочных матриксов и варианта белковой модификации ($M \pm m$), клеток/мм²

Вариант модификации поверхности пленочных матриксов	ПМ № 1	ПМ № 2	ПМ № 3	ПМ № 4
Немодифицированная	339,4 ± 74,8	394,3 ± 52,1	73,4 ± 47,6	98,4 ± 36,9
Концентрированная ЭТС	373,6 ± 15,8	587,0 ± 66,2**	89,5 ± 6,0	422,4 ± 22,03 [#]
75%-й раствор ЭТС	310,7 ± 15,9	425,8 ± 57,5	63,7 ± 8,2	312,0 ± 37,4 [#]
50%-й раствор ЭТС	365,7 ± 29,5	384,5 ± 38,9	54,4 ± 6,6	416,2 ± 46,2 [#]
25%-й раствор ЭТС	277,5 ± 10,1	529,3 ± 38,1*	41,3 ± 4,4	369,4 ± 33,1 [#]
10%-й раствор ЭТС	266,2 ± 7,5	384,6 ± 15,8**	84,6 ± 18,0	81,1 ± 4,2
Коллаген, 10 мкг/см ² (20 мкг/мл)	332,4 ± 16,6	351,2 ± 48,4	156,0 ± 12,4	322,1 ± 12,5 [#]
Коллаген, 25 мкг/см ² (50 мкг/мл)	335,1 ± 4,3	261,2 ± 7,2	189,4 ± 7,5	391,1 ± 15,6 [#]
Фибронектин, 2 мкг/мл	496,0 ± 24,7	484,2 ± 14,4	379,4 ± 26,5 [#]	353,4 ± 38,6 [#]
Фибронектин, 10 мкг/мл	424,9 ± 37,5	460,0 ± 14,5	320,4 ± 37,2 [#]	624,3 ± 21,3 [#]

* $p < 0,05$ — достоверность различий показателя с ПМ № 1 в условиях одинаковой модификации.

** $p < 0,01$ — достоверность различий показателя с ПМ № 1 в условиях одинаковой модификации.

[#] $p < 0,01$ — достоверность различий показателя в зависимости от условий модификации ПМ по сравнению с аналогичной немодифицированной.

Схожесть различных сополимерных матриц по способности к адгезии ММСК изучена с помощью кластерного анализа. При проведении древовидного кластерного анализа матриксы образовали два кластера (рис. 3,а): в первый кластер объединились ПМ № 1, 2 и 4, во второй — ПМ № 3. Разница в кластерном расстоянии, на котором произошло объединение матриц в первый и второй кластеры (469,6 и 943,1 соответственно), свидетельствовала о значительном отличии адгезивных свойств вошедших в них ПМ. Чтобы оценить вклад каждого из показателей в образование кластеров, был применен метод *K*-средних Мак-Кина. В соответствии с результатами древовидного анализа образовано два кластера (рис. 3,б): кластер 1 сформировал

ПМ № 3 при среднем количестве ММСК ($62,2 \pm 10,2$) клетки/мм² (кл/мм²). В кластер 2 вошли ПМ № 1, 2 и 4 при среднем количестве ММСК в кластере ($397,8 \pm 23,2$) кл/мм². Значительный вклад в это кластерное разделение внесли такие показатели, как количество ММСК на матрицах, поверхность которых модифицирована концентрированной ЭТС (ЭТСк), а также 75, 50 и 25%-м растворами ЭТС ($p < 0,05$).

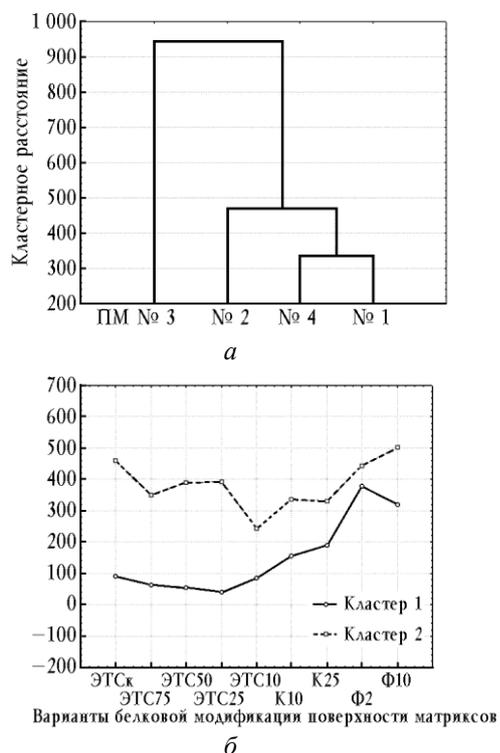


Рис. 3. Кластеры подобия пленочных матриц по количеству адгезированных ММСК в зависимости от условий белковой модификации поверхностей: а — древовидный кластерный анализ; б — метод

K-средних Мак-Кина

Степень апоптоза и развития некроза ММСК, снятых с матриц, напрямую отражает биосовместимость сополимерных конструкций в целом и их токсическое влияние на клетки во время проводимой культивации в частности. Процентное соотношение жизнеспособных клеток в раннем, позднем апоптозе и некрозе, снятых с немодифицированных поверхностей сополимерных пленок, выглядело следующим образом (табл. 2): инкубация на ПМ № 4, состоящего из чистого ПКЛ, привела к снижению количества жизнеспособных МСК до 43,7% и возникновению раннего апоптоза практически у половины клеток. Инкубация ММСК на матрицах смешанного состава не приводила к развитию значительного апоптоза клеток, а жизнеспособные ММСК составили в среднем 72,1% от снятых.

Таблица 2

Относительное число ММСК жизнеспособных, в апоптозе и некрозе после 7 сут культивации на немодифицированных пленочных матрицах

Пленочный матрикс	ММСК, снятые с немодифицированных поверхностей ПМ, %
-------------------	------------------------------------------------------

	Живые	Ранний апоптоз	Поздний апоптоз	Некроз
№ 1	73,5	25,1	1,3	0,2
№ 2	72,8	24,9	1,7	0,5
№ 3	70,0	27,9	1,9	0,3
№ 4	43,7	54,4	1,3	0,5

При проведении древовидного кластерного анализа образовалось три кластера: первый сформировали ПМ № 1 и 2, второй — ПМ № 3, третий — ПМ № 4 (рис. 4,а). Кластерное расстояние, на котором произошло объединение матриц (31,8; 44,8 и 53,3 соответственно), свидетельствовало о равноудаленности кластеров друг от друга, но причина данного разделения заключалась в совершенно разнонаправленной динамике. Относительное количество жизнеспособных ММСК после 7 сут инкубации на ПМ № 1 и 2 было схожим и увеличивалось в зависимости от способа белковой модификации. Обработка поверхности ПМ № 4 различными белками привела к значительному увеличению относительного числа жизнеспособных ММСК в процессе культивации по сравнению с таковыми без проведения модификации. Применение различных вариантов протеиновой модификации поверхности ПМ № 3 не способствовало статистически значимому изменению ($p > 0,05$) относительного числа жизнеспособных ММСК. Полученные данные были дополнены результатами кластерного анализа методом *K*-средних Мак-Кина, в результате которого образовано три кластера: в кластер 1 вошел ПМ № 4, в кластер 2 — ПМ № 1 и 2, в кластер 3 — ПМ № 3 (рис. 4,б). Модификация ПМ № 4 фибронектином в концентрациях 2 и 10 мкг/мл и ЭТС (концентрированная ЭТС и 75, 50 и 25%-й растворы) значительно улучшила адгезию ММСК на его поверхности по сравнению с исходной. Максимальное количество жизнеспособных ММСК (91,8%) наблюдали при обработке фибронектином в концентрации 2 мкг/мл, что в 2,1 раза больше, чем относительное число таковых, снятых с немодифицированной поверхности ПМ № 4 (табл. 2; $p < 0,01$). На ПМ № 1 и 2 (кластер 2) наблюдали стабильное увеличение числа жизнеспособных клеток при применении для модификации различных концентраций ЭТС и фибронектина. Максимальное относительное число живых ММСК составило 92,2% при обработке 50%-м раствором ЭТС и 89,8% — при обработке фибронектином в концентрации 10 мкг/мл.

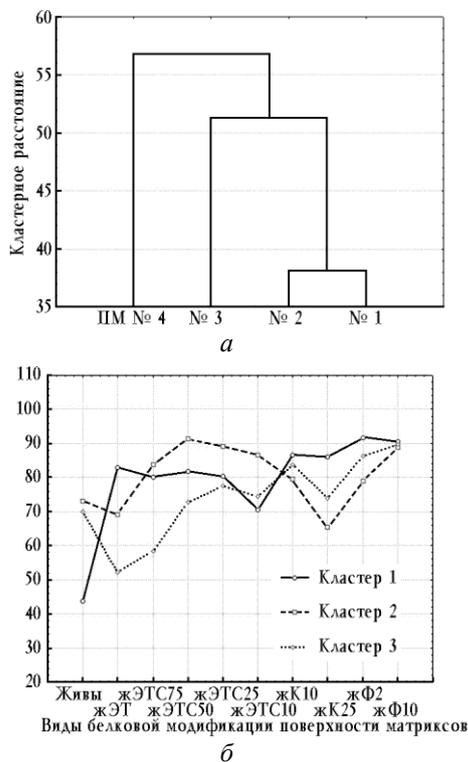


Рис. 4. Кластеры подобия пленочных матриц по количеству жизнеспособных ММСК, культивируемых на матрицах в зависимости от условий белковой модификации: а — древовидный кластерный анализ; б — метод K-средних Мак-Кина

Количество жизнеспособных ММСК, снятых с поверхности ПМ № 3, обработанного фибронектином в концентрации 10 мкг/мл, составило 89,6%. Прочие варианты протеиновой модификации поверхности ПМ № 3 не привели к увеличению относительного числа жизнеспособных ММСК ($p > 0,05$).

При изучении частоты возникновения раннего апоптоза (РА) среди ММСК, культивируемых на матрицах, в процессе древовидного кластерного анализа сформировались те же кластеры (рис. 5,а). Результаты, полученные методом K-средних Мак-Кина, это практически зеркальное отражение данных по числу жизнеспособных ММСК (рис. 5,б), а именно: на фоне белковой модификации поверхности ПМ № 4 резко снизился процент клеток в раннем апоптозе. Наименьшее количество ММСК, находящихся в раннем апоптозе, наблюдалось после использования фибронектина в концентрациях 2 и 10 мкг/мл и соответствовало 5,7 и 6,8%.

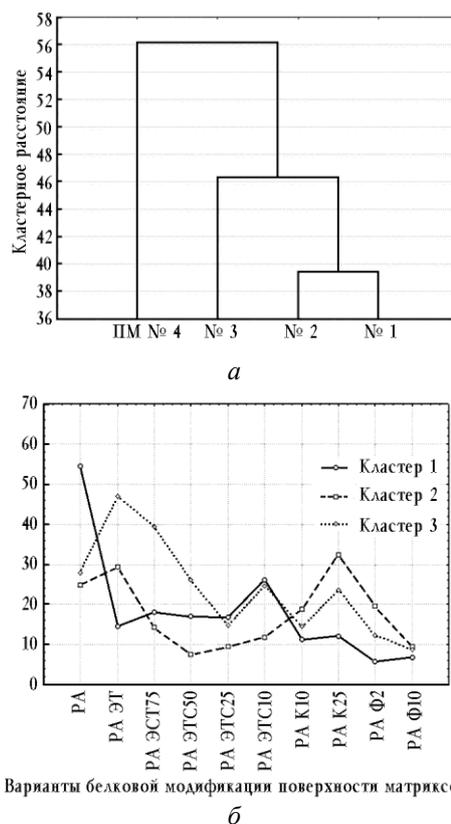


Рис. 5. Кластеры подобия пленочных матриц по частоте возникновения раннего апоптоза среди культивируемых на их поверхности ММСК в зависимости от условий белковой модификации: а — древовидный кластерный анализ; б — метод K-средних Мак-Кина

Модификация фибронектином в концентрации 10 мкг/мл оказалась эффективной и при модификации ПМ № 1, 2 и 3, так как на этом фоне ранний апоптоз развивался лишь в 11,6; 7,5 и 8,8% случаев соответственно. Следует отметить, что концентрированная ЭТС, 10%-й раствор ЭТС и коллаген в концентрации 50 мкг/мл усиливали токсический эффект на ММСК в процессе культивации. Так, частота раннего апоптоза среди ММСК, культивируемых на немодифицированном ПМ № 3, составляла 27,9%, тогда как после культивации на этом же матрице, обработанном концентрированной ЭТС, частота встречаемости раннего апоптоза увеличилась в 1,7 раза и достигла 46,9% ($p < 0,05$). Причину данных явлений необходимо изучить в дополнительных экспериментах.

Частота возникновения позднего апоптоза (от 0,5 до 2,5%) и некроза (от 0,1 до 1,3%) в культуре ММСК после 7 сут культивации на модифицированных матрицах была минимальной и не имела статистически значимых различий ($p > 0,05$).

Обсуждение

Результаты сканирующей электронной микроскопии показали отсутствие на поверхности пленочных матриц пор, размер которых обеспечил бы полноценную адгезию ММСК. В экспериментах показано, что оптимальным для клеточной адгезии является размер пор от 100 до 350 мкм в зависимости от типа культивируемых клеток [5, 6]. Поэтому полученные нами результаты по оценке адгезивных свойств сополимерных матриц и цитотоксического эффекта, возникающего при контакте ММСК с сополимерными структурами, наталкивают на мысль о различной биосовместимости комбинаций полимеров, использованных для культивирования клеток.

Высокую степень клеточной адгезии и низкий уровень цитотоксичности без дополнительной модификации поверхности продемонстрировали матрицы, в состав которых входил ПГБВ ММ 2 307 кДа, что согласуется с данными литературы [2, 3]. Матрикс, созданный лишь на основе синтетического полимера поликапролактона, обладал неудовлетворительными адгезивными свойствами относительно ММСК и высокой цитотоксичностью, на что указывают и другие авторы [8]. Цитотоксические свойства матрицы, в состав которого входил ПГБ, не превысили таковые при использовании ПГБВ, однако адгезивные свойства оказались не лучше, чем у синтетического полимера ПКЛ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что цитотоксичность у биополимеров ниже, чем у синтетических полимеров.

Обработка поверхностей ПМ различными белковыми субстратами перед посевом ММСК позволила значительно улучшить адгезивные свойства и снизить цитотоксичность сополимерных матриц. Пример тому — динамика изменения рассматриваемых параметров при применении матрикса, состоявшего из чистого поликапролактона. Количество адгезированных клеток возросло в среднем в 3,3 раза на фоне предварительной обработки поверхности ПМ № 4 различными концентрациями ЭТС ($p < 0,01$), в 3,6 раза — при обработке коллагеном ($p < 0,01$) и в 5 раз — при воздействии фибронектином ($p < 0,001$). На этом фоне белковая модификация поверхности ПМ № 4 способствовала сокращению в 8,6 раза относительного числа клеток в раннем и позднем апоптозе (с

55,7% без модификации поверхности до 6,5% при обработке фибронектином; $p < 0,001$).

Схожий результат отмечен при модификации поверхностей ПМ № 1 и 2, в состав которых введен ПГБВ и ПКЛ, хотя и первоначальная выраженность цитотоксического эффекта при контакте ММСК с матрицами данного химического состава была низкой (в 2,1 раза ниже, чем при применении матрикса из чистого поликапролактона). На рис. 5,б видно, что число ММСК, находящихся в раннем апоптозе, было ниже при обработке поверхностей матриц растворами ЭТС различных концентраций и фибронектином в концентрации 10 мкг/мл. Так, минимальное относительное число ММСК в состоянии раннего апоптоза сократилось в 2,3 раза ($p < 0,05$) на фоне модификации 50%-м раствором ЭТС (с 26,5% до модификации до 11,7% после нее) и в 3,5 раза ($p < 0,01$) — при обработке фибронектином в концентрации 10 мкг/мл (с 26,5% до модификации до 7,6% после нее). При этом адгезия клеток возросла при обработке различными концентрациями фибронектина (в 1,3 раза по сравнению с немодифицированными ПМ № 1 и 2), что, однако, не имело статистической значимости ($p > 0,05$).

Из всех использованных вариантов протеиновой модификации поверхности пленочного матрикса № 3, в состав которого входил ПГБ и ПКЛ, лишь обработка фибронектином в концентрации 10 мкг/мл позволила снизить цитотоксичность данного матрикса в 4 раза ($p < 0,01$) (с 29,7% до модификации до 7,5% после модификации) и улучшить его адгезивные свойства. Количество адгезированных ММСК увеличилось в среднем в 4,8 раза ($p < 0,01$) по сравнению с первоначальным.

Заключение

Многофакторный кластерный анализ позволил определить оптимальные по составу полимерные матрицы, пригодные для клеточной адгезии, и эффективные варианты белковой модификации. Среди немодифицированных пленочных матриц наилучшими характеристиками для культивации клеток обладали матрицы на основе композиции полигидроксипутират/валерат/поликапролактон, а худшими — на основе чистого поликапролактона. Белковая модификация поверхностей пленочных матриц 75, 50, 25%-м растворами ЭТС значительно улучшила адгезивные

свойства ПМ № 4, 1 и 2. Модификация поверхностей пленочных матриц фибронектином улучшила адгезивные свойства всех сополимерных композиций, причем наиболее эффективной оказалась обработка фибронектином в концентрации 10 мкг/мл.

Литература

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

2. Марковцева М.Г., Немец Е.А., Севастьянов В.И. Пористые трехмерные носители для культивирования и трансплантации клеток на основе сополимера гидроксibuтирата с гидроксивалератом // Вестн. трансплантологии и искусственных органов. 2006. Т. 8, № 4. С. 77—79.
3. Шишацкая Е.И., Еремеев А.В., Гительзон И.И. Исследование цитотоксичности полиоксиканоатов в культуре животных клеток: докл. РАН. 2000. Т. 374, № 4. С. 561—564.
4. Шишацкая Е.И. Клеточные матрицы из резорбируемых полигидроксиалканоев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2007. Т. II, № 2. С. 68—72.
5. Hu Y., Grainger D.W., Winn S.R. et al. Fabrication of poly(β -hydroxy acid) foam scaffolds using multiple solvent systems // J. Biomed Mater Res. 2002. V. 59, № 3. P. 563—572.
6. Karageorgiou D., Kaplan V. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis // Biomaterial. 2005. V. 25. P. 1457—1474.
7. Neuss S., Apel C., Buttler P. et al. Assessment of stem cell/biomaterial combinations for stem cell-based tissue engineering // Biomaterials. 2008. № 29. P. 302—313.
8. Pankajakshan D., Krishnan K., Krishnan L. Vascular tissue generation in response to signaling molecules integrated with a novel poly(ϵ -caprolactone)-fibrin hybrid scaffold // J. Tissue Eng. Regen. Med. 2007. № 1. P. 389—397.
9. Sales V., Engelmayr G., Johnson J. et al. Protein precoating of elastomeric tissue-engineering scaffolds increased cellularity, enhanced extracellular matrix protein production and differentially regulated the phenotypes of circulating endothelial progenitor cells // Circulation. 2007. № 116. P. 55—63.
10. Siepe M., Akhyari P., Lichtenberg A. et al. Stem cells used for cardiovascular tissue engineering // Eur. J. Cardiothorac. Surg. 2008. № 34. P. 242—247.

Поступила в редакцию 07.11.2011 г.

Утверждена к печати 05.03.2012 г.

Сведения об авторах

Л.В. Антонова — канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии НИИ КПССЗ СО РАМН (г. Кемерово).

В.Г. Матвеева — науч. сотрудник лаборатории клеточных технологий НИИ КПССЗ СО РАМН (г. Кемерово).

В.В. Борисов — канд. биол. наук, зав. лабораторией ультраструктурных исследований тканей НИИ КПССЗ СО РАМН (г. Кемерово).

С.В. Кремено — канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории клеточных технологий НИИ КПССЗ СО РАМН (г. Кемерово).

М.В. Насонова — науч. сотрудник лаборатории новых биоматериалов НИИ КПССЗ СО РАМН (г. Кемерово).

Ю.А. Кудрявцева — д-р биол. наук, зав. лабораторией новых биоматериалов НИИ КПССЗ СО РАМН (г. Кемерово).

А.С. Головкин — канд. мед. наук, зав. отделом экспериментальной и клинической кардиологии, зав. лабораторией клеточных технологий НИИ КПССЗ СО РАМН (г. Кемерово).

Для корреспонденции

Антонова Лариса Валерьевна, тел.: 8 (384-2) 51-23-43, 8-905-906-0451; e-mail: antonova.la@mail.ru, antolv@cardio.kem.ru.