

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННЫХ НЕТКАНЫХ МАТЕРИАЛОВ ИЗ ПОЛИЛАКТИДА, ОБОГАЩЕННОГО КОЛЛАГЕНОМ, ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДИАФРАГМЫ

DOI: 10.17691/stm2019.11.2.05

УДК 616.26–089:615.46

Поступила 20.06.2018 г.



**Е.В. Куевда**, к.м.н., научный сотрудник лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины<sup>1</sup>;

**Е.А. Губарева**, к.м.н., зав. лабораторией фундаментальных исследований в области регенеративной медицины<sup>1</sup>;

**Т.Е. Григорьев**, к.ф.-м.н., начальник отдела нанобиоматериалов и структур Курчатовского комплекса НБИКС-технологий<sup>2</sup>;

**С.В. Крашенинников**, научный сотрудник лаборатории полимерных материалов Курчатовского комплекса НБИКС-технологий<sup>2</sup>;

**А.А. Веревкин**, аспирант лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины<sup>1</sup>;

**К.И. Луканина**, к.техн.н., сотрудник отдела нанобиоматериалов и структур Курчатовского комплекса НБИКС-технологий<sup>2</sup>;

**Д.П. Пузанов**, к.м.н., сотрудник лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины<sup>1</sup>;

**И.Х. Егиев**, ординатор лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины<sup>1</sup>;

**А.Л. Васильев**, к.ф.-м.н., зав. лабораторией Курчатовского комплекса НБИКС-технологий<sup>2</sup>;

**С.Н. Чвалун**, д.х.н., зам. директора по научной работе Курчатовского комплекса НБИКС-технологий<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кубанский государственный медицинский университет, ул. им. М. Седина, 4, Краснодар, 350063;

<sup>2</sup>Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», пл. Академика Курчатова, 1, Москва, 123182

**Цель исследования** — изучить биосовместимость и биомеханические свойства рециеллюляризованных нетканых материалов на основе полилактида с добавлением коллагена в условиях *in vitro* и *in vivo* и оценить потенциальные возможности их использования для замещения дефектов диафрагмы в эксперименте на мелких лабораторных животных.

**Материалы и методы.** Нетканые материалы получали путем электроформования полилактида в герметичном коробе с последующим вакуумированием образцов. 9% водный раствор полилактида готовили в смеси растворителей: химически чистого хлороформа с 10% добавкой химически чистого этилового спирта. Микроволоконный материал обогащали коллагеном в весовой концентрации 0,1 и 0,5% с последующей заморозкой при  $-40^{\circ}\text{C}$  или в жидком азоте. Структуру нетканых полилактидных матриц оценивали с помощью сканирующей электронной микроскопии, а механические свойства — при проведении циклических испытаний для исследования прочностных и усталостных характеристик на разрывной машине. Полученные нетканые матрицы рециеллюляризовали мезенхимальными стромальными клетками в статических условиях. Качество полученных тканеинженерных конструкций оценивали морфологически при проведении рутинных гистологических исследований. Жизнеспособность клеток на

**Для контактов:** Куевда Елена Вячеславовна, e-mail: elenakuevda@yandex.ru

каркасах и цитотоксические свойства матриц определяли путем проведения ХТТ-тестов. Наименее токсичные образцы использовали для ортотопической имплантации крысам с последующим проведением морфологических исследований.

**Результаты.** Морфологический анализ и изучение жизнеспособности клеток на каркасах у образцов, подвергавшихся при формировании замораживанию в жидком азоте, выявили нецелесообразность их использования для проведения ортотопической трансплантации. Образцы, подвергавшиеся замораживанию в холодильной установке, продемонстрировали допустимые уровни цитотоксичности и были имплантированы. Морфологическое исследование после эксплантации указанных групп образцов не выявило значительного повреждения структуры и воспалительных изменений, однако имелись признаки выраженного спаечного процесса в области имплантации.

**Заключение.** Несмотря на способность нетканых матриц усиливать фибринообразование, отсутствие цитотоксических свойств и выраженных реакций отторжения трансплантата позволяет считать нетканые полилактидные матрицы, подвергавшиеся при формировании замораживанию в холодильной установке при  $-40^{\circ}\text{C}$ , перспективными для создания тканеинженерных конструкций диафрагмы.

**Ключевые слова:** тканевая инженерия; нетканый материал; диафрагма; полилактидные нетканые матрицы; трансплантация; мезенхимальные стромальные клетки.

**Как цитировать:** Kuevda E.V., Gubareva E.A., Grigoriev T.E., Krashennnikov S.V., Verevkin A.A., Lukanina K.I., Puzanov D.P., Yegiyev I.Kh., Vasiliev A.L., Chvalun S.N. Application of recellularized non-woven materials from collagen-enriched polylactide for creation of tissue-engineered diaphragm constructs. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2019; 11(2): 35–43, <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.2.05>

**English**

## **Application of Recellularized Non-Woven Materials from Collagen-Enriched Polylactide for Creation of Tissue-Engineered Diaphragm Constructs**

**E.V. Kuevda**, PhD, Researcher, Laboratory of Fundamental Research in the Field of Regenerative Medicine<sup>1</sup>;  
**E.A. Gubareva**, PhD, Head of the Laboratory of Fundamental Research in the Field of Regenerative Medicine<sup>1</sup>;  
**T.E. Grigoriev**, PhD, Head of the Department of Nanobiomaterials and Structures, Kurchatov Complex of NBICS-Technologies<sup>2</sup>;  
**S.V. Krashennnikov**, Researcher, Laboratory of Polymer Materials, Kurchatov Complex of NBICS-Technologies<sup>2</sup>;  
**A.A. Verevkin**, PhD Student, Laboratory of Fundamental Research in the Field of Regenerative Medicine<sup>1</sup>;  
**K.I. Lukanina**, PhD, Researcher, Department of Nanobiomaterials and Structures, Kurchatov Complex of NBICS-Technologies<sup>2</sup>;  
**D.P. Puzanov**, MD, PhD, Researcher, Laboratory of Fundamental Research in the Field of Regenerative Medicine<sup>1</sup>;  
**I.Kh. Yegiyev**, Medical Resident, Laboratory of Fundamental Research in the Field of Regenerative Medicine<sup>1</sup>;  
**A.L. Vasiliev**, PhD, Head of the Laboratory, Kurchatov Complex of NBICS-Technologies<sup>2</sup>;  
**S.N. Chvalun**, DSc, Deputy Director for Scientific Work, Kurchatov Complex of NBICS-Technologies<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kuban State Medical University, 4 M. Sedin St., Krasnodar, 350063, Russia;

<sup>2</sup>National Research Center "Kurchatov Institute", 1 Akademika Kurchatova Square, Moscow, 123182, Russia

**The aim of the investigation** was to study biocompatibility and biomechanical properties of recellularized non-woven materials based on collagen-filled polylactide under *in vitro* and *in vivo* conditions and to assess the potential of their use for diaphragm defect replacement in the experiment on small laboratory animals.

**Materials and Methods.** Non-woven materials were obtained by electroforming of polylactide in a tight box with subsequent specimen vacuumization. 9% aqueous solution of polylactide was prepared in the solvent mixture: chemically pure chloroform with 10% addition of chemically pure ethanol. The microfibrillar material was enriched with collagen in a weight concentration of 0.1 and 0.5% with subsequent freezing at  $-40^{\circ}$  or in liquid nitrogen. The structure of non-woven polylactide matrices was assessed by a scanning electron microscopy while mechanical properties were evaluated during cyclic tests for strength and fatigue properties using tensile-testing machine. The fabricated non-woven matrices were recellularized by mesenchymal stromal cells under static conditions. The quality of the fabricated tissue-engineered constructs was evaluated morphologically by routine histological investigations. The viability of the cells on the matrices and the cytotoxic properties of the matrices were determined using ХТТ tests. The least toxic specimens were orthotopically implanted into the rats with subsequent morphological examinations.

**Results.** The morphological analysis and viability study of the cells on the matrices of those specimens which underwent freezing in liquid nitrogen during forming were found to be inexpedient for orthotopic transplantation. The specimens frozen in the refrigeration unit demonstrated permissible cytotoxicity levels and were implanted. The morphological examination after explantation of the given specimen groups did not reveal significant damage to the structure and inflammatory changes though the signs of the marked adhesive process in the implantation area were evident.

**Conclusion.** In spite of the ability of the non-woven matrices to stimulate fibrinogenesis, absence of cytotoxic properties and evident reactions of transplant rejection allow the non-woven polylactide matrices undergone freezing in the refrigeration unit at  $-40^{\circ}$  during the forming process to be considered promising for creation of tissue-engineered constructs of a diaphragm.

**Key words:** tissue engineering; non-woven material; diaphragm; polylactide non-woven matrices; transplantation; mesenchymal stromal cells.

## Введение

Врожденные и приобретенные мальформации различных органов, в том числе диафрагмы, остаются серьезной проблемой, при которой летальность сохраняется на весьма высоком уровне [1]. Несмотря на расширившийся в последнее время арсенал терапевтических и хирургических методов лечения, наиболее серьезные случаи по-прежнему заканчиваются летально. Регенеративная медицина предлагает новые методы решения проблемы лечения врожденных и приобретенных патологий путем создания тканеинженерных конструкций (ТИК) на основе биологических и/или синтетических матриц и клеточного компонента [2]. Например, на настоящий момент существуют различные открытые и малоинвазивные способы пластического закрытия дефектов, в том числе диафрагмы [3].

Большинство пластических операций выполняются с использованием синтетических материалов, изготовленных на основе политетрафторэтилена, полиэтилена и полипропилена (AlloDerm, Gore-Tex, Marlex), не обладающих биорезорбируемостью, что способствует рецидивированию патологического процесса [1, 4]. Нетканые биодеградируемые материалы на основе поликапролактона многими авторами считаются наиболее перспективными для замещения дефектов кожи, костной ткани, сосудов малого диаметра, диафрагмы [5–8]. В то же время полилактид, являясь недорогим материалом, обладает необходимой прочностью (большей, чем у политетрафторэтилена), биосовместимостью, способностью к биодеградации без образования токсических метаболитов, что весьма перспективно для создания имплантатов и нетканых материалов для нужд регенеративной медицины. К сожалению, изучению биосовместимости ТИК, изготовленных на основе полилактида, уделяется меньшее внимание, чем матрицам на основе поликапролактона [9].

Имеются данные об успешном использовании комбинированных синтетических нетканых материалов с добавлением коллагена при замещении обширных (более 70%) дефектов диафрагмы в эксперименте даже без добавления клеточного компонента [8]. Однако на настоящий момент нетканые матрицы часто применяют в качестве носителей мезенхимальных стромальных клеток (МСК) при создании синтетических протезов с целью улучшения биосовместимости и снижения иммуногенности имплантируемого материала [10, 11].

Большинство проводимых исследований [8] фокусируются на изучении биомеханических и биорезорбтивных свойств нетканых материалов, выборе оптимального способа заселения имплантатов в условиях *in vitro*. При этом клеточный компонент рассматривается как дополнительный фактор, способствующий замещению протезируемого участка собственной соединительной тканью реципиента [7] без полноценного воспроизведения анатомических и физиологических свойств нативного органа. Имплантация рецеллюляризованного синтетического матрикса в организм животного с последующим изучением эффективности замещения тканевого дефекта, клеточного роста и пролиферации МСК на синтетическом каркасе как этапа создания ТИК представляется задачей весьма интересной, но малоизученной [2]. Выбор полимера — носителя клеточного компонента, а также оптимальных условий формования материала также является важной составляющей проблемы создания ТИК на основе нетканых матриц.

**Цель исследования** — изучение свойств рецеллюляризованных нетканых материалов на основе полилактида с добавлением коллагена в условиях *in vitro* и *in vivo* с оценкой возможности использования указанных материалов для замещения дефектов диафрагмы в эксперименте на мелких лабораторных животных.

## Материалы и методы

**Получение и характеристика матриц, подготовка и проведение рецеллюляризации.** Нетканые материалы на основе полилактида получали путем электроформования в герметичном коробе при комнатной температуре с последующим вакуумированием образцов при разрежении 1 мбар до полного удаления растворителя. Предварительно готовили 9% водный раствор полилактида (4032D; Nature Works, США) в смеси растворителей: химически чистого хлороформа с 10% добавкой химически чистого этилового спирта. Микроволоконный материал получали на вращающемся барабане диаметром  $12,0 \pm 0,5$  см со скоростью вращения 40 об./мин, приложенное напряжение  $15,0 \pm 1,0$  кВ. Производительность процесса составляла 5 мл/ч. Толщина полученной волоконной основы —  $0,40 \pm 0,05$  мм. Диаметр волокон варьировался от 4,5 до 5,5 мкм со средним значением 5,0 мкм. Плотность упаковки в срединной области составила 10%.

Для обогащения синтетических матриц, улучшения их адгезионных свойств и биосовместимости

использовали коллаген в весовой концентрации 0,1 и 0,5% с последующей заморозкой в холодильной установке при  $-40^{\circ}\text{C}$  или в жидком азоте. Далее образцы подвергали лиофильной сушке на установке Alpha 2–4 LSCplus (Martin Christ, Германия) в течение 24 ч. Таким образом было получено четыре группы матриксов для последующей рецеллюляризации в условиях *in vitro*. В 1-ю опытную группу вошли образцы полилактида, содержащие 0,1% коллагена и подвергавшиеся заморозке в жидком азоте; во 2-ю — образцы с тем же содержанием коллагена, но замороженные при  $-40^{\circ}\text{C}$ . 3-ю и 4-ю группы образцов составили нетканые полилактидные матриксы, содержащие 0,5% коллагена и замороженные в жидком азоте и при  $-40^{\circ}\text{C}$  соответственно. В качестве контроля использовали нетканый материал, полностью состоящий из полилактида без добавления коллагена. Структурные и механические свойства полученных нетканых материалов были изучены с помощью методов сканирующей электронной микроскопии на установке Helios NanoLab 450S (Thermo Fisher Scientific, США) и путем циклических механических испытаний для исследования прочностных и усталостных характеристик на разрывной машине Instron 5965 (ITW, США).

Перед проведением рецеллюляризации образцы подвергали стерилизации облучением ультрафиолетом в течение 30 мин, затем погружали в  $70^{\circ}$  этанол на 10 мин, трижды отмывали в растворе фосфатного буфера в течение 15 мин (Thermo Fisher Scientific, США), после чего помещали в культуральную среду DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) на 20 мин. С помощью устройства для кожной биопсии DERMO-PUNCH (SteryLab, Италия) получали образцы нетканых материалов диаметром 5 мм для проведения *in vitro* исследований жизнеспособности клеток на каркасах (матрицах) и цитотоксических свойств самих каркасов (ХТТ-тесты).

Для выполнения ортотопической трансплантации были выбраны образцы размерами  $1,5 \times 2$  см, что составляет примерно 70% левого купола диафрагмы. Статическую рецеллюляризацию этих образцов проводили в 6-луночных планшетах в течение 16 дней в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе в стандартных условиях. Суспензию клеток наносили в центральную часть образца по каплям. Для имплантации были выбраны матриксы с наименьшими проявлениями цитотоксических свойств. Эффективность рецеллюляризации оставшихся образцов оценивали при проведении морфологического исследования при окрашивании гематоксилином и эозином по стандартному протоколу.

Для экспериментов по заселению нетканых матриксов были выбраны МСК крысы костномозгового происхождения после 4-го пассажа. Клеточную принадлежность верифицировали путем иммунофенотипирования, оценки экспрессии поверхностных антигенов и по возможности направленной дифференцировки в три клеточные линии с помощью

специализированных сред StemPro (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с последующей качественной детекцией.

**Изучение жизнеспособности клеток на матриксах.** Колориметрический ХТТ-тест с последующим количественным подсчетом был выбран для оценки процента жизнеспособных клеток на матриксах и цитотоксического индекса. Рабочий раствор ХТТ-реагента готовили по методическим рекомендациям производителя (Cell proliferation assay ХТТ; AphliChem GmbH, Германия). Рецеллюляризацию опытных и контрольных образцов выполняли в 96-луночных планшетах статическим методом, добавляли 130 мкл клеточной суспензии, содержащей 20 000 клеток, в каждую лунку. Суспензию клеток наносили в центральную зону образца, добиваясь равномерного распределения по всей поверхности. Общее время инкубации составило 72 ч, после чего добавляли 100 мкл рабочего раствора ХТТ-реагента и инкубировали еще 3 ч. Измерение оптической плотности проводили на многофункциональном ридере FilterMax F5 (Molecular Devices, США) при рабочей длине волны 450 нм (референс — 620 нм). Расчет количественных показателей жизнеспособности клеток в процентах выполняли путем вычисления отношения разности значений оптической плотности в опытных ячейках и ячейках со средой к оптической плотности лунок, содержащих контрольные клетки [12].

**Имплантация и эксплантация рецеллюляризованных нетканых матриксов.** Ортотопические трансплантации ТИК диафрагмы на основе рецеллюляризованных МСК нетканых матриксов с добавлением коллагена ( $n=25$ ) выполняли 5 крысам-самцам линии Wistar со средней массой  $240 \pm 20$  г. Эксперименты на животных проводили в лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины на базе Кубанского государственного медицинского университета в полном соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (National Research Council, 2011). Протоколы исследования составлены с соблюдением Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006), и одобрены этическим комитетом Кубанского государственного медицинского университета.

Оперативные вмешательства на животных были выполнены под общей анестезией, протокол которой был разработан совместно с коллегами из Каролинского института (Стокгольм, Швеция). Он включал внутримышечное введение 5 МЕ 2% раствора Ксилазина (Intervet, Нидерланды) в сочетании с внутримышечным введением 3 МЕ Золетила 100 (Virbac, Франция) и подкожное введение 5 МЕ 0,1% раствора атропина сульфата (ООО «Опытный завод «ГНЦЛС», Украина). В соответствии с протоколом интубацию трахеи крысам выполняли полиэтиленовым катетером диаметром 2,42 мм с последующим подключением к аппарату искусственной вентиляции



ции легких для мелких животных Inspira small animal ventilator (Harvard Apparatus; США) с заданной частотой дыхания 100 в минуту. Животных фиксировали в положении лежа на спине для выполнения косой паракостальной лапаротомии слева. Около 70% левого купола диафрагмы иссекали с замещением неткаными материалами, заселенными крысиными МСК. Имплантаты фиксировали к перикостальной части диафрагмы непрерывными швами монофиламентной полипропиленовой нитью (условный размер нити — 6/0). Послойное ушивание лапаротомной раны выполняли непрерывным швом монофиламентной полипропиленовой нитью условным размером 4/0 (все нити — Prolene; Ethicon, США). Общая продолжительность оперативного вмешательства составляла 50 мин. В послеоперационном периоде в тех случаях, когда возникали нагноения послеоперационной раны, выполняли профилактику инфекционных осложнений с помощью 2,5% раствора препарата Байтрил (ВНИИЗЖ, Россия) в дозировке 0,2 мл/кг массы тела животного. Иммуносупрессивная терапия не проводилась.

Через 21 день после имплантации проводили эксплантацию нетканых рецеллюляризованных графтов после введения летальной дозы барбитуратов (150 мг/кг) интраперитонеально. Оперативный доступ осуществлялся паракостально слева, процесс эксплантации сопровождался выполнением макросъемки. Образцы отмывали от крови в стерильном растворе фосфатного буфера и помещали в 10% раствор забуференного формалина для проведения гистологических исследований.

**Статистическая обработка данных** выполнена с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v. 6.04 (источник — www.graphpad.com).

Полученные результаты представлены в виде среднего арифметического (M) и стандартного отклонения (SD). Вероятность возможной ошибки определяли по таблице t-критерия Стьюдента для парных сравнений. Для выборок, отличных от нормального распределения сравниваемых совокупностей, использован критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты**

Характеристика структуры и способов обработки нетканых образцов представлена в табл. 1, механические характеристики образцов — в табл. 2.

Использованная для рецеллюляризации нетканых матриц культура клеток демонстрировала способность к адгезии и образованию колоний при росте на культуральном пластике. Клетки имели фенотип CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, после проведения индуцированной дифференцировки позитивно окрашивались красителями Oil Red O, толуидиновым синим и ализариновым красным, что позволяет подтвердить дифференцировку в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлениях соответственно.

По данным ХТТ-теста, жизнеспособность клеток после рецеллюляризации образцов контрольной группы при статическом заселении МСК составила 59,76%, цитотоксичность — 27,23%. Среди образцов опытных групп наименьшими цитотоксическими свойствами обладали каркасы 2-й и 4-й групп, которые проходили заморозку в условиях холодильной установки. Эти же группы образцов характеризовались наиболее высокими показателями жизнеспособности клеток на матриксах (рис. 1).

Таблица 1

**Характеристика структуры и способов обработки нетканых материалов**

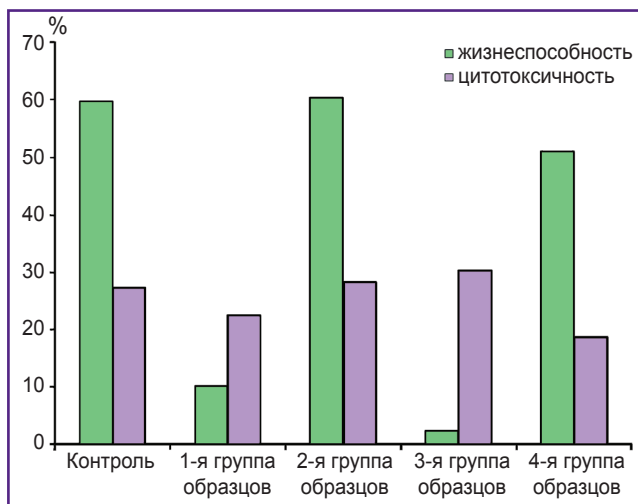
Группы образцов	Толщина волоконной основы, мм/плотность упаковки, %	Диаметр волокон, мкм	Концентрация раствора наполнителя (коллагена), %	Скорость заморозки, °С/мин	Степень наполнения образца коллагеном, %
1-я	0,40±0,05/10,0±1,0	5,0±0,5	0,1	10,0**	6,8
2-я			0,1	0,05*	4,3
3-я			0,5	10,0**	16,0
4-я			0,5	0,05*	20,7

\* — 0,05°С/мин — заморозка в условиях холодильного рефрижератора; \*\* — 10,0°С/мин — заморозка в условиях жидкого азота.

Таблица 2

**Механические характеристики образцов нетканых материалов, МПа**

Тип заморозки	0,1% коллаген		0,5% коллаген	
	Модуль Юнга	Прочность	Модуль Юнга	Прочность
0,05°С/мин	434,0±25,0	13,2±0,8	508,0±31,0	20,7±0,9
10,0°С/мин	338,0±21,0	11,3±0,7	529,0±34,0	21,8±1,1



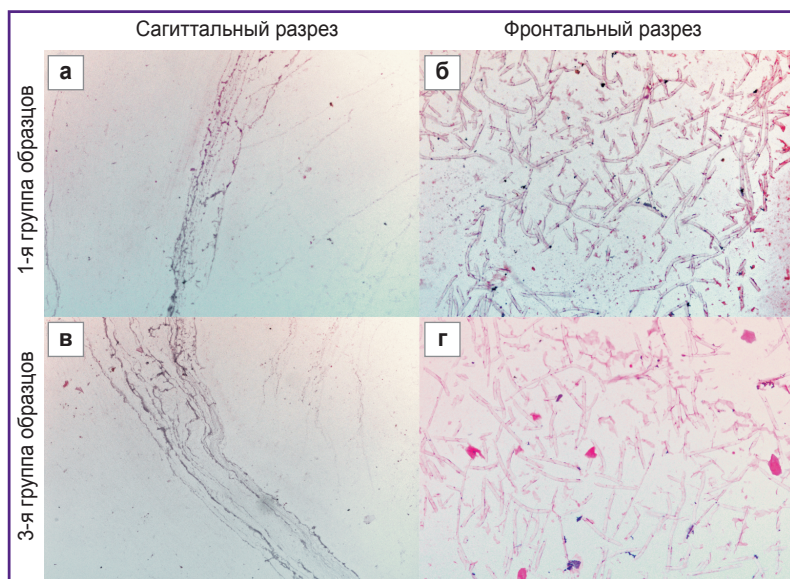
**Рис. 1.** Показатели жизнеспособности и цитотоксичности нетканого синтетического матрикса на основе полилактида, обогащенного коллагеном, при рецеллюляризации крысиными мезенхимальными стромальными клетками костномозгового происхождения

У образцов, продемонстрировавших высокие значения показателей цитотоксичности (1-я и 3-я группы), было решено исследовать гистологическую структуру для установления причин такой цитотоксичности. При окрашивании гематоксилином и эозином выявлены неоднородность структуры на фронтальных срезах, расслоение материала и перетяжки волокон на сагиттальных срезах; клетки отсутствовали (рис. 2). При проведении сканирующей электронной микроскопии нетканых матриксов образцов этих групп, выполненной до заселения МСК, отмечаются выраженные межволоконные соединения в виде мембран и перетяжек (рис. 3).

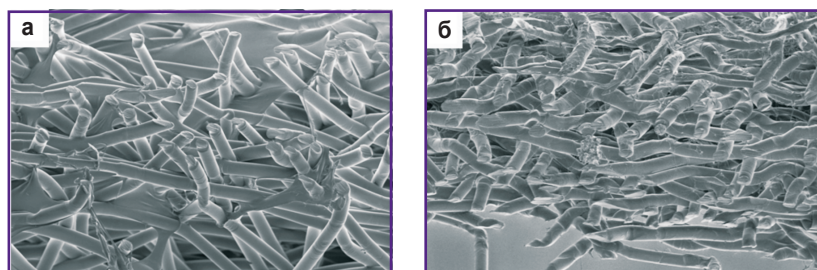
При выполнении эксплантации установлено, что тканеинженерные графты, полученные при рецеллюляризации нетканых материалов, интегрированы в окружающие ткани, при этом область имплантации выделяется на фоне нормальной ткани диафрагмы более бледным цветом. При эксплантации графтов, в большей мере поддерживающих жизнеспособность клеток, отмечена высокая степень адгезии имплантированных материалов к окружающим тканям. Так, образец 2-й группы был подпаян ко дну желудка и диафрагмальной поверхности печени, образец 4-й группы — к диафрагмальной поверхности печени, контрольный образец был тесно сращен с дном желудка (рис. 4, а, б). Иссечение левого купола диафрагмы проводили после разделения спаек тупым путем.

Морфологическое исследование эксплантированных графтов при окрашивании гематоксилином и эозином позволило оценить общую картину клеточной инфильтрации, преимущественно лейкоцитарной. В то же время признаков выраженных воспалительных изменений не обнаружено, имплантированные ТИК не были отграничены капсулой от окружающих тканей. Эксплантаты сохраняли пористую структуру, не характерную для нативной диафрагмальной ткани. Значительных морфологических отличий между образцами контрольной, 2-й и 4-й опытных групп не получено (рис. 4, в).

Морфологическое исследование эксплантированных графтов при окрашивании гематоксилином и эозином позволило оценить общую картину клеточной инфильтрации, преимущественно лейкоцитарной. В то же время признаков выраженных воспалительных изменений не обнаружено, имплантированные ТИК не были отграничены капсулой от окружающих тканей. Эксплантаты сохраняли пористую структуру, не характерную для нативной диафрагмальной ткани. Значительных морфологических отличий между образцами контрольной, 2-й и 4-й опытных групп не получено (рис. 4, в).



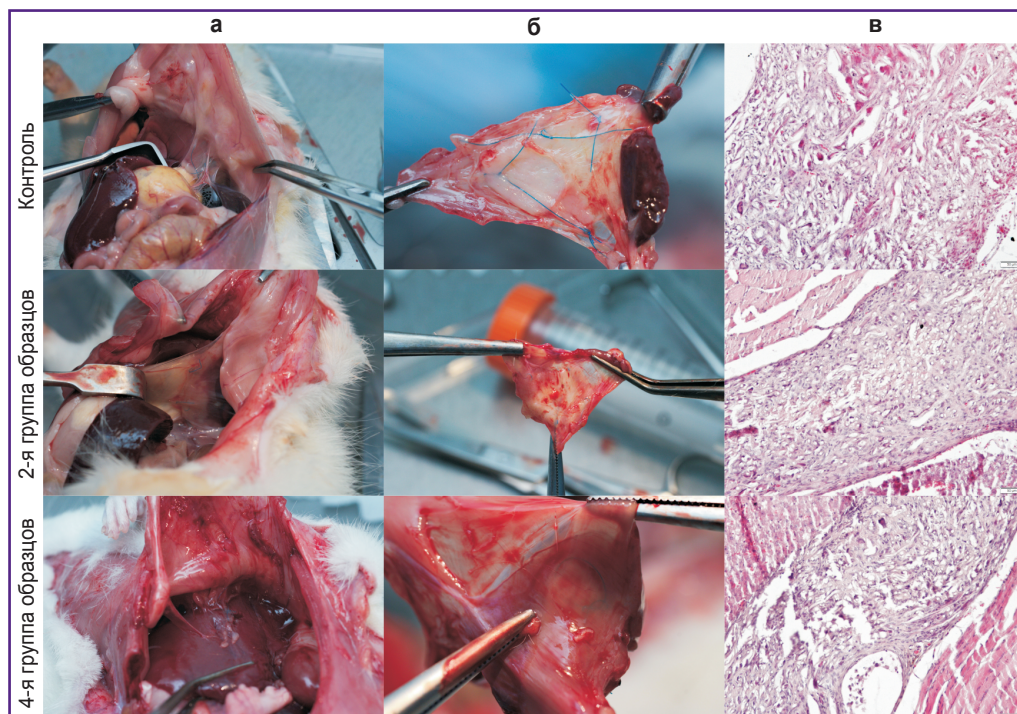
**Рис. 2.** Морфологическое исследование *in vitro* рецеллюляризованных нетканых матриксов: сагиттальный (а) и фронтальный (б) срезы 1-й группы образцов; сагиттальный (в) и фронтальный (г) срезы 3-й группы образцов; окраска гематоксилином и эозином;  $\times 100$



**Рис. 3.** Микрофотографии электронной микроскопии нетканых матриксов на основе полилактида с коллагеновым наполнением:

а — волокна, соединенные мембранами, степень наполнения — 20,7%; б — волокна, соединенные перетяжками, степень наполнения — 6,8%;  $\times 2500$





**Рис. 4. Макросъемка и гистологическое исследование рецеллюляризированных нетканых матриц после 21-го дня имплантации:**

**а** — спаечный процесс в области имплантации; **б** — имплантированный образец; **в** — морфологическое исследование эксплантированных образцов; окраска гематоксилином и эозином;  $\times 200$

## Обсуждение

Нетканые синтетические материалы, их рецеллюляризация и использование полученных графтов для протезирования дефектов нативных органов представляются весьма перспективным способом решения задачи создания полноценно функционирующих ТИК. Показано, что важным этапом получения синтетических протезов является процесс электроформования материала с подбором оптимального диаметра пор (не менее 20, но и не более 80 мкм), расчетом процента пористости материала, выбором толщины каркаса и диаметра волокон [13]. Не менее важным считают выбор метода заселения нетканого материала и потенциальные способы улучшения функциональных свойств каркасов путем дополнительной обработки (например, обогащение коллагеном) [14, 15]. Известно, что выбор метода заселения синтетических материалов обуславливается условиями их электроформования, определяющими структурные и механические свойства полученных каркасов и необходимые параметры [7, 16].

Несмотря на то, что некоторые исследователи выступают с критикой статического метода рецеллюляризации [13], мы в своей работе остановили выбор именно на нем с небольшими модификациями в способе нанесения клеточной суспензии (по каплям в центр образца с последующим распределением по поверхности). Наш выбор был обусловлен успешным

опытом применения статического метода репопуляризации диафрагмы различными клеточными линиями [3, 17]. При этом нами было решено использовать дополнительное покрытие синтетических материалов коллагеном с целью улучшения биосовместимости. В процессе эксперимента было установлено, что материалы, подвергшиеся заморозке в жидком азоте, продемонстрировали более низкую способность поддерживать рост и пролиферацию клеток вне зависимости от процентного содержания коллагена (10,08% жизнеспособных клеток для образцов 1-й группы и 2,31% — 3-й). Низкая жизнеспособность МСК на образцах 1-й и 3-й групп может быть обусловлена рельефной морфологией матрикса и наличием коллагеновых перетяжек, обусловленных быстрой скоростью заморозки в азоте [18]. Гистологическое исследование показало, что указанные образцы в должной мере не сохранили структурных особенностей матриц, и подтвердило нецелесообразность выполнения ортопических трансплантаций с использованием ТИК с таким способом изготовления.

Образцы, подвергшиеся воздействию низких температур при замораживании в холодильной установке, обладали цитотоксическими свойствами, сопоставимыми с контролем. Цитотоксический индекс образцов 2-й группы составил 28,21%, контрольной — 27,23%. Добавление 0,5% коллагена при электроформовании образцов 4-й группы способствовало снижению пока-

зателей цитотоксического индекса на 8,72% по сравнению с контрольной.

Отрицательным моментом в данном эксперименте может служить следующий факт: при эксплантации образцов контрольной, 2-й и 4-й опытных групп через 21 день после имплантации обнаружены выраженные спаечные процессы в брюшной полости с вовлечением диафрагмальной поверхности печени и дна желудка. В то же время выраженных воспалительных изменений и реакции отторжения имплантированной ТИК не отмечено.

### Заключение

Дополнительное улучшение биомеханических свойств нетканых синтетических матриц (в частности, полилактида) путем введения в их состав коллагена способно улучшить жизнеспособность клеток на каркасах при условии выбора оптимальных условий температурной обработки на этапе формирования (замораживание в холодильной установке). При этом рецеллюляризованные синтетические матрицы демонстрируют способность провоцировать развитие спаечного процесса в брюшной полости в большей степени, чем децеллюляризованные [3], при прочих равных условиях репопуляризации каркасов, выполнения оперативного вмешательства и послеоперационного ведения животных. Указанные особенности нетканых синтетических материалов диктуют необходимость поиска дополнительных способов обработки каркасов для предотвращения излишней адгезии к окружающим тканям.

**Финансирование исследования.** Работа выполнена в рамках гранта Российского научного фонда (проект №17-13-01376).

**Конфликт интересов.** Авторы не имеют конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить.

### Литература/References

1. De Coppi P., Deprest J. Regenerative medicine solutions in congenital diaphragmatic hernia, seminars in pediatric surgery. *Semin Pediatr Surg* 2017; 26(3): 171–177, <https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2017.04.009>.
2. De Coppi P. Regenerative medicine for congenital malformations. *J Pediatr Surg* 2013; 48(2): 273–280, <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2012.11.005>.
3. Gubareva E.A., Sjöqvist S., Gilevich I.V., Sotnichenko A.S., Kuevda E.V., Lim M.L., Felii N., Lemon G., Danilenko K.A., Nakokhov R.Z., Gumenyuk I.S., Grigoriev T.E., Krashennnikov S.V., Pokhotko A.G., Basov A.A., Dzhimak S.S., Gustafsson Y., Bautista G., Beltrán Rodríguez A., Pokrovsky V.M., Jungebluth P., Chvalun S.N., Holterman M.J., Taylor D.A., Macchiarini P. Orthotopic transplantation of a tissue engineered diaphragm in rats. *Biomaterials* 2016; 77: 320–335, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.11.020>.
4. Romao R.L., Nasr A., Chiu P.P., Langer J.C. 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): 1496–1500, <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2012.01.009>.

5. Łukasiewicz A., Drewa T. Synthetic implants in hernia surgery. *Adv Clin Exp Med* 2014; 23(1): 135–142, <https://doi.org/10.17219/acem/37037>.

6. Ghanavati Z., Neisi N., Bayati V., Makvandi M. The influence of substrate topography and biomaterial substance on skin wound healing. *Anat Cell Biol* 2015; 48(4): 251–257, <https://doi.org/10.5115/acb.2015.48.4.251>.

7. Арутюнян И.В., Тенчурин Т.Х., Кананыхина Е.Ю., Черников В.П., Васюкова О.А., Ельчанинов А.В., Макаров А.В., Коршунов А.А., Буров А.А., Подуровская Ю.Л., Чупрынин В.Д., Уварова Е.В., Дегтярев Д.Н., Шепелев А.Д., Мамагулашвили В.Г., Камышинский Р.А., Крашенинников С.В., Чвалун С.Н., Фатхудинов Т.Х. Нетканые материалы на основе поликапролактона для тканевой инженерии: выбор структуры и способа заселения. *Гены и клетки* 2017; 12(1): 62–71. Arutyunyan I.V., Tenchurin T.Kh., Kananykhina E.Y., Chernikov V.P., Vasyukova O.A., Elchaninov A.V., Makarov A.V., Korshunov A.A., Burov A.A., Podurovskaya Y.L., Chuprynin V.D., Uvarova E.V., Degtyarev D.N., Shepelev A.D., Mamagulashvili V.G., Kamyshinskiy R.A., Krashennnikov S.V., Chvalun S.N., Fatkhudinov T.Kh. Nonwoven polycaprolactone scaffolds for tissue engineering: the choice of the structure and the method of cell seeding. *Genes and Cells* 2017; 12(1): 62–71, <https://doi.org/10.23868/201703009>.

8. Zhao W., Ju Y.M., Christ G., Atala A., Yoo J.J., Lee S.J. Diaphragmatic muscle reconstruction with an aligned electrospun poly(ε-caprolactone)/collagen hybrid scaffold. *Biomaterials* 2013; 34(33): 8235–8240, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.057>.

9. Pawar R.P., Tekale S.U., Shisodia S.U., Totre J.T., Domb A.J. Biomedical applications of poly(lactic acid). *Recent Pat Regen Med* 2014; 4(1): 40–51, <https://doi.org/10.2174/2210296504666140402235024>.

10. 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): 2162–2168, <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0359>.

11. Baker S.R., Banerjee S., Bonin K., Guthold M. 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: 203–112, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.102>.

12. Багаева В.В., Полова В.М., Пашкова Г.С., Исаджаниян К.Е., Никитин В.В., Жиленков Е.Л. Изучение эффективности и безопасности применения антимикробных средств. *Исследования и практика в медицине* 2015; 2(3): 35–42. Bagaeva V.V., Popova V.M., Pashkova G.S., Isadzhanyan K.E., Nikitin V.V., Zhilenkov E.L. The study the efficacy and safety of antimicrobial agents. *Issledovaniya i praktika v meditsine* 2015; 2(3): 35–42, <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2015-2-3-35-42>.

13. Yamanaka K., Yamamoto K., Sakai Y., Suda Y., Shigemitsu Y., Kaneko T., Kato K., Kumagai T., Kato Y. 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, <https://doi.org/10.4012/dmj.2013-330>.



14. Lv X.G., Feng C., Fu Q., Xie H., Wang Y., Huang J.W., Xie M.K., Atala A., Xu Y.M., Zhao W.X. 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): 1098–1108, <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33460>.

15. Brouwer K.M., Daamen W.F., van Lochem N., Reijnen D., Wijnen R.M., van Kuppevelt T.H. Construction and in vivo evaluation of a dual layered collagenous scaffold with a radial pore structure for repair of the diaphragm. *Acta Biomater* 2013; 9(6): 6844–6851, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.03.003>.

16. Urita Y., Komuro H., Chen G., Shinya M., Saihara R., Kaneko M. Evaluation of diaphragmatic hernia repair using PLGA mesh-collagen sponge hybrid scaffold: an experimental study in a rat model. *Pediatr Surg Int* 2008; 24(9): 1041–1045, <https://doi.org/10.1007/s00383-008-2212-y>.

17. Conconi M.T., De Coppi P., Bellini S., Zara G.,

Sabatti M., Marzaro M., Zanon G.F., Gamba P.G., Parnigotto P.P., Nussdorfer G.G. Homologous muscle acellular matrix seeded with autologous myoblasts as a tissue-engineering approach to abdominal wall-defect repair. *Biomaterials* 2005; 26(15): 2567–2574, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.035>.

18. Романова О.А., Григорьев Т.Е., Гончаров М.Е., Рудяк С.Г., Соловьева Е.В., Крашенинников С.В., Сапрыкин В.П., Сытина Е.В., Чвалун С.Н., Пальцев М.А., Пантелеев А.А. Хитозан как модифицирующий компонент искусственного матрикса в тканевой инженерии кожи человека. *Клеточные технологии в биологии и медицине* 2015; 2: 103–113. Romanova O.A., Grigoriev T.E., Goncharov M.E., Rudyak S.G., Solov'yova E.V., Krasheninnikov S.V., Saprykin V.P., Sytina E.V., Chvalun S.N., Pal'tsev M.A., Panteleev A.A. Chitosan as a modifying component of artificial scaffold for tissue engineering of human skin. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine* 2015; 2: 103–113.