

Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на физико-химические и механические свойства полиэфирных матриц различной архитектоники

**И. В. Арутюнян, А. Г. Дунаев, Е. М. Трифанова, М. А. Хворостина,
А. В. Ельчанинов, А. Г. Соболева, Т. Х. Фатхудинов, В. К. Попов**

Изучена возможность улучшения биосовместимости полилактогликолидных (ПЛГ) матриц для тканеинженерных конструкций за счет их эффективного заселения мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК). Особенности процедуры такого заселения, в принципе, могут влиять на изменение физико-механических свойств этих матриц, во многом определяемых архитектурой последних. Подготовлены и исследованы три типа экспериментальных ПЛГ образцов: 1) монолитные блоки, изготовленные методом литьевого прессования; 2) пористые матрицы, сформированные методом сверхкритической флюидной пластификации с последующим вспениванием; 3) волокнистые нетканые матрицы, изготовленные методом электроспиннинга. Количественный ХТТ тест показал отсутствие цитотоксичности у всех типов исследованных образцов, а также большую эффективность использования динамического метода их заселения клетками по сравнению со статичным. Также отмечено, что уже через 48 ч инкубации образцов с клеточными культурами их физико-механические свойства менялись как на макро-, так и микроуровнях. Сделано предположение, что эти изменения обусловлены процессами водного и ферментативного гидролиза полилактогликолидов, а также воздействием на их внутреннюю структуру и морфологию поверхности адгезированных на них ММСК. Аналогичные трансформации определенных физико-химических и структурных свойств матриц, изготовленных на основе иных биodeградируемых полимеров или их композиций, также могут происходить в результате их заселения различными клеточными культурами, что, безусловно, нужно учитывать при их применении в разработке тканеинженерных конструкций.

Ключевые слова: полилактогликолид, биорезорбируемые матрицы, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, тканевая инженерия, литьевое прессование, электроспиннинг, сверхкритическая флюидная пластификация, гидролитическая и ферментативная деградация.

DOI: 10.30791/1028-978X-2023-5-22-34

Введение

Материалы и изделия из полилактогликолида (ПЛГ, сополимер молочной и гликолевой кислот), благодаря удачному сочетанию своих физико-химических и биохимических свойств, таких как низкая цитотоксичность, регулируемая скорость биорезорбции, многообразие доступных для использования структурных форм, широко используются сегодня для решения различных задач фармации и

регенеративной медицины [1]. Одним из вариантов применения этого полимера является разработка и производство на его основе лекарственных препаратов пролонгированного действия. С 1989 по 2020 годы зарегистрировано более 25 биомедицинских продуктов, в которых ПЛГ в виде микросфер, гелей или монолитных имплантатов выступает в роли носителя, обеспечивающего контролируемое локальное высвобождение биологически активных веществ в период от 2 недель до 6 месяцев

[1]. Вторым направлением использования ПЛГ в передовых биомедицинских исследованиях и клинической практике является формирование на его основе биодеградируемых конструкций (мембран, сеток, крепежных элементов и др.) [2, 3] и матриц для тканеинженерных конструкций, успешно применяемых при замещении дефектов костной [4], хрящевой [5] и других тканей, а также нервных волокон [6] и кровеносных сосудов [7].

Биосовместимость ПЛГ матриц можно значительно улучшить за счет введения в их структуру дополнительного клеточного компонента, например, мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), что, в частности, продемонстрировано в экспериментальных работах по восстановлению поврежденной ткани мозга [8], гиалинового хряща [9], костной ткани [10], печени [11] и кожи [12]. Предполагается, что повышение эффективности применения такой тканеинженерной конструкции по сравнению с незаселенным матрицом происходит за счет паракринного механизма терапевтической активности ММСК, которые стимулируют ангиогенез и влияют на иммунный ответ ткани в области трансплантации [8 – 12].

В большинстве подобных работ, как правило, не представлен подробный протокол заселения матриц и лишь в некоторых из них указано исходное количество клеток (от 500 тысяч до 10 млн клеток на 1 см³ матрикса), а также общее время заселения (от 12 до 48 ч) [8 – 12]. Стандартные культуральные условия, при которых происходит заселение матриц, предполагают воздействие на них нагретых до 37 °С водных растворов, а также клеток, обладающих протеазной активностью, а значит, теоретически они способны повлиять на физико-механические свойства резорбируемых матриц. Это, на наш взгляд, необходимо учитывать при планировании и проведении *in vivo* экспериментов. Однако ни в одном из известных нам исследований этой проблемы не уделено должного внимания.

Цель настоящей работы — оценка влияния ММСК на физико-механические свойства полилактогликолидных матриц различной архитектуры.

Методика эксперимента

Материал

В качестве исходного материала для формирования полимерных матриц использовали

биоразлагаемый полилактогликолид (ПЛГ), входящий в категорию медицинских полимеров (medical grade), марки Purasorb PDLG 7507 (Corbion Purac, Нидерланды) с характеристической вязкостью 0,7 дл/г и соотношением звеньев молочной и гликолиевой кислоты 75:25, соответственно. Исходные гранулы сополимера PDLG 7507 (диаметром 1 – 3 мм) размалывали в ротационной криомельнице ЛЗМ-1М (ОЛИС, Россия) с использованием сухого льда. После этого полученный порошок просеивали через набор калибровочных сит и отбирали фракцию с характерным размером частиц 100 – 200 мкм.

Литьевое прессование

Формирование монолитных блоков проводили методом литьевого прессования [13]. Для этого навеску измельченного сополимера общей массой 477 мг помещали в пресс-форму площадью 7,5 см² (25 × 30 мм²) лабораторного гидравлического пресса ПЛГ-25 (АПС-Качество, Россия), нагревали до температуры 67 °С и прессовали под давлением 15 МПа в течение 50 мин. Сброс давления проводили при 30 °С, после чего пластину толщиной 0,5 мм извлекали из пресс-формы. Сформированную монолитную пластину нарезали на 6 одинаковых образцов размером 25 × 5 мм².

Сверхкритическая флюидная (СКФ) пластификация с последующим вспениванием

Формирование ПЛГ матриц методом СКФ пластификации с последующим вспениванием проводили на оригинальной установке, разработанной на базе ИФТ ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН [14]. Порошок сополимера засыпали в прямоугольную пресс-форму с внутренним объемом 50 × 12 × 2 мм³. Пресс-форму закрывали и помещали в нагретый до 40 °С реактор высокого (до 30 МПа) давления, который затем продували и заполняли диоксидом углерода марки ос.ч. (99,998 %, ООО “НИИКМ”, Москва) до давления 10 МПа. После пластификации сополимера сверхкритическим СО₂ в этих условиях в течение 1 ч его вспенивали путем сброса давления диоксида углерода в реакторе до атмосферного значения. После выключения нагрева и остывания пресс-формы до комнатной температуры ее удаляли из реактора, и извлекали из нее отвердевшую пористую (50 %) пластину. Далее, с помощью хирургического скальпеля, эту платину разрезали на прямоугольные образцы размером 25 × 5 × 0,5 мм³.

Электроспиннинг

Исходные полимерные гранулы PDLG 7507 растворяли в 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол (ПиМ-Инвест, Россия) в соотношении 9:91 масс. %. Нетканый материал матриц формировали на разработанной и изготовленной в ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН установке для электроспиннинга полимерных растворов [15]. С помощью поршневого насоса раствор полимера подавали через полиэтиленовую трубку в иглу диаметром 0,36 мм из нержавеющей стали. Между иглой и осадительным электродом (представляющим собой металлизированную пластину из полиметилметакрилата) подавали разность потенциалов, варьируемую в диапазоне от 10 до 20 кВ. После испарения растворителя отклоненные электрическим полем полимерные нити напыляли на алюминиевую фольгу. На основе результатов предварительных экспериментов были определены оптимальные параметры процесса изготовления ПЛГ матриц методом электроспиннинга: разность потенциалов — 20 кВ, скорость подачи полимерного раствора — 2 мл/ч, расстояние между концом иглы и коллектором — 12 см. Сформированную нетканую волокнистую структуру толщиной 0,5 мм нарезали на образцы размером 25 × 5 мм².

Гель-проникающая хроматография (ГПХ)

Подготовку образцов к ГПХ анализу проводили согласно следующей методике: навески исследуемых образцов массой 10 мг помещали в тетрагидрофуран (ТГФ для ВЭЖХ (ч.д.а.), Scharlab, Испания) для получения 0,25 % раствора и выдерживали 24 ч при комнатной температуре до их полного растворения.

Измерение молекулярной массы исследуемых образцов проводили с использованием установки GPC/SEC производства “Аквилон СТАЙЕР” (АО “АКВИЛОН”, Россия) с колонкой Phenogel (Phenomenex Inc., США) длиной 300 мм и диаметром 7,8 мм, с рефрактометрическим детектором и петлей инжектора объемом 200 мкл. Диаметр частиц пористого (характерный размер пор 10^4 Å) сорбента составлял 5 мкм. В качестве подвижной фазы (элюента) использовали ТГФ. Температуру термостата установки поддерживали на уровне 40 °С, а скорость потока элюента составляла 1 мл/мин. Регистрируемые данные автоматически обрабатывались программой “МультиХром 1.6”. Градуировочную зависимость строили на основе полистирольных стандартов.

Клеточные культуры

В качестве клеточного компонента использовали мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), выделенные методом эксплантатов из вартонова студня пупочного канатика человека. Для экспансии культуры использовали ростовую среду DMEM/F12 (Панэко, РФ) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США) до 10 % и пенициллина-стрептомицина (Панэко, РФ) до 1 %. ММСК открепляли от культуральной подложки раствором трипсина-ЭДТА (Панэко, РФ) и оценивали количество клеток и их жизнеспособность с помощью автоматического счетчика TC-20 (Bio-Rad, США).

Оценка цитотоксических свойств матриц. ХТТ тест. Метод прямого контакта

Исследование проводили в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 10993-5-2009 “Национальный стандарт Российской Федерации. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*”.

Для количественной оценки использовали колориметрический ХТТ тест, определяющий суммарную метаболическую активность живых клеток по способности их ферментов восстанавливать соли тетразолия до формазановых красителей. Для этого ММСК заселяли в лунки 96-луночного планшета из расчета 5 тысяч клеток на лунку и культивировали до достижения 80 % конfluenceности монослоя. В качестве отрицательного контроля (материала с нулевой цитотоксичностью) использовали фрагменты хирургической викриловой сетки (Ethicon, J&J, США), в качестве положительного контроля (цитотоксичного реактива) — 3 % ДМСО (Панэко, РФ). В лунки экспериментальных групп вносили ПЛГ матриц, следя за тем, чтобы они механически не повреждали монослой клеток. Через 7 суток инкубации проводили исследование с использованием набора реактивов ХТТ Kit (PanReac, AppliChem, США). Для измерения оптической плотности при длине волны 450 нм использовали микропланшетный фотометр Anthos 2010 с программным обеспечением ADAP+ (Biochrom, Великобритания).

Для оценки жизнеспособности клеток, адгезированных непосредственно на поверхности ПЛГ матриц, клетки окрашивали 2 мкМ раствором кальцеина АМ (Santa Cruz, США) и 2,5 мкг/мл раствором иодида пропидия (Santa Cruz, США)

в течение 30 мин в темноте при 37 °С. Результат окрашивания оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000 B и программного обеспечения LAS AF v.3.1.0 build 8587 (Leica Microsystems, Германия).

Статичный метод заселения матриц

Матрицы помещали в лунки культурального планшета и наслаивали сверху клеточную суспензию (100 тысяч клеток в 1 мл). Через 24 ч заселенные образцы переносили в новые лунки планшета, предварительно перевернув их, и наслаивали свежеприготовленную суспензию клеток на другую сторону матриц. Еще через 24 ч оценивали эффективность заселения матриц клетками с помощью ХТТ-теста.

Динамический метод заселения матриц

Матрицы переносили в пробирки-биореакторы (SPL Biosciences, Южная Корея), содержащие 10 мл клеточной суспензии (100 тысяч клеток в 1 мл). Биореакторы помещали на орбитальный шейкер (BioSan, Латвия), находящийся в CO₂-инкубаторе, и устанавливали режим вращения 70 об/мин без ограничения по времени. Через 24 ч суспензию клеток меняли на свежеприготовленную. Еще через 24 ч эффективность заселения матриц клетками оценивали с помощью ХТТ-теста.

Измерение линейных размеров матриц

Измерение линейных размеров матриц до и после заселения клетками проводили с помощью механического штангенциркуля (Inforce, КНР) с допустимой погрешностью 20 мкм.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Структуру ПЛГ матриц и морфологию их поверхности исследовали методом СЭМ с помощью сканирующего электронного микроскопа Phenom ProX (Phenom, Нидерланды) при ускоряющем напряжении 15 кВ.

Измерение краевого угла смачивания

Краевой угол смачивания оценивали только для монолитных ПЛГ блоков посредством контактного смачивания водой по методу лежащей капли. Для этого исследуемые образцы располагали на глад-

кой стеклянной подложке, наносили на их поверхность 3 мкл дистиллированной воды и с помощью цифровой камеры DCM-500 (ScoreTek, Китай) регистрировали изображение капли, измеряя затем угол между твердой поверхностью и касательной к поверхности жидкости в точке контакта трех фаз. Для каждого образца осуществляли не менее 6 измерений. Для пористых и волокнистых образцов таких измерений не проводили в силу неприменимости к ним этого метода.

Механические испытания

Испытания на растяжение проводили на универсальной настольной одноколлонной испытательной машине EZ-Test EZ-SX (Shimadzu, Япония), с программным обеспечением TRAPEZIUM X, с помощью которого задавали параметры испытания (скорость 1 мм/мин) и управляли системой, а также проводили сбор и анализ данных. Модули Юнга рассчитывали по линейным участкам полученных кривых “напряжение – деформация”.

Статистическая обработка результатов

Анализ полученных данных проводили с помощью программы SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., Германия). Для множественного сравнения в случае нормального распределения данных использовали однофакторный дисперсионный анализ (one way ANOVA), при отличном от нормального распределения данных использовали критерий Крускала-Уоллиса (ANOVA on ranks). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Экспериментальные образцы матриц

Для исследования были изготовлены ПЛГ образцы различной архитектуры, отличающиеся своей внутренней структурой и морфологией поверхности — монолитные, пористые и волокнистые матрицы (табл. 1).

Цитотоксические свойства матриц

В результате ХТТ теста (рис. 1) показано, что ПЛГ матрицы практически не влияли на суммарную метаболическую активность ММСК при их длительном сокультивировании.

При прямом контакте все прикрепленные к поверхности исследованных образцов клетки сохра-

Таблица 1

Характеристика матриц

Table 1

	Характеристика матриц		
	Тип 1	Тип 2	Тип 3
Химический состав	полилактидогликоlid Purasorb PDLG 7507		
Форма	пластины с линейными размерами 25 × 5 × 0,5 мм ²		
Обозначение в статье	“монокитные”	“пористые”	“волокнитные”
Метод изготовления	литневое прессование	сверхкритическая флюидная (СКФ) пластификация с последующим вспениванием	электроспиннинг
Поверхность	гладкая	развитая	волокнитная
Структура	монокитная	губчатая с открытыми и замкнутыми порами	нетканый материал
Вес пластины, мг	80,8 ± 5,4	50,7 ± 3,7	18,5 ± 2,1
Пористость, %	0	60	63
Размер пор, мкм	0	50 – 150	≤17
Модуль Юнга, Н/мм ²	1334 ± 183	486 ± 105	155 ± 32
Максимальная относительная деформация, %	3,6 ± 1,0	5,1 ± 2,1	75,4 ± 24,8
Среднечисловая молекулярная масса, кДа	100,9 ± 1,6	102,1 ± 3,6	96,6 ± 2,3

Данные представлены в виде среднее ± стандартное отклонение.

няли свою жизнеспособность, подтверждаемую зеленым свечением кальцеина в их цитоплазме. Погибшие клетки с окрашенными в красный цвет иодидами пропидия ядрами отсутствовали (рис. 2).

В соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993-5-2009 все экспериментальные ПЛГ образцы получили оценку “0” по шкале цитотоксичности (“нецитотоксичны”).

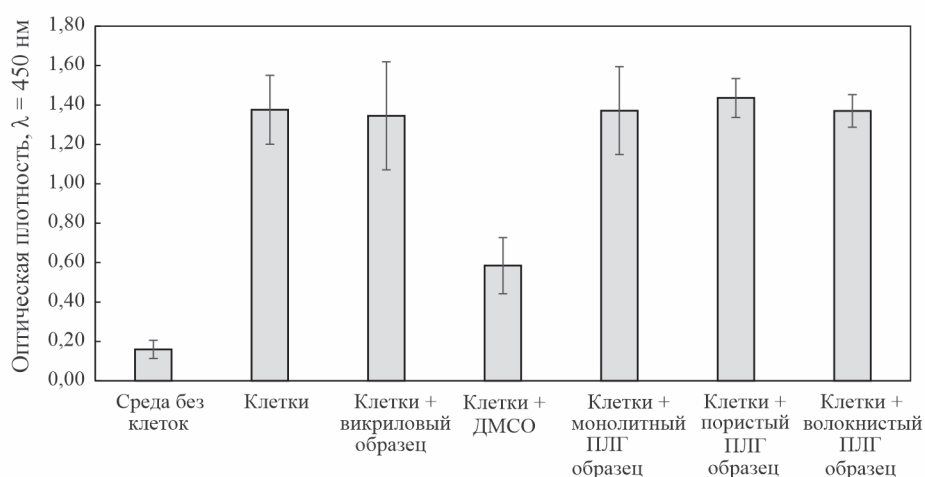


Рис. 1. Оценка цитотоксических свойств ПЛГ образцов. Результаты колориметрического ХТТ теста. Данные представлены в виде среднее ± стандартное отклонение.

Fig. 1. Evaluation of the PLGA sample cytotoxic properties. Results of the colorimetric XTT test. Data are presented as mean ± st.dev.

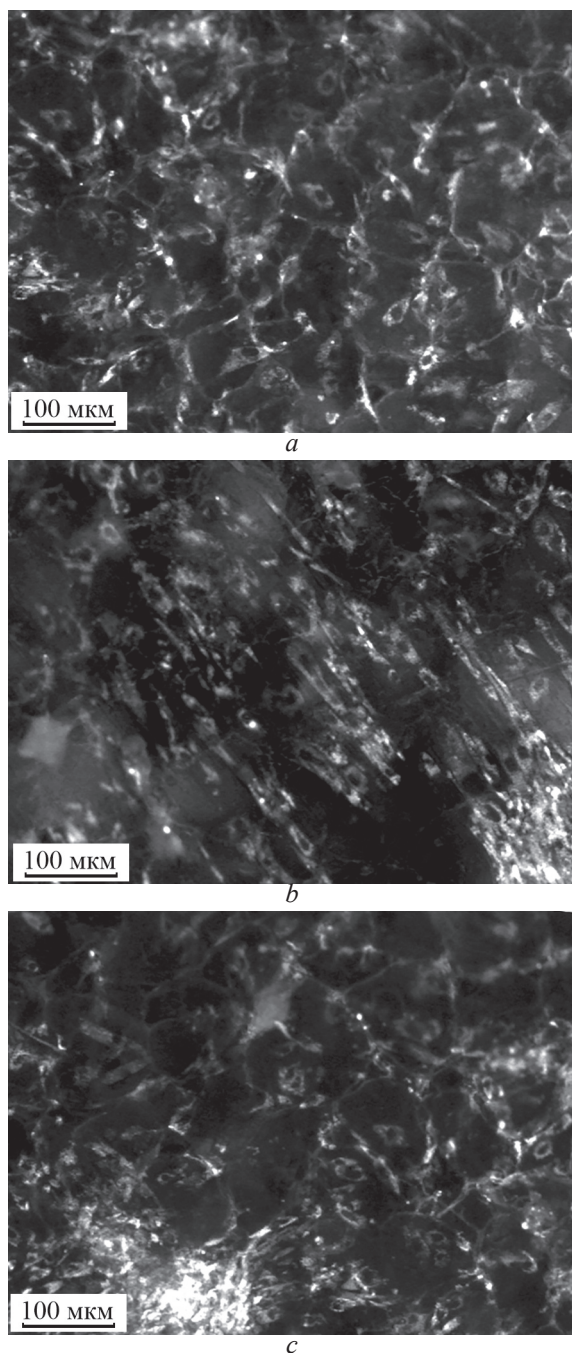


Рис. 2. Изображение свечения кальцеина в цитоплазме живых клеток, адгезированных на поверхности PLLG матриц, полученное методом флуоресцентной микроскопии: *a* — монолитный, *b* — пористый, *c* — волокнистый матрицы.

Fig. 2. Image of calcein luminescence in the cytoplasm of living cells adhered to the surface of PLLG scaffolds, obtained by fluorescence microscopy: *a* — monolithic, *b* — porous, *c* — fibrous scaffolds.

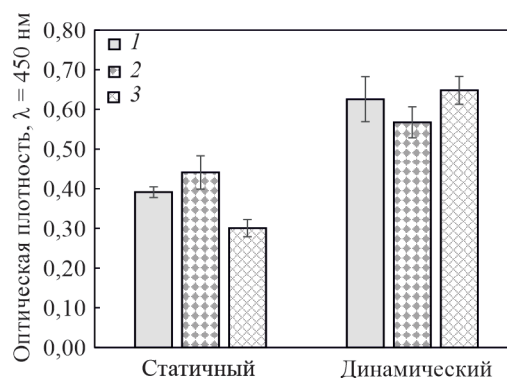


Рис. 3. Сравнение эффективности динамического и статичного методов заселения PLLG образцов с помощью колориметрического ХТТ теста: 1 — монолитный, 2 — пористый, 3 — волокнистый матрицы.

Fig. 3. Efficacy comparison of the dynamic and static methods of cell cultivation on PLLG samples. Colorimetric XTT test: 1 — monolithic, 2 — porous, 2 — fibrous scaffolds.

Эффективность заселения матриц клетками

Из результатов ХТТ теста, представленных на рис. 3, следует, что использование динамического метода заселения матриц клетками более эффективно по сравнению со статичным методом. Поэтому во всех последующих экспериментах для заселения PLLG образцов был использован динамический метод.

Изменение линейных размеров матриц после заселения клетками

Произошедшие изменения внешнего вида матриц наблюдали визуально после их заселения клетками. В частности, пространственная деформация всех типов образцов и исчезновение оптической прозрачности у PLLG монолитов. Изменение линейных размеров монолитных образцов и пористых матриц, как правило, не превышало 5 %, в то время как линейные размеры волокнистых нетканых матриц уменьшались почти на треть ($32,6 \pm 3,4 \%$).

Структура поверхности PLLG образцов после их заселения клетками

Исследование морфологии поверхности различных типов PLLG образцов после их заселения

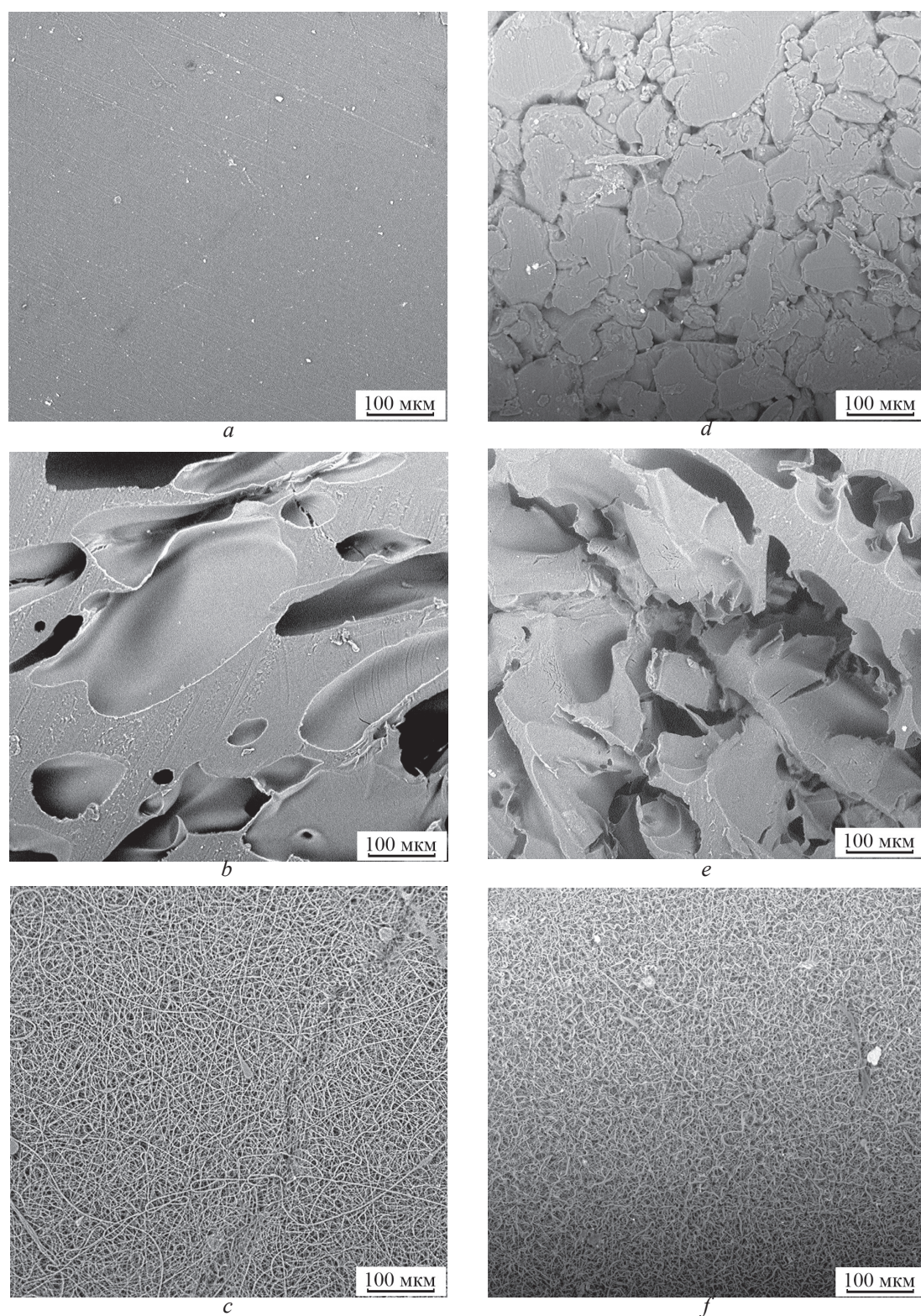


Рис. 4. СЭМ изображения структуры поверхности ПЛГ образцов до (a – c) и после (d – f) заселения клетками. Монолитный (a, d), пористый (b, e) и волокнистый (c, f) матриксы.

Fig. 4. SEM images of the surface structure of PLGA samples before (a – c) and after (d – f) the cell cultivation. Monolithic (a, d), porous (b, e) and fibrous (c, f) scaffolds.

клетками, проведенное с помощью СЭМ, выявило целый ряд заметных отличий и изменений их структурных характеристик по отношению к исходным аналогам.

Изначально поверхность монолитных блоков была гладкой, без складок, пор, трещин или каких-либо иных крупных дефектов. После их заселения клетками отчетливо наблюдалось образование характерных желобков и границ раздела, отделяющих исходные микрочастицы полимера, использованных при их литьевом прессовании (рис. 4а).

Поверхность пористых матрицков, исходно отличающаяся высокой вариативностью (наличие участков в виде относительно ровных площадок, вогнутых поверхностей открытых пор, острых гребней на стыке соседних пор и т.д.), обусловленной СКФ особенностями технологии их изготовления, визуально значимо не менялась (рис. 4б).

В группе волокнистых нетканых матрицков отчетливо наблюдали эффект скручивания волокон (рис. 4с), приводивший к значимому (на 30 %) уменьшению их линейных размеров.

Краевой угол смачивания исходных монолитных PLLG блоков составлял $72 \pm 6^\circ$, а после их заселения ММСК он уменьшился практически до 0° (абсолютная смачиваемость).

Изменение модуля Юнга матрицков после заселения клетками

Значения модуля продольной упругости монолитных образцов и пористых матрицков существенно уменьшились после их заселения клетками. Причем это снижение оказалось более

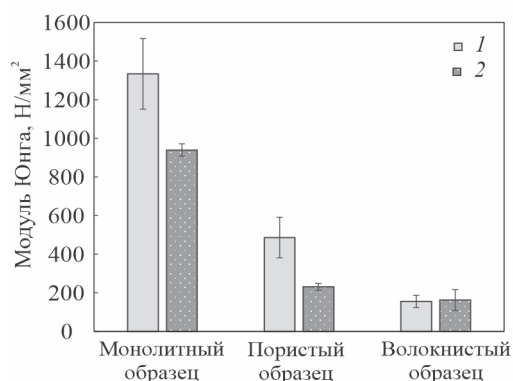


Рис. 5. Изменение модуля Юнга PLLG образцов до (1) и после (2) их заселения клетками.

Fig. 5. Change in the Young's modulus of PLLG samples before (1) and after (2) the cell cultivation.

выраженным для пористых матрицков по сравнению с монолитными PLLG (на 54 % и 32 %, соответственно). При этом модуль упругости волокнистых матрицков заметно не изменился (рис. 5).

Обсуждение результатов

Как видно из табл. 1, три типа изученных PLLG образцов с равными линейными размерами заметно отличались друг от друга своими физико-механическими свойствами, определяемыми, главным образом, методом их изготовления. Монолитные блоки изначально являлись оптически прозрачными и наиболее жесткими из всех вышеописанных образцов. Волокнистые нетканые матрицы по сути представляли собой оптически непрозрачные и легко растяжимые мембраны, в то время как пористые матрицы, сформированные с помощью сверхкритического диоксида углерода, имели промежуточные значения как оптической плотности, так и своей способности к сопротивлению деформациям. Данные, полученные нами для волокнистых PLLG матрицков, близки к результатам других исследователей, работавших с аналогичными неткаными PLLG матриксами с тем же соотношением мономеров лактид/гликолид 75/25 — модуль Юнга 170 ± 46 Н/мм², относительное удлинение 84 ± 5 % [16, 17]. Подобные механические характеристики PLLG матрицков обычно считаются недостаточными для их использования при замещении, например, поврежденной костной ткани. Поэтому для этих целей, как правило, используют композитные материалы, сочетающие PLLG и гидроксиапатит, поликапролактон, фосфат кальция, керамику либо иные добавки [18]. Полученные нами результаты показывают, что возможно формирование более прочных матрицков из чистого PLLG при использовании процесса СКФ пластификации (модуль Юнга 486 ± 105 Н/мм²) или метода литьевого прессования (модуль Юнга 1334 ± 183 Н/мм²). При этом отсутствие в их составе различных добавок упрощает процедуру прогнозирования и оценки скорости резорбции таких матрицков как *in vitro*, так и *in vivo* (порядка 16 недель для аналогичного нашему PLLG с соотношением лактид/гликолид 75/25 [18]).

Независимо от способа формирования (литьевое прессование, СКФ пластификация, электроспиннинг) все PLLG образцы оказались нецитотоксичными (рис. 1). Схожие результаты получены при сравнении цитотоксических свойств пористых и волокнистых матрицков на основе PLLG/гидроксиапатита, изготовленных ранее дру-

гими исследователями методами разделения фаз или электроспиннинга, соответственно [19].

Как видно из рис. 3, динамический метод заселения ПЛГ матриц оказался эффективнее статичного для всех типов полимерной поверхности (гладкой, пористой или волокнистой). Анализ научной литературы показывает, что статичный метод заселения тканеинженерных конструкций применяется значительно чаще, чем динамический [20], поскольку является более простым и не требует использования дополнительного оборудования. В то же время работы, в которых проводили прямое сравнение этих двух методов заселения, однозначно подтверждают наш вывод о том, что динамический метод более предпочтителен, как это показано, например, при заселении полимерных волокнистых матриц [21], пористых матриц, сформированных методом трехмерной печати [22] или методом выщелачивания [23], васкулярных графтов в виде полых цилиндров [24] и других.

На рис. 4 представлены изменения внешнего вида ПЛГ образцов после их заселения ММСК с использованием динамического метода. Очевидно, что монолитные блоки теряли свою оптическую прозрачность вследствие начинавшегося гидролиза, приводящего к эрозии исходно гладкой поверхности, что приводило к увеличению доли рассеянного света. При этом особенности архитектуры пористых и волокнистых матриц изначально обуславливали их высокую рассеивающую способность в видимом диапазоне. Поэтому частичная эрозия их поверхности уже не приводила к значимому изменению их оптических свойств.

И монолитные ПЛГ образцы, и пористые образцы через 48 ч инкубирования с клетками в целом сохраняли свои линейные размеры, хотя и частично деформировались в результате этого процесса. При этом после заселения волокнистых матриц отмечалось значимое уменьшение их линейных размеров вследствие скручивания образующих их волокон. Похожий эффект деформации волокон (в англоязычной литературе “crimping”) можно получить при воздействии нагретого до 45 – 55 °С этанола на волокнистые матрицы из полилактида, поликапролактона и их сополимера или при нагревании полилактидного волокнистого матрикса до 85 °С. В некоторых работах [25, 26] предложено использовать подобные матрицы из скрученных волокон для замещения поврежденных связей.

У монолитных образцов и пористых ПЛГ матриц после их заселения клетками модуль продольной упругости уменьшался, в то время как у волокнистых матриц модуль Юнга стати-

стически значимо не изменялся (155 и 162 Н/мм² до и после заселения клетками, соответственно) (рис. 5). Известно, что модуль Юнга полилактогликолидов может меняться при их взаимодействии с водными растворами, однако данные об этом достаточно противоречивы. При этом конечный результат зависит как от структурных особенностей самого матрикса, так и условий проведения эксперимента. Например, в [27] модуль Юнга влажной волокнистой ПЛГ структуры с высокой степенью выравнивания волокон снижался вдвое по сравнению с ее сухим состоянием, и напротив, в [28] при смачивании волокнистого ПЛГ матрикса без выравнивания волокон модуль Юнга немного увеличивался (с 98 до 118 Н/мм²). Дело в том, что на механические свойства волокнистого матрикса одновременно влияют многие факторы, в том числе диаметр и степень скрученности волокон, их исходная ориентация и деформация под действием прикрепленных клеток [29]. Поэтому, несмотря на значительные изменения на микроуровне, модуль продольной упругости волокнистого матрикса в условиях нашего эксперимента действительно мог в итоге остаться практически неизменным.

В работе [30] показано, что инкубирование пористого ПЛГ матрикса в фосфатно-солевом буферном растворе при 25 °С лишь немного снижает модуль Юнга. Однако инкубация такого же образца при 37 °С приводит к значительному уменьшению этого параметра. Причем этот эффект выражен тем более, чем большую долю в составе сополимера занимает гликолид. Взаимодействие ПЛГ с водными растворами приводит к уменьшению его молекулярной массы, ведущего к снижению температуры стеклования и последующей пластификации полимера, что, в свою очередь, и вызывает изменение механических свойств матрикса [31, 32].

Результаты проведенных экспериментов подтвердили предположение о том, что в процессе заселения клетками исследованных ПЛГ образцов их характеристики изменяются как на макро-, так и на микроуровне. Причем эти изменения, главным образом, обусловлены исходной архитектурой этих матриц. Как и у любого биodeградируемого полимера, в структуре цепи ПЛГ присутствуют гидролизующие и окисляемые связи, что делает его чувствительным к воздействию влажности, тепла, света и механических нагрузок. При этом основной механизм деградации ПЛГ обусловлен водным гидролизом эфирных связей [33]. Помимо этого, также известно, что ММСК способны продуцировать микровезикулы, обладающие ферментативной активностью в силу содержащихся в них

АТФаз, нуклеотидаз, а также эстераз, расщепляющих эфирные связи [34]. Ранее мы показали [35], что ММСК, культивируемые на поверхности моноклеточных полилактидных матриц, значительно ускоряют снижение среднечисловой молекулярной массы образующего их полимера, интенсифицируя процесс его структурной деградации.

Выводы

Показано, что в процессе заселения клетками ПЛГ образцы различной архитектуры подвергаются воздействию одновременно нескольких факторов: повышенной температуре (близкой к температуре стеклования полимера), водному гидролизу (инициирующему деградацию полимерной матрицы по всему ее объему), ферментативному гидролизу (ускоряющему деградацию ПЛГ и приводящему к эрозии его поверхности), а также микродеформациям под действием адгезированных на матрицах ММСК.

Всего 48 ч такого воздействия оказалось достаточно, чтобы заметно повлиять на физико-механические свойства всех трех исследованных типов ПЛГ структур. При этом конкретные особенности этих изменений определялись, главным образом, исходной архитектурой исследованных образцов.

Логично предположить, что аналогичные трансформации определенных свойств матричных структур, изготовленных на основе иных биodeградируемых полимеров или их композиций, могут происходить в процессе их заселения клетками. Это, безусловно, следует принимать во внимание и учитывать при разработке и использовании тканеинженерных конструкций.

Работа выполнена при поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-02-00354, Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части формирования матриц с помощью литьевого прессования, электроспиннинга и СКФ пластификации с последующим вспениванием и Государственного задания №121040600436-7 в части in vitro экспериментов.

Литература/References

1. Lim Y.W., Tan W.S., Ho K.L., et al. Challenges and complications of poly(lactic-co-glycolic acid)-based long-acting drug product development. *Pharmaceutics*, 2022, v. 14, no. 3, p. 614.
2. Gentile P., Chiono V., Carmagnola I., et al. An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, v. 15, no. 3, pp. 3640 – 3659.
3. Wen X., Tresco P. Fabrication and characterization of permeable degradable poly(dl-lactide-co-glycolide) (PLGA) hollow fiber phase inversion membranes for use as nerve tract guidance channels. *Biomaterials*, 2006, v. 27, no. 20, pp. 3800 – 3809.
4. Jin S., Xia X., Huang J., et al. Recent advances in PLGA-based biomaterials for bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, Elsevier Ltd, 2021, v. 127, pp. 56 – 79.
5. Zhang Y., Yang F., Liu K., et al. The impact of PLGA scaffold orientation on in vitro cartilage regeneration. *Biomaterials*, 2012, v. 33, no. 10, pp. 2926 – 2935.
6. dos Santos F.P., Peruch T., Katami S.J.V., et al. poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) scaffold induces short-term nerve regeneration and functional recovery following sciatic nerve transection in rats. *Neuroscience*, IBRO, 2019, v. 396, pp. 94 – 107.
7. Wang N., Zheng W., Cheng S., et al. In Vitro evaluation of essential mechanical properties and cell behaviors of a novel polylactic-co-glycolic acid (PLGA)-based tubular scaffold for small-diameter vascular tissue engineering. *Polymers*, 2017, v. 9, no. 12, p. 318.
8. Zhou L., Tu J., Fang G., et al. Combining PLGA scaffold and MSCs for brain tissue engineering: A potential tool for treatment of brain injury. *Stem Cells International*, 2018, v. 2018, pp. 1 – 8.
9. Qi Y., Du Y., Li W. et al. Cartilage repair using mesenchymal stem cell (MSC) sheet and MSCs-loaded bilayer PLGA scaffold in a rabbit model. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 2014, v. 22, no. 6, pp. 1424 – 1433.
10. Zhang B., Zhang P., Wang Z. et al. Tissue-engineered composite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite nanoparticles seeded with autologous mesenchymal stem cells for bone regeneration. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 2017, v. 18, no. 11, pp. 963 – 976.
11. Kang H.T., Jun D.W., Jang K. et al. Effect of stem cell treatment on acute liver failure model using scaffold. *Digestive Diseases and Sciences*, 2019, v. 64, no. 3, pp. 781–791.
12. Jehn P., Winterboer J., Kampmann A., et al. Angiogenic effects of mesenchymal stem cells in combination with different scaffold materials. *Microvascular Research*, 2020, v. 127, art. 103925.
13. Arutyunyan I. V., Borovikov P.I., Dunaev A.G., et al. Poly-DL-lactide Degradation in Biological Media: Experiment and Model. *Inorganic Materials: Applied Research*, 2021, v. 12, no. 2, pp. 377 – 385.
14. Bogorodskii S.E., Krotova L.I., Mironov A. V., et al. Fabrication of highly porous bioresorbable polymer matrices using supercritical carbon dioxide. *Russian Journal of Physical Chemistry B*, 2013, v. 7, no. 8, pp. 916 – 923.

15. Trifanova E.M., Khvorostina M.A., Mariyanats A.O., et al. Natural and synthetic polymer scaffolds comprising upconversion nanoparticles as a bioimaging platform for tissue engineering. *Molecules*, 2022, v. 27, no. 19, art. 6547.
16. Yu Y., Kong L., Li L., et al. Antitumor activity of doxorubicin-loaded carbon nanotubes incorporated poly(lactic-co-glycolic acid) electrospun composite nanofibers. *Nanoscale Research Letters*, 2015, v. 10, no. 1, art. 343.
17. Feng Y., Lu W., Ren X., et al. Electrospun poly(lactide-co-glycolide-co-3(S)-methyl-morpholine-2,5-dione) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Polymers*, 2016, v. 8, no. 2, art. 13.
18. Zhao D., Zhu T., Li J., et al. Poly(lactic-co-glycolic acid)-based composite bone-substitute materials. *Bioactive Materials*, 2021, v. 6, no. 2, pp. 346 – 360.
19. Namini M.S., Bayat N., Tajerian R., et al. A comparison study on the behavior of human endometrial stem cell-derived osteoblast cells on PLGA/HA nanocomposite scaffolds fabricated by electrospinning and freeze-drying methods. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 2018, v. 13, no. 1, art. 63.
20. Arutyunyan I., Elchaninov A., Sukhikh G., et al. Cryopreservation of tissue-engineered scaffold-based constructs: from concept to reality. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2022, v. 18, no. 4, pp. 1234 – 1252.
21. Radakovic D., Reboredo J., Helm M., et al. A multilayered electrospun graft as vascular access for hemodialysis. *Plos one*, ed. Soncini M., 2017, v. 12, no. 10, art. e0185916.
22. Leferink A.M., Hendrikson W.J., Rouwkema J., et al. Increased cell seeding efficiency in bioplotting three-dimensional PEOT/PBT scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2016, v. 10, no. 8, pp. 679 – 689.
23. Melke J., Zhao F., Ito K., et al. Orbital seeding of mesenchymal stromal cells increases osteogenic differentiation and bone-like tissue formation. *Journal of Orthopaedic Research*, 2020, v. 38, no. 6, pp. 1228 – 1237.
24. Villalona G.A., Udelsman B., Duncan D.R., et al. Cell-seeding techniques in vascular tissue engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2010, v. 16, no. 3, pp. 341 – 350.
25. Meng X., Wang X., Zhang B. et al. Fibrous scaffold with a tunable nonlinear elasticity. *Polymer Testing*, 2021, v. 94, art. 107045.
26. Szczesny S.E., Driscoll T.P., Tseng H.-Y., et al. Crimped nanofibrous biomaterials mimic microstructure and mechanics of native tissue and alter strain transfer to cells. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2017, v. 3, no. 11, pp. 2869 – 2876.
27. Shen Y., Tu T., Yi B., et al. Electrospun acid-neutralizing fibers for the amelioration of inflammatory response. *Acta Biomaterialia*, 2019, v. 97, pp. 200 – 215.
28. Lee J.B., Kim S.E., Heo D.N., et al. In vitro characterization of nanofibrous PLGA/gelatin/hydroxyapatite composite for bone tissue engineering. *Macromolecular Research*, 2010, v. 18, no. 12, pp. 1195 – 1202.
29. Zündel M., Ehret A.E., Mazza E. The multiscale stiffness of electrospun substrates and aspects of their mechanical biocompatibility. *Acta Biomaterialia*, 2019, v. 84, pp. 146 – 158.
30. Wu L., Zhang J., Jing D., et al. “Wet-state” mechanical properties of three-dimensional polyester porous scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006, v. 76A, no. 2, pp. 264 – 271.
31. Pan Z., Ding J. Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Interface Focus*, 2012, v. 2, no. 3, pp. 366 – 377.
32. Liu G., McEnnis K. Glass transition temperature of PLGA particles and the influence on drug delivery applications. *Polymers*, 2022, v. 14, no. 5, art. 993.
33. Vieira A.C., Marques A.T., Guedes R.M., et al. 4D Numerical Analysis of Scaffolds: A New Approach, 2014, pp. 69 – 95.
34. Gonçalves F. da C., Luk F., Korevaar S.S., et al. Membrane particles generated from mesenchymal stromal cells modulate immune responses by selective targeting of pro-inflammatory monocytes. *Scientific Reports*, 2017, v. 7, no. 1, art. 12100.
35. Arutyunyan I.V., Borovikov P.I., Dunaev A.G., et al. Poly-DL-lactide degradation in biological media: Experiment and model. *Inorganic Materials: Applied Research*, 2021, v. 12, no. 2, pp. 377 – 385.

*Статья поступила в редакцию — 06.10.2022 г.
после доработки — 26.12.2022 г.
принята к публикации — 27.12.2022 г.*

Арутюнян Ирина Владимировна — Федеральное государственное бюджетное учреждение “Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова” Министерства здравоохранения РФ (Москва, 117997, ул. Опарина, 4); Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования “Российский университет дружбы народов” (Москва, 117198, Миклухо-Маклая, б), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, специалист в области клеточной биологии. E-mail: labrosta@yandex.ru.

Дунаев Андрей Геннадьевич — Институт фотонных технологий федерального научно-исследовательского центра “Кристаллография и фотоника” Российской академии наук (119333, Москва, Ленинский проспект, 59), младший научный сотрудник, специалист в области медицинского материаловедения, физикохимии полимеров, сверхкритических флюидных технологий, биополимеров. E-mail: dunaewan@gmail.com.

Трифанова Екатерина Максимовна — Институт фотонных технологий федерального научно-исследовательского центра “Кристаллография и фотоника” Российской академии наук (119333, Москва, Ленинский проспект, 59), младший научный сотрудник, специалист в области медицинского материаловедения, физикохимии полимеров, аддитивных технологий, биополимеров, электроспиннинга. E-mail: katikin@mail.ru.

Хворостина Мария Александровна — Институт фотонных технологий федерального научно-исследовательского центра “Кристаллография и фотоника” Российской академии наук (119333, Москва, Ленинский проспект, 59), младший научный сотрудник, специалист в области аддитивных технологий, физики полимеров и медицинского материаловедения; Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова (115522 Москва, ул. Москворечье, 1), младший научный сотрудник, специалист в области генетики эукариотических клеток и регенеративной медицины. E-mail: khvorostina.m@gmail.com.

Ельчанинов Андрей Владимирович — Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского” (Москва, 117418, Цюрупы, 3); Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования “Российский университет дружбы народов” (Москва, 117198, Миклухо-Маклая, 6), доктор медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией, специалист в области клеточной биологии. E-mail: elchandreuy@yandex.ru.

Соболева Анна Геннадьевна — Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» (Москва, 117418, Цюрупы, 3), Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования “Российский университет дружбы народов” (Москва, 117198, Миклухо-Маклая, 6), кандидат биологических наук, научный сотрудник, специалист в области биотехнологии и молекулярной биологии. E-mail: annasobo@mail.ru.

Попов Владимир Карпович — Институт фотонных технологий федерального научно-исследовательского центра “Кристаллография и фотоника” Российской академии наук (119333, Москва, Ленинский проспект, 59), доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией, специалист в области физической химии, биоматериалов, лазерных, аддитивных и сверхкритических флюидных технологий. E-mail: popov@laser.ru, vladikarpov@gmail.com.

Фатхудинов Тимур Хайсамудинович — Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского” (Москва, 117418, Цюрупы, 3), доктор медицинских наук, заместитель директора по научному развитию, специалист в области регенеративной медицины. E-mail: tfat@yandex.ru.

Effects of mesenchymal stem cells on the physical and mechanical properties of polyester scaffolds of different architectonics

**I. V. Arutyunyan, A. G. Dunaev, E. M. Trifanova, M. A. Khvorostina,
A. V. Elchaninov, A. G. Soboleva, T. H. Fatkhudinov, V. K. Popov**

The biocompatibility of polylactic-co-glycolic acid (PLGA) scaffolds for tissue engineering constructions can be significantly improved by autologous mesenchymal stem cells (MSCs) colonization. However, the features of the cell colonization procedure can generally affect the changes in the physical and mechanical properties of these scaffolds, which are mostly determined by their architectonics. To study this issue, in this work, we have formed and investigated three types of experimental PLGA samples: 1). molded monolithic blocks; 2). porous scaffolds formed by plasticization in supercritical CO₂ followed by foaming; and 3). electrospun fibrous non-woven scaffolds. The quantitative XTT test showed the nontoxicity of all studied samples, as well as the greater efficiency of the dynamic cell colonization method compared to the static one. After 48 hours of samples incubation with cell cultures, their physical and mechanical properties were noted to change both at macro- and microlevels. These changes, in our opinion, occur due to the processes of hydrolytic and enzymatic PLGA hydrolysis, as well as the effect of adhered MSCs on the scaffold internal structure and surface morphology. Similar transformations of certain physical, mechanical and structural properties of scaffolds based on other biodegradable polymers or their compositions can also occur as a result of their colonization with various cell cultures, which should be taken into account when applying the scaffolds to develop tissue engineering constructions.

Keywords: polylactic-co-glycolic acid, bioresorbable scaffolds, mesenchymal stem cells, tissue engineering, injection molding, electrospinning, superficial fluid technologies, hydrolytic and enzymatic degradation.

***Arutyunyan Irina** — National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology Named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation (Moscow, 117997, 4 Oparina Street); Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University, Moscow, 117198, 6 Miklukho-Maklaya Street), PhD, senior researcher, cell biologist. E-mail: labrosta@yandex.ru.*

***Dunaev Andrey** — Institute of Photon Technologies Federal Scientific Research Centre "Crystallography and Photonics" Russian Academy of Sciences, junior researcher, specialist in medical materials science, physico-chemistry of polymers, supercritical fluid technologies, biopolymers. E-mail: dunaewan@gmail.com.*

***Trifanova Ekaterina** — Institute of Photon Technologies Federal Scientific Research Centre "Crystallography and Photonics" Russian Academy of Sciences, junior researcher, specialist in medical materials science, physico-chemistry of polymers, additive technologies, biopolymers, electrospinning. E-mail: katikin@mail.ru.*

***Khvorostina Maria** — Institute of Photonic Technologies Federal Scientific Research Centre "Crystallography and Photonics", Russian Academy of Sciences, junior researcher; Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Centre for Medical Genetics", junior researcher, specialist in additive manufacturing, polymer physics and medical material science, research interests, eukaryotic cell genetics and regenerative medicine. E-mail: khvorostina.m@gmail.com.*

***Elchaninov Andrey** — Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution "Petrovsky National Research Centre of Surgery" (Moscow, 117418, 3 Tsyurupy Street); Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University, Moscow, 117198, 6 Miklukho-Maklaya Street), PhD, head of the laboratory, cell biologist. E-mail: elchandrey@yandex.ru.*

***Soboleva Anna** — Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution "Petrovsky National Research Centre of Surgery" (Moscow, 117418, 3 Tsyurupy Street), Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University) (Moscow, 117198, 6 Miklukho-Maklaya Street), PhD, science researcher, biotechnologist, molecular biologist. E-mail: annasobo@mail.ru.*

***Popov Vladimir** — Institute of Photon Technologies Federal Scientific Research Centre "Crystallography and Photonics" Russian Academy of Sciences, Dr Sci, head of laboratory, specialist in physical chemistry, biomaterials, laser, additive and supercritical fluid technologies. E-mail: popov@laser.ru, vladikarpopov@gmail.com.*

***Fatkhudinov Timur** — Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution "Petrovsky National Research Centre of Surgery" (Moscow, 117418, 3 Tsyurupy Street), Dr Sci (Med), director for scientific development, specialist in regenerative medicine. E-mail: tfat@yandex.ru.*