DOI: 10.23868/201703009

НЕТКАНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ: ВЫБОР СТРУКТУРЫ И СПОСОБА ЗАСЕЛЕНИЯ

И.В. Арутюнян ^{1,2}, Т.Х. Тенчурин ³, Е.Ю. Кананыхина ^{1,2}, В.П. Черников ², О.А. Васюкова ², А.В. Ельчанинов ^{1,4}, А.В. Макаров ^{1,2}, А.А. Коршунов ¹, А.А. Буров ¹, Ю.Л. Подуровская ¹, В.Д. Чупрынин ¹, Е.В. Уварова ¹, Д.Н. Дегтярев ¹, А.Д. Шепелев ³, В.Г. Мамагулашвили ³, Р.А. Камышинский ³, С.В. Крашенинников ³, С.Н. Чвалун ³, Т.Х. Фатхудинов ^{1,5}.

¹ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова, Москва, Россия

² Научно–исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

³Курчатовский комплекс НБИКС-технологий НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

⁴ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,

Москва, Россия

⁵ Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Nonwoven polycaprolactone scaffolds for tissue engineering: the choice of the structure and the method of cell seeding

I.V. Arutyunyan ^{1,2}, T.Kh. Tenchurin³, E.Y. Kananykhina ^{1,2}, V.P. Chernikov², O.A. Vasyukova², A.V. Elchaninov ^{1,4}, A.V. Makarov ^{1,2}, A.A. Korshunov ¹, A.A. Burov ¹, Y.L. Podurovskaya ¹, V.D. Chuprynin ¹, E.V. Uvarova ¹, D.N. Degtyarev ¹, A.D. Shepelev ³, V.G. Mamagulashvili ³, R.A. Kamyshinskiy ³, S.V. Krasheninnikov ³, S.N. Chvalun ³, T.Kh. Fatkhudinov ^{1,5}

¹ Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

² Scientific Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

³Kurchatov's complex of NBICS-technologies, National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

⁴N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

⁵ Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Нетканые материалы на основе поликапролактона, полученные методом электроформования, являются перспективными имплантатами для эндопротезирования. Заселение таких имплантатов мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками способствует замещению протеза собственной соединительной тканью реципиента.

Целью настоящего исследования являлось сравнение эффективности трех методов заселения клетками нетканых носителей на основе поликапролактона, обладающих различными пространственными характеристиками.

Методом электроформования были получены три образца поликапролактоновых матриц, отличающихся толщиной, диаметром пор и волокон, биомеханическими свойствами. Заселение носителей мечеными мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками пупочного канатика проводили тремя способами: статичным, динамическим и методом с использованием капиллярного эффекта. Оценивали распределение клеток по поверхности и толщине образцов, метаболическую активность клеток измеряли с помощью MTT-теста.

Статичный метод позволил получить носители с равномерным покрытием поверхности, однако клетки в основном располагались в верхней трети матрикса. Динамический метод оказался эффективен только для носителей толщиной более 500 мкм, независимо от диаметра пор. Метод заселения с использованием капиллярного эффекта был эффективен только для носителей с диаметром пор 20–30 мкм, независимо от толщины материала.

Биорезорбируемые нетканые материалы на основе поликапролактона, полученные методом электроформования, обладают подходящими биомеханическими свойствами для выполнения пластики дефектов стенок брюшной полости, имеют сходное с матриксом нативной ткани строение. Выбор наиболее эффективного метода заселения носителей клетками зависит от его пространственных характеристик — толщины материала, диаметра пор и волокон, которые, в свою очередь, определяются условиями электроформования материала.

Ключевые слова: тканевая инженерия, электроформование, поликапролактон, нетканый материал, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки пупочного канатика, эндопротезирование.

e-mail: fatkhudinov@gmail.com

Nonwoven polycaprolactone materials produced by electrospinning are perspective internal prosthetic implants. Seeding these implants with multipotent mesenchymal stromal cells stimulates the replacement of the prosthesis with recipient's own connective tissue.

Electrospinning method was used for producing polycaprolactone matrices differing in thickness, pore diameter, fiber size, and biomechanical properties. Labeled cells were seeded on scaffolds in three ways: (1) static, (2) dynamic, and (3) directed flow of the cell suspension generated by capillary action. Cell distribution on the surface and the interior of the scaffolds was studied; the metabolic activity of cells was measured by MTT assay.

Static seeding method yielded fully confluence of cells covered the entire scaffold surface, but the cells were located primarily in the upper third of the matrix. Dynamic method proved to be effective only for scaffolds of thickness greater than 500 microns, irrespective of the pore diameter. The third method was effective only for scaffolds with the pore diameter of 20-30 microns, regardless of the material thickness.

Resorbable nonwoven polycaprolactone electrospun materials have appropriate biomechanical properties and similar to native tissue matrix structures for internal prosthesis. The choice of the most effective cell seeding method depends on the spatial characteristics — the material thickness, pore diameter, and fibers size, which are determined by the electrospinning conditions.

Keywords: tissue engineering, electrospinning, polycaprolactone, nonwoven material, umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stromal cells, internal prosthesis.

Введение

Применение сетчатых имплантатов широко распространено в хирургической практике, в частности, является наиболее оптимальным и часто используемым методом лечения грыж стенок брюшной полости [1]. Применяются синтетические протезы на основе политетрафторэтилена, полиэтилена или полипропилена [2, 3]. Основным недостатком таких материалов считается их небиорезорбируемость: протезы в течение всей жизни остаются в теле реципиента, не растут вместе с окружающими тканями (что особенно важно в детской хирургии), вызывают хроническое воспаление в виде гранулемы инородных тел, могут деформировать окружающие ткани, инфицироваться. Так, например, при пластике обширных дефектов диафрагмы с помощью нерезорбируемых протезов частота рецидивов может достигать 50% [4].

Попытка решить данную проблему была предпринята около 15 лет назад, когда было предложено использование биологических протезов. Такие протезы представляют собой тканевые матриксы, полученные из дермы или подслизистой оболочки тонкой кишки после децеллюляризации [5]. Несмотря на их очевидное преимущество в виде высокой биосовместимости, такие протезы обладают и рядом недостатков: быстрая резорбция после трансплантации и связанное с этим критическое снижение механической прочности, высокая себестоимость и потенциальная иммуногенность [6, 7].

Таким образом, в современной хирургии актуальной является проблема создания принципиально новых биорезорбируемых материалов для пластики стенок брюшной полости. Основные требования к данным материалам — биосовместимость, длительный срок резорбции, соответствие биомеханических свойств характеристикам замещаемой ткани.

Появление технологии электроформования (электроспиннинга) сделало возможным получение полимерных материалов с заданными структурными и биомеханическими свойствами, приближающими их к натуральным матриксам тканей [8]. Одним из наиболее перспективных можно считать нетканый материал на основе поликапролактона (ПКЛ), который обладает оптимальными физико-химическими свойствами, биосовместим, недорог, а срок его резорбции в организме исчисляется месяцами или даже годами, что значительно превышает показатели других алифатических полиэфиров — полилактидов и полигликолидов [9–11]. Опубликованы обнадеживающие результаты экспериментальных исследований использования ПКЛ для протезирования сосудов малого диаметра [12, 13], восполнения дефектов костной ткани [14] и кожи [15].

ПКЛ также используют в качестве носителя для клеток, чаще всего фибробластов и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (MMCK), выделенных из костного мозга, жировой ткани, пуповинной крови и др. [16–19]. По литературным данным, заселение имплантатов ММСК стимулирует их васкуляризацию и интеграцию с окружающими тканями, повышая эффективность их применения при герниопластике [20]. Было показано, что ММСК в больше степени, чем фибробласты, стимулируют врастание ткани в имплантат при подкожной или перитонеальной трансплантации [21]. Иммуномодулирующая активность ММСК улучшает биосовместимость имплантатов [22], и носители, заселенные ММСК, менее иммуногенны, чем носители, заселенные фибробластами [23]. Результаты сравнения иммуномодулирующей активности ММСК из различных источников достаточно противоречивы [24], однако многие исследователи считают, что наиболее перспективными являются ММСК, выделенные из пупочного канатика [25, 26].

Эффективность заселения носителя клетками во многом определяет судьбу имплантата [27]. Известно, что условия электроформования ПКЛ материала задают его биомеханические свойства и пространственные характеристики (микро- и наноструктуру), что в свою очередь влияет на выбор оптимального способа заселения носителя [28, 29].

Целью настоящего исследования являлось сравнение эффективности трех методов заселения клетками нетканых носителей на основе поликапролактона, обладающих различными пространственными характеристиками.

Материал и методы

Процесс электроформования волокнистых материалов на основе поликапролактона

Структурные характеристики трехмерных волокнистых материалов, полученных методом электроформования, зависят от скорости отверждения жидкой нити в процессе ее растяжения в электрическом поле, которая определяется давлением пара и теплотой испарения растворителя. Таким образом, варьируя тип растворителя и объемный расход полимерного раствора, можно влиять на размер волокна и структуру получаемого материала.

В качестве растворителей ПКЛ (Sigma-Aldrich, США, M_n 80 кДа) были выбраны хлороформ (ХФ) (P = 21,66 кПа; $\Delta H_{ucn.}$ = 31,28 кДж/моль) и этилацетат (ЭА) (P = 9,86 кПа; $\Delta H_{ucn.}$ = 35,6 кДж/моль). На основе данных растворителей в смеси с этиловым спиртом (ЭС) были приготовлены растворы ПКЛ различной концентрации. Диапазон оптимальных концентраций растворов, приводящий к получению бездефектных волокон, был определен ранее [29].

Три варианта ПКЛ материалов изготавливали при параметрах электроформования, указанных в табл. 1.

Таблица 1. Параметры получения нетканых материалов на основе ПКЛ

№ образца	Состав полимерного раствора	Напряжение, приложенное к шприцевой игле, кВ	Расстояние между иглой и приемным электродом, см	Объемный расход полимерного раствора, мл/ч
1	ПКЛ 8,6%: (ЭА 90%+ЭС 10%)	13,2	28	1
2	ПКЛ 8,6%: (ХФ 90%+ЭС 10%)	13,8	29	5
3	ПКЛ 15%: (ХФ 90%+ЭС 10%)	15,9	39	70

Процесс электроформования проводили в герметичном пластиковом коробе при комнатной температуре и относительной влажности воздуха 30–40%. С целью предотвращения подсыхания прядильного раствора на конце дозирующего капилляра проводили его обдувку растворителем из паровоздушной смеси (10 л/ч.). Изготовленные образцы подвергали вакуумированию при разрежении 1 мбар до полного удаления растворителя в течение 24 ч.

Определение среднего диаметра волокна материалов

Морфологию поверхности нетканых волокнистых материалов изучали с помощью сканирующего электронно-ионного микроскопа Versa 3D DualBeam (FEI, США) в режиме высокого вакуума с использованием ICE-детектора вторичных электронов. Исследование проводили при низком ускоряющем напряжении (1 кВ), что позволило избежать накопления электрического заряда на образцах, усилить топографический контраст, а также увеличить пространственное разрешение изображений. С помощью программы ScopePhoto Image Software (ScopeTek, Китай) определяли диаметр 100 волокон.

Определение пористости материалов

Пористость образцов определяли по соотношению объема, занимаемого волокнами, и объема всего материала. Образец взвешивали на аналитических весах Sartorius CPA324S-OCE (Sartorius, Германия), затем вычисляли объем, занимаемый волокнами. Определение общего объема материала проводили с помощью толщиномера для мягких материалов.

Определение размера пор материалов

Размер пор образцов определяли методом точки пузырька, который основан на эффекте капиллярности. Данным методом можно рассчитать размер крупных (образование первого пузырька) и средних пор (начало кипения) в материале по уравнению Лапласа:

$$D = 4 \cdot \gamma \cdot (\cos \theta) / P$$

где у — поверхностное натяжение на границе этиловый спирт-воздух, мН/м; θ — краевой угол смачивания; *P* — давление в точке пузырька, Па.

Для измерения краевых углов смачивания использовали систему анализа формы капли DSA 30E (KRUSS, Германия).

Определение механических характеристик материалов

Исследования механических характеристик образцов нетканых волокнистых материалов проводили на разрывной машине Инстрон-5965 (Instron, США) при следующих условиях: температура 37°С; относительная влажность 60%, скорость растяжения 10 мм/мин., рабочий размер образца 5×10 мм. Расчет производили по результатам испытания не менее пяти параллельных образцов.

Прочность рассчитывали по формуле, определяя условное сечение образцов через их массу и плотность полимера [30]:

$$P = \frac{F_{\rm p}}{S_{\rm vcn}} = \frac{l \cdot \rho \cdot F_{\rm p}}{m} ,$$

где $F_{\rm p}$ — разрывная нагрузка, Н; l — длина рабочей части образца, м; m — масса рабочей части образца, кг; ρ — плотность ПКЛ, кг/м³.

Подготовка носителей к заселению клетками

Образцы размером 9×12 мм последовательно помещали на 20 мин. в 96° и 70° этанол для смачивания и стерилизации, трижды по 5 мин. отмывали от этанола в фосфатно-солевом буфере pH = 7,4 (ПанЭко, Россия) и оставляли на ночь в среде для культивирования [16].

MMCK пупочного канатика человека для заселения носителей

Первичную культуру клеток выделяли ферментативным способом из вартонова студня, культивировали в ростовой среде DMEM/F12 (ПанЭко, Россия) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (РАА, США) до 10%. Принадлежность клеточных культур к MMCK подтверждали, оценивая экспрессию поверхностных антигенов и возможность индуцированной дифференцировки в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях in vitro. Культивирование клеток и заселение образцов проводили при стандартных условиях: 5% CO₂, 37°C, насыщенная влажность.

Витальное мечение клеток

Непосредственно перед заселением образцов клетки метили витальным красителем РКН26 (Sigma Aldrich, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. После отмывки красителя клетки ресуспендировали в ростовой среде до конечной концентрации 1×10⁵ кл/мл.

Статичный метод заселения

Образцы (n = 3 для каждого типа) помещали в лунки 24-луночного планшета и наслаивали сверху 2 мл клеточной суспензии. Через 24 ч. заселенные образцы переносили в новые лунки планшета и инкубировали еще 48 ч.

Динамический метод заселения

Образцы (n = 3 для каждого типа) переносили в пробирки-биореакторы (SPL Biosciences, Южная Корея), содержащие 5 мл клеточной суспензии. Пробирки помещали на орбитальный шейкер (BioSan, Латвия), находящийся в СО₂-инкубаторе, и при 75 об/мин. инкубировали 24 ч. Далее заселенные образцы переносили в лунки 24-луночного планшета и инкубировали еще 48 ч.

Метод заселения с использованием капиллярного эффекта

Образцы (n = 3 для каждого типа) помещали на стопку стерильной фильтровальной бумаги толщиной 5 мм. Суспензию клеток (общий объем 2 мл) по каплям наносили в центр образца, выдерживая 4–5 с после каждой капли, чтобы среда могла пройти через образец и впитаться в фильтровальную бумагу. Образцы помещали в лунки 24-луночного планшета, наслаивали 2 мл культуральной среды. Через 24 ч. заселенные образцы переносили в новые лунки 24-луночного планшета и культивировали еще 48 ч.

Флуоресцентная микроскопия

Прижизненную съемку поверхности заселенных образцов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000 В и программного обеспечения LAS AF v.3.1.0 build 8587 (Leica Microsystems, Германия). Для визуализации метки РКН26 использовали систему фильтров «S-Orange» (возбуждающий фильтр — 546/12 нм, пропускающий — 585/40 нм).

Для исследования распределения клеток в толще материала образцы переносили в среду для заключения Tissue-Tek[®] ОСТ Compound (Sakura Finetek, США) и замораживали при -70°С. Поперечные криосрезы толщиной 7 мкм изготавливали с помощью криотома Leica CM1900 (Leica, Германия), используя стекла SuperFost (Menzel, Германия). Для визуализации клеток в образце использовали совмещенные изображения флуоресцентной и темнопольной микроскопии. Определяли общее количество клеток на поперечном криосрезе в поле зрения (ув. ×200) и долю клеток в каждом из трех равных по толщине участков носителя (центральная область, верхняя и нижняя области, определяемые по положению носителя во время 48-ч. инкубации).

Сканирующая электронная микроскопия

Для изучения распределения клеток на поверхности носителей образцы фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом (Sigma-Aldrich, США) в течение 24 ч. Фиксатор отмывали фосфатно-солевым буфером в течение 30 мин. Далее образцы инкубировали в 1% растворе осмия (Sigma-Aldrich, США) в течение 60 мин., не связавшийся осмий отмывали дистиллированной водой. Образцы обезвоживали в восходящих спиртах. После высушивания на воздухе в течение 24 ч. образцы покрывали слоем золота с помощью вакуумной напылительной установки (Eiko, Япония). Затем образцы приклеивали к столику электропроводящим серебряным клеем Dotite (Fujikura Kasei, Япония) и исследовали с помощью СЭМ S-500 (Hitachi, Япония).

МТТ-тест

Количество живых клеток в заселенных образцах оценивали с помощью колориметрического МТТтеста. МТТ (Sigma-Aldrich, США) добавляли в лунки с образцами до конечной концентрации 1 мг/мл и инкубировали 3 ч. при 37°С.

На этапе образования кристаллов формазана проводили макросъемку заселенных образцов для оценки равномерности распределения клеток. Макрофотографии обрабатывали в программе Adobe Photoshop CS5: переводили в режим «Градации серого» и определяли среднее значение серого (в соответствии со шкалой серого цвета, имеющей 256 градаций) в 16 непересекающихся областях радиусом 450 мкм, лежащих по каждой из диагоналей образца.

После удаления среды с МТТ в лунки вносили 500 мкл ДМСО (Sigma-Aldrich, США), встряхивали на шейкере 15 мин. при 150 об/мин. и измеряли оптическую плотность ($\lambda = 570$ нм, нормирование при $\lambda = 650$ нм) с помощью спектрофотометра Multiskan GO (ThermoFisher Scientific, США).

Статистический анализ

Для множественных сравнений в случае нормального распределения данных использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA), при отличном от нормального распределении данных использовали ранговый дисперсионный анализ (ANOVA on ranks). Различия считали достоверными при 5% уровне значимости. Данные были проанализированы с помощью программы Sigma Stat 3.5 (Systat Software, США).

Результаты исследования

Характеристика культур

Выделенные из пупочного канатика человека клеточные культуры представляли собой ММСК — они были способны к клоногенному росту на необработанном пластике, экспрессировали CD73, CD90, CD105, не экспрессировали CD45, CD34, CD11b, CD19 и HLA-DR, были способны к направленной дифференцировке в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлениях [31].

Характеристика носителей

Внешний вид образцов до заселения представлен на рис. 1А. Структурные и механические характеристики исследованных образцов представлены в табл. 2.

Заселение образца 1

Статичный метод заселения и метод с использованием капиллярного эффекта позволили получить равномерное покрытие поверхности образца 1, клетки были хаотично ориентированы в пространстве, распластываясь на нескольких волокнах одновременно. Динамический метод приводил к неравномерному заселению образца: плотные скопления клеток располагались случайным образом, чередуясь с практически незаселенными участками (рис. 1Б и 2А).

Исследование криосрезов показало, что метод заселения с использованием капиллярного эффекта был наиболее продуктивным (рис. 2Б и 2В), однако только динамический метод приводил к равномерному распределению клеток по толщине (рис. 2Г).

График распределения интенсивности образования формазана, представленный на рис. 2Д, подтвердил, что наименее равномерным заселение было при использовании динамического метода: общая амплитуда колебаний значений серого достигала 80 единиц, амплитуда между двумя соседними точками — 65 единиц.

МТТ-тест показал, что эффективность статического метода заселения была значимо ниже, чем динамического, а динамического — значимо ниже, чем метода с использованием капиллярного эффекта (рис. 2E).

Заселение образца 2

Все три метода заселения позволили получить равномерное покрытие поверхности образца 2. Как и при заселении образца 1, клетки были хаотично ориентированы в пространстве (рис. 1Б и ЗА).

При исследовании криосрезов было обнаружено, что статичный метод заселения оказался наименее эффективным (рис. ЗБ и ЗВ), кроме того, около 80% клеток располагалось в верхней трети образца (рис. ЗГ). Другие два метода заселения приводили к равномерному распределению клеток по толщине носителя (рис. ЗГ), но метод с использованием капиллярного эффекта был более продуктивен (рис. ЗБ и ЗВ).

График распределения интенсивности образования формазана, представленный на рис. ЗД, подтвердил равномерность заселения образца З. При этом наибольшую амплитуду значений серого, как и при заселении образца 1, показал динамический метод: общая разница между минимальным и максимальным значениями серого достигала 60 единиц, между двумя соседними точками — превышала 30 единиц.

МТТ-тест обнаружил, что продуктивность метода заселения с использованием капиллярного эффекта была значимо выше по сравнению с динамическим и статичным методами (рис. ЗЕ).

Заселение образца З

При заселении образца 3 скопления клеток отсутствовали, сами клетки в основном были ориентированы вдоль крупных волокон, однако при использовании капиллярного метода на поверхности располагались лишь единичные клетки (рис. 1Б и 4А). Количество клеток в поле зрения на поперечных криосрезах было значимо меньше при заселении образца методом с использованием капиллярного эффекта (рис. 4Б и 4В). Динамический метод заселения оказался наиболее эффективным при сохранении равномерного распределения клеток по толщине (рис. 4В и 4Г).

Колебания интенсивности окрашивания статичного и динамического методов не отличались (рис. 4Д). Метод с использованием капиллярного эффекта давал очень слабое окрашивание (рис. 4Д).

МТТ-тест показал, что продуктивность метода заселения с использованием капиллярного эффекта была значимо ниже, чем статического метода заселения, а статического — значимо ниже, чем динамического (рис. 4E).



Рис. 1. Микроструктура образцов на основе ПКЛ, изготовленных методом электроформования: А – образцы до заселения клетками; Б – образцы после заселения клетками при использовании статичного метода заселения. Сканирующая электронная микроскопия

Таблица 2. Структурные и механические характеристики нетканых материалов на основе ПКЛ

№ образца	Толщина материала, мкм	Пористость, %	Диаметр волокна, мкм (сред.±ст.откл.)	Диаметр тах поры, мкм	Прочность при t = 37°С, МПа (сред.±ст.откл.)
1	160	87	3,3±1,1	24	10,7±0,9
2	540	87	6,1±0,7	29	6,9±0,2
3	770	90	20,6±3,5	80	6,1±1,5



В — оценка количества клеток в поле зрения на поперечных криосрезах; данные представлены в виде минимального значения, 25-го перцентиля, медианы, 75-го перцентиля и максимального значения (**p*<0,05);

Г — оценка распределения клеток по толщине образца; данные представлены в виде средних и стандартного отклонения; Д — оценка интенсивности окрашивания образцов после формирования клетками кристаллов формазана; Е — результаты МТТ-теста; данные представлены в виде минимального значения, 25-го перцентиля, медианы, 75-го перцентиля и максимального значения (*p<0,05). Масштабный отрезок А, Б — 200 мкм



формирования клетками кристаллов формазана; Е – результаты МТТ-теста; данные представлены в виде минимального значения, 25-го перцентиля, медианы, 75-го перцентиля и максимального значения (*p<0,05). Масштабный отрезок А, Б – 200 мкм



Рис. 4. Результаты заселения образца 3:

A570

0,5

А – вид сверху; флуоресцентная микроскопия;

Б – поперечное сечение образцов; совмещение темнопольной и флуоресцентной микроскопии;

В – оценка количества клеток в поле зрения на поперечных криосрезах; данные представлены в виде минимального значения, 25-го перцентиля, медианы, 75-го перцентиля и максимального значения (*p<0,05);

Г — оценка распределения клеток по толщине образца; данные представлены в виде средних и стандартного отклонения; Д — оценка интенсивности окрашивания образцов после формирования клетками кристаллов формазана; Е — результаты МТТ-теста; данные представлены в виде минимального значения, 25-го перцентиля, медианы, 75-го перцентиля и максимального значения (*p<0,05). Масштабный отрезок А, Б — 200 мкм

Обсуждение

Поиск «идеального материала» для герниопластики идет уже не одно десятилетие [2]. Еще в 1959 г. были выдвинуты основные требования к такому материалу: неметаллический, синтетический, неабсорбирующий, устойчивый к инфицированию [32]. В настоящее время список требований к «идеальному материалу» значительно расширен, и одно из наиболее значимых — соответствие биомеханических свойств материала замещаемой ткани [2, 3].

Опубликовано множество работ, в которых определены характеристики (механическая прочность, толщина, пористость) наиболее распространенных в хирургической практике материалов. Механическая прочность большинства синтетических эндопротезов колеблется в пределах 0,25-4,29 МПа [2, 33], у натуральных протезов этот показатель. по данным некоторых исследователей, достигает 15,7 МПа (дермальный аллографт) [34] и даже 22,4 МПа (субмукоза) [35]. При этом следует учитывать, что после трансплантации механическая прочность децеллюляризированной ткани резко падает до 0,4 МПа [34], что все же превышает соответствующее значение для нативных тканей, которое составляет 0,1-0,2 МПа [33]. Таким образом, механическая прочность даже наиболее тонкого из полученных нами образцов на основе ПКЛ (6,1 МПа) достаточно высока для выполнения армирующей функции при проведении пластики стенок брюшной полости.

Толщина полученных образцов нетканых материалов варьировала от 160 до 770 мкм, при этом используемая технология позволяет создавать носители толщиной до 1,5–2,0 мм с сохранением заданной структуры. Для сравнения: толщина 4-слойной субмукозы свиней равна 220 мкм [35], толщина дермальных графтов может превышать 1,8 мм [36], а диаметр нитей для изготовления сетчатых синтетических протезов колеблется в пределах 153–313 мкм [2].

Еще одной важной характеристикой протезов является диаметр пор, который у исследованных образцов 1 и 2 составил 24 и 29 мкм соответственно. Схожие значения имеют натуральные материалы для протезирования: диаметр пор тканевого матрикса, полученного из подслизистой оболочки тонкой кишки, также колеблется в пределах 20—30 мкм [35]. Однако некоторые исследователи считают, что диаметр пор должен составлять не менее 75 мкм, чтобы обеспечить инфильтрацию и васкуляризацию протеза [37], поэтому в наше исследование также был включен образец 3 с диаметром пор 80 мкм.

При оценке возможности заселения полученных вариантов нетканых носителей ММСК пупочного канатика мы сравнили три метода соединения компонентов тканеинженерной конструкции: статичный и динамический, которые являются наиболее распространенными в тканевой инженерии [38], а также метод с использованием капиллярного эффекта.

Как видно из рис. 2–4, статичный метод заселения позволил получить носители, поверхность которых была равномерно покрыта клетками. Однако даже у образца 3, который обладал более крупными порами, лишь около 35% клеток проникали глубже верхней трети матрикса в течение 72 ч. культивирования, а у образцов 1 и 2 доля таких клеток составила всего 20%. Таким образом, данный метод не позволяет заселять внутреннюю часть нетканых ПКЛ носителей, но может быть использован при необходимости создания асимметричной поверхности (например, заселения эпителиальными клетками или кератиноцитами только одной стороны тканеинженерной конструкции).

Динамический метод заселения не подходит для тонких материалов (образец 1): при вращении в биореакторе образцы не сохраняли форму, а клетки на их поверхности распределялись крайне неравномерно. При этом для более толстых носителей 2 и 3, независимо от диаметра пор, динамический метод заселения показал хорошие результаты: равномерное распределение ММСК как по поверхности, так и по толщине носителя. Сходный с использованным нами протокол динамического способа заселения (в англоязычной литературе его обычно называют «agitated method» или «agitation») был признан наиболее эффективным из 4 опробованных методов при заселении субмукозы свиней толщиной около 300 мкм для тканевой инженерии уретры [39].

Третий опробованный нами метод (оригинальное название «method with a filter paper») был изначально разработан для заселения пористых матриксов на основе полилактогликолида толщиной до 2 мм и диаметром пор от 11 до 320 мкм [40]. Данный метод достаточно прост в использовании и показал высокую эффективность для нетканых носителей 1 и 2 с диаметром пор до 30 мкм. Описанный метод неожиданно оказался крайне неэффективным при заселении образца 3 с диаметром пор около 80 мкм; по-видимому, суспензия клеток просто проходила образец насквозь, не задерживаясь в его толще.

Таким образом, методом электроформования нами получены З варианта биорезорбируемых нетканых материалов на основе поликапролактона, которые обладают подходящими для выполнения пластики брюшной полости тела биомеханическими свойствами, имеют сходное с матриксом замещаемой ткани строение при отсутствии недостатков алло- и ксенотрансплантатов. Данные материалы обладают высокой биосовместимостью и могут быть использованы в качестве матрикса-носителя для тканевой инженерии. При этом выбор наиболее эффективного метода заселения носителей клетками зависит от его пространственных характеристик толщины материала и диаметра пор, которые, в свою очередь, определяются условиями электроформования материала.

Благодарности

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №16-15-00281).

4. Romao R.L., Nasr A., Chiu P.P. et al. What is the best prosthetic material for patch repair of congenital diaphragmatic hernia? Comparison and meta-analysis of porcine small intestinal submucosa and polytetrafluoroethylene. J. Pediatr. Surg. 2012; 47(8): 1496-500.

ЛИТЕРАТУРА:

^{1.} Basile F., Biondi A., Donati M. Surgical approach to abdominal wall defects: history and new trends. Int. J. Surg. 2013; 11 Suppl 1: S20-3.

^{2.} Bilsel Y., Abci I. The search for ideal hernia repair; mesh materials and types. Int. J. Surg. 2012; 10(6): 317-21.

Lukasiewicz A., Drewa T. Synthetic implants in hernia surgery. Adv. Clin. Exp. Med. 2014; 23(1): 135-42.

^{5.} Kissane N.A., Itani K.M. A decade of ventral incisional hernia repairs with biologic acellular dermal matrix: what have we learned? Plast. Reconstr. Surg. 2012; 130(5 Suppl 2): 194S-202S.

 Patel K.M., Bhanot P. Complications of acellular dermal matrices in abdominal wall reconstruction. Plast. Reconstr. Surg. 2012; 130(5 Suppl 2): 216S-24S.

7. Ferzoco S.J. A systematic review of outcomes following repair of complex ventral incisional hernias with biologic mesh. Int. Surg. 2013; 98(4): 399-408.

 $8.\ Rim$ N.G., Shin C.S., Shin H. Current approaches to electrospun nanofibers for tissue engineering. Biomed. Mater. 2013; 8(1): 014102.

9. Ebersole G.C., Buettmann E.G., MacEwan M.R. et al. Development of novel electrospun absorbable polycaprolactone (PCL) scaffolds for hernia repair applications. Surg. Endosc. 2012; 26(10): 2717-28.

 Woodruff M.A., Hutmacher D.W. The return of a forgotten polymer—polycaprolactone in the 21st century. Prog. Polym. Sci. 2010; 35: 1217-56.

11. Brugmans M.M., Soekhradj-Soechit R.S., van Geemen D. et al. Superior tissue evolution in slow-degrading scaffolds for valvular tissue engineering. Tissue Eng. Part A 2016; 22(1-2): 123-32.

12. Севастьянова В.В., Елгудин Я.А., Глушкова Т.В. и др. Использование протезов из поликапролактона для сосудов малого диаметра. Ангиология и сосудистая хирургия 2015; 21(1): 44-53.

13. Попова И.В., Степанова А.О., Сергеевичев Д.С. и др. Сравнительное исследование трех типов протезов, изготовленных методом электроспиннинга в эксперименте in vitro и in vivo. Патология кровообращения и кардиохирургия 2015; 19(4): 63-71.

14. Xu T., Miszuk J.M., Zhao Y. et al. Electrospun polycaprolactone 3D nanofibrous scaffold with interconnected and hierarchically structured pores for bone tissue engineering. Adv. Health. Mater. 2015; 4(15): 2238-46.

15. Ghanavati Z., Neisi N., Bayati V. et al. The influence of substrate topography and biomaterial substance on skin wound healing. Anat. Cell Biol. 2015; 48(4): 251-7.

16. Farrugia B.L., Brown T.D., Upton Z. et al. Dermal fibroblast infiltration of poly(ϵ -caprolactone) scaffolds fabricated by melt electrospinning in a direct writing mode. Biofabrication 2013; 5(2): 025001.

17. Ousema P.H., Moutos F.T., Estes B.T. et al. The inhibition by interleukin 1 of MSC chondrogenesis and the development of biomechanical properties in biomimetic 3D woven PCL scaffolds. Biomaterials 2012; 33(35): 8967-74.

18. Ghanavati Z., Orazizadeh M., Bayati V. et al. Characterization of a three-dimensional organotypic co-culture skin model for epidermal differentiation of rat adipose-derived stem cells. Cell J. 2016 Fall; 18(3): 289-301.

19. Bahrami H., Keshel S.H., Chari A.J. et al. Human unrestricted somatic stem cells loaded in nanofibrous PCL scaffold and their healing effect on skin defects. Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. 2016; 44(6): 1556-60.

20. lyyanki T.S., Dunne L.W., Zhang Q. et al. Adipose-derived stemcell-seeded non-cross-linked porcine acellular dermal matrix increases cellular infiltration, vascular infiltration, and mechanical strength of ventral hernia repairs. Tissue Eng. Part A 2015; 21(3-4): 475-85.

21. Majumder A., Gao Y., Sadava E.E. et al. Cell-coating affects tissue integration of synthetic and biologic meshes: comparative analysis of the onlay and underlay mesh positioning in rats. Surg. Endosc. 2016; 30(10): 4445-53.

22. Hanson S., D'Souza R.N., Hematti P. Biomaterial-mesenchymal stem cell constructs for immunomodulation in composite tissue engineering. Tissue Eng. Part A 2014; 20(15-16): 2162-8.

23. Gao Y., Krpata D.M., Criss C.N. et al. Effects of mesenchymal stem cell and fibroblast coating on immunogenic potential of prosthetic meshes in vitro. Surg. Endosc. 2014; 28(8): 2357-67.

24. Mattar P., Bieback K. Comparing the immunomodulatory properties of bone marrow, adipose tissue, and birth-associated tissue mesenchymal stromal cells. Front. Immunol. 2015; 6: 560.

25. El Omar R., Beroud J., Stoltz J.F. et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? Tissue Eng. Part B Rev. 2014; 20(5): 523-44.

26. Nagamura-Inoue T., He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. World J. Stem Cells 2014; 6(2): 195-202.

27. Lanza R., Langer R., Vacanti J.P., editors. Principles of tissue engineering, 4th ed. London: Elsevier Inc.; 2014.

28. Baker S.R., Banerjee S., Bonin K. et al. Determining the mechanical properties of electrospun poly- ε -caprolactone (PCL) nanofibers using AFM and a novel fiber anchoring technique. Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 2016; 59: 203-12.

29. Сытина Е.В., Тенчурин Т.Х., Рудяк С.Г. и др. Сравнительная оценка биосовместимости полимерных матриксов, полученных путем электроформования, и их использование для создания объемных дермальных эквивалентов. Молекулярная медицина 2014; 6: 38-47. 30. Малкин А.Я., Аскадский А.А., Коврига В.В. Методы измере-

ния механических свойств полимеров. М.: Химия; 1978.

31. Арутюнян И.В., Макаров А.В., Ельчанинов А.В. и др. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки пупочного канатика: биологические свойства и клиническое применение. Гены и клетки 2015; 10(2): 30-8.

32. Koontz A.R., Kimberly R.C. Further experimental work on prostheses for hernia repair. Surg. Gynecol. Obstet. 1959; 109: 321.

33. Hernández-Gascón B., Peña E., Melero H. et al. Mechanical behaviour of synthetic surgical meshes: finite element simulation of the herniated abdominal wall. Acta Biomater. 2011; 7(11): 3905-13.

34. Ngo M.D., Aberman H.M., Hawes M.L. et al. Evaluation of human acellular dermis versus porcine acellular dermis in an in vivo model for incisional hernia repair. Cell Tissue Bank 2011; 12(2): 135-45.

35. Shi L., Ronfard V. Biochemical and biomechanical characterization of porcine small intestinal submucosa (SIS): a mini review. Int. J. Burns Trauma 2013; 3(4): 173-9.

36. Misra S., Raj P.K., Tarr S.M. et al. Results of AlloDerm use in abdominal hernia repair. Hernia 2008; 12(3): 247-50.

37. Brown C.N., Finch J.G. Which mesh for hernia repair? Ann. R. Coll. Surg. Engl. 2010; 92(4): 272-8.

 Насрединов А.С., Лаврешин А.В. Тканевая инженерия кровеносных сосудов: способы совмещения клеток и носителя. Гены и клетки 2014; 1: 23-34.

39. Lv X.G., Feng C., Fu Q. et al. Comparative study of different seeding methods based on a multilayer SIS scaffold: Which is the optimal procedure for urethral tissue engineering? J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 2016; 104(6): 1098-108.

40. Yamanaka K., Yamamoto K., Sakai Y. et al. Seeding of mesenchymal stem cells into inner part of interconnected porous biodegradable scaffold by a new method with a filter paper. Dent. Mater. J. 2015; 34(1): 78-85.

Поступила: 27.07.2016