

И.В. МАЙБОРОДИН, А.И. ШЕВЕЛА, В.А. МАТВЕЕВА,  
М.Н. ДРОВОСЕКОВ, М.И. БАРАННИК, И.В. КУЗНЕЦОВА

## АНГИОГЕНЕЗ В ГРАНУЛЯЦИОННОЙ ТКАНИ ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТА С МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

Центр новых медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины  
СО РАН, г. Новосибирск,  
Российская Федерация

**Цель.** В эксперименте на крысах оценить процессы, происходящие в различных тканях после имплантации полимерных пленок на основе полигидроксиалканата (ПГА) с адсорбированными аутологичными мультипотентными мезенхимальными стволовыми клетками костномозгового происхождения (АММСККП).

**Материал и методы.** Методами световой микроскопии изучали процессы, происходящие в брюшной полости, мышечной ткани и подкожно-жировой клетчатке крыс после имплантации ПГА с адсорбированными АММСККП с трансфицированной ДНК флуоресцентного белка GFP.

**Результаты.** Было выявлено, что после имплантации ПГА с АММСККП в окружающих тканях происходит увеличение числа сосудов из-за процессов неоангиогенеза. В данном случае АММСККП не мигрируют и не разрушаются в месте введения, а формируют кровеносные сосуды за счет дифференцировки в клетке их структур. Процессы ангиогенеза в тканях вокруг ПГА, в свою очередь, приводят к образованию большого числа кровеносных сосудов в грануляциях, формирующихся вокруг имплантированного инородного тела, большому объему самих грануляций и более толстой капсулы, отграничивающей в дальнейшем полимер. Однако возможно формирование толстой капсулы с признаками фиброобразования после имплантации ПГА с АММСККП является неблагоприятным прогностическим признаком, указывающим на более высокую вероятность развития в дальнейшем различных осложнений. Со временем введенные АММСККП замещаются собственными клетками реципиента.

**Заключение.** Имплантация ПГА с АММСККП приводит к образованию большого числа кровеносных сосудов в грануляциях, формирующихся вокруг имплантированного инородного тела, большому объему самих грануляций и более толстой капсулы, отграничивающей в дальнейшем полимер.

*Ключевые слова:* мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, полигидроксиалканат, имплантация, ангиогенез, гранулематозное воспаление

**Objectives.** To estimate the processes occurring in various tissues after implantation of polymeric films from polyhydroxyalkanoate (PHA) with the adsorbed autologous multipotent mesenchymal stem cells of the bone marrow origin (AMMSCBM) in experiment.

**Methods.** The processes occurring in the rat abdominal cavity, muscular and subcutaneous adipose tissues after implantation of PHA with the adsorbed AMMSCBM and transfected DNA of fluorescent protein GFP were studied by the methods of light microscopy.

**Results.** It was revealed that after implantation of PHA with AMMSCBM the increase of blood vessels number in the surrounding tissues was occurred as a result of neoangiogenesis processes. In this case AMMSCBM don't migrate and don't collapse in the site of administration, but form the blood vessels on account of differentiation of their structures in cells. Processes of angiogenesis in tissues around PHA in turn lead to formation of large number of blood vessels in the granulations surrounded the implanted foreign body, larger volume of granulations and thicker capsule, delimiting polymer in the future. However it is possible that formation of a thick capsule with fibrous signs after implantation of PHA with AMMSCBM is considered as the unfavorable prognostic signs indicating to high probability of various complications development afterwards. Administrated AMMSCBM are replaced eventually by their own recipient cells.

**Conclusions.** The implantation of PHA with AMMSCBM leads to the formation of large number of blood vessels in the granulations forming round the implanted foreign body, larger volume of granulations and thicker capsule delimiting polymer in the future.

*Keywords:* multipotent mesenchymal stromal cells, polyhydroxyalkanoate, implantation, angiogenesis, granulomatous inflammation

Novosti Khirurgii. 2013 Mar-Apr; Vol 21 (2): 29-36

Angiogenesis in granulation tissue after implantation of polyhydroxyalkanoate with mesenchymal stem cells

I.V. Maiborodin, A.I. Shevela, V.A. Matveeva, M.N. Drovosekov, M.I. Barannick, I.V. Kuznetsova

### Введение

Высокий потенциал мультипотентных ме-

зехимальных стромальных клеток (ММСК), способных формировать любые специализированные клетки, открывает перспективу созда-

ния новой отрасли медицины – регенераторной и заместительной клеточной терапии, позволяющей восстанавливать или даже создавать органы и ткани, утраченные или разрушенные в результате травм, хирургических вмешательств или инфекционных заболеваний.

Введение ММСК в организм многие исследователи осуществляют на различных носителях, лучше 3-хмерных, в которых клетки лучше взаимодействуют между собой и могут обмениваться клеточными сигналами. Имеются сообщения о возможности создания биодеградируемых носителей для ММСК из полимерных материалов, например, полилактида-гликолида [1], poly(lactide-co-polyglycolic acid) [2], poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) [3] и альгинатов [4].

Среди биополимеров особое место занимают биодеградируемые полигидроксиалканаты (ПГА) – полимеры гидроксипроизводных алкановых кислот (масляной, валериановой и др.), которые с середины 80-х годов прошлого века активно изучают в качестве материала для хирургии, тканевой инженерии и создания биоискусственных органов. ПГА могут представлять большой интерес для клинической медицины в связи с их механической прочностью, высокой биосовместимостью и медленной биодеградацией [5, 6]. Возможно, что на роль материала для создания 3-хмерных структур для введения ММСК в организм лучше подходят биодеградируемые полимерные материалы на основе ПГА, позволяющие создавать матрицы любых форм, имеющие достаточно глубокие и разветвленные поры и не обладающие антагонизмом с живыми тканями. Однако необходимо отметить, что, согласно нашим данным, материалы из ПГА являются не биодеградируемыми, а биоинертными [7].

В связи с вышеизложенным была поставлена следующая **цель** исследования: в эксперименте на крысах изучить процессы, происходящие в различных тканях после имплантации полимерных пленок на основе ПГА с адсорбированными аутологичными мультипотентными мезенхимальными стволовыми клетками костномозгового происхождения (АМСККП).

### Материал и методы

Эксперименты проводили на самцах крыс инбредной линии Wag весом 180–200 г возрастом 6 месяцев. Все манипуляции с животными осуществляли под общим ингаляционным эфирным наркозом в условиях чистой операционной с соблюдением «Правил проведения

работ с использованием экспериментальных животных». На каждую точку исследования было использовано не менее 6 крыс.

ПГА (сополимер из 85% полигидроксибутирата и 15% гидроксивалериата) в виде пленки толщиной 20 мкм был предоставлен для исследования Институтом биофизики СО РАН (г. Красноярск).

АМСККП 2 пассажа, полученные от крысы указанной линии, трансфицировали ДНК плазмиды pEGFP-N1 (Clontech Laboratories Inc., USA), содержащей ген зеленого флуоресцентного белка GFP под контролем промотора цитомегаловируса и ген устойчивости к неомицину под контролем промотора вируса SV40, необходимого для последующей селекции с использованием дженетицина G418 (pEGFP-N1; Clontech Laboratories Inc., USA). Трансфекцию проводили в присутствии реагента для трансфекции TurboFect (Fermentas life sciences, Inc, Canada) согласно рекомендациям производителя, применяли протокол для трансфекции суспензионных клеток. Трансфекцию проводили, используя  $1 \times 10^6$  клеток в 1 мл суспензии, 4 мкг ДНК плазмиды и 10 мкл реагента для трансфекции (TurboFect).

Через 4 часа после трансфекции клетки разводили нетрансфицированными клетками в соотношении 1:2,5, соответственно, и использовали для введения экспериментальным животным. Оставшиеся после трансплантации клетки поддерживали в культуре в течение 1 месяца для оценки эффективности трансфекции и стабильности экспрессии введенного гена.

Экспрессию введенного гена GFP АМСККП крысы оценивали визуально под флуоресцентным микроскопом, непосредственно просматривая культуру или используя камеру Горяева для подсчета трансфицированных клеток через 48 часов после трансфекции. Эффективность трансфекции оценивали как процент светящихся клеток относительно всех клеток в камере Горяева. Процент трансфицированных клеток в разбавленной культуре составлял около 3%.

Как и в большинстве случаев, при использовании технологии, основанной на введении плазмидной ДНК, наблюдали только временную экспрессию введенного гена зеленого флуоресцентного белка в АМСККП крысы. Культивирование клеток, трансфицированных плазмидой pEGFP-N1 без селекции (не использовали дженетицин (G418, Sigma, USA)) показало снижение количества клеток, синтезирующих зеленый флуоресцентный белок, вследствие их вытеснения нетрансфицированными клетками. Но даже спустя 1 неделю в

культуре трансфицированных клеток 1 пассажа, высеянных из плотности 5000 клеток на 1 см<sup>2</sup>, наблюдали клетки, синтезирующие зеленый флуоресцентный белок.

**Имплантация в брюшную полость.** После обработки кожи животных спиртом производили разрез по срединной линии живота (лапаротомия) длиной 2-3 см. На расстоянии не менее 2 см от разреза справа со стороны брюшной полости к передней ее стенке (со стороны париетальной брюшины) фиксировали одним узловым швом (капрофил; Джонсон и Джонсон, США) ПГА в виде диска диаметром 1 см (отсутствие острых углов) с пассивно адсорбированными АММСККП или без клеток.

**Подкожная имплантация.** Производили разрез кожи в области шеи сзади от основания черепа до лопаток длиной 1-2 см. Тупым способом (сомкнутым зажимом) формировали слепой канал длиной 1,5-2 см над правой лопаткой. В данном канале располагали ПГА такого же размера, как и при имплантации в брюшную полость, и также с клетками или без них.

**Внутримышечная имплантация.** Разрез кожи в области передненаружной поверхности левого бедра длиной 1 см. Тупым способом (бранша пинцета) разделяли волокна мышц бедра, куда помещали пленку из ПГА размером в 4 раза меньше (диски из пленок диаметром 1 см перед внутримышечной имплантацией делили ножницами на 4 сектора) с АММСККП или без них.

Все имплантированные материалы были стерильными. ПГА до адсорбции АММСККП стерилизовали замоченными в забуференном физиологическом растворе для культур клеток в автоклаве при 120°C, давлении в 1 атмосферу в течение 20 минут.

Послеоперационные раны ушивали непрерывными швами, кожу и кожные швы обрабатывали спиртом. Воспалительных осложнений в месте послеоперационных швов не было обнаружено.

Спустя 4, 12 и 18 суток после операции имплантированные материалы биоптировали вместе с окружающими тканями, фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере (рН 7,4) не менее 24 часов, обезживали в серии этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в парафин. Неокрашенные срезы толщиной 5-7 мкм изучали на световом микроскопе Axioimager M1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении до 1200 раз в режиме люминесценции с фильтром Alexa 488. Кроме того, срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван Гизону и по Романовскому, изучали в

проходящем свете на указанном микроскопе.

Для исследования объемной плотности сосудов в грануляциях на срезе применяли квадратную тестовую систему, совмещающую на экране компьютера с изображением, полученным при помощи цифровой видеокамеры микроскопа. При использовании объектива с увеличением  $\times 10$  конечная площадь тестового квадрата была равна 3600 мкм<sup>2</sup> (сторона квадрата 60 мкм). С каждого среза проводили 3-5 измерений.

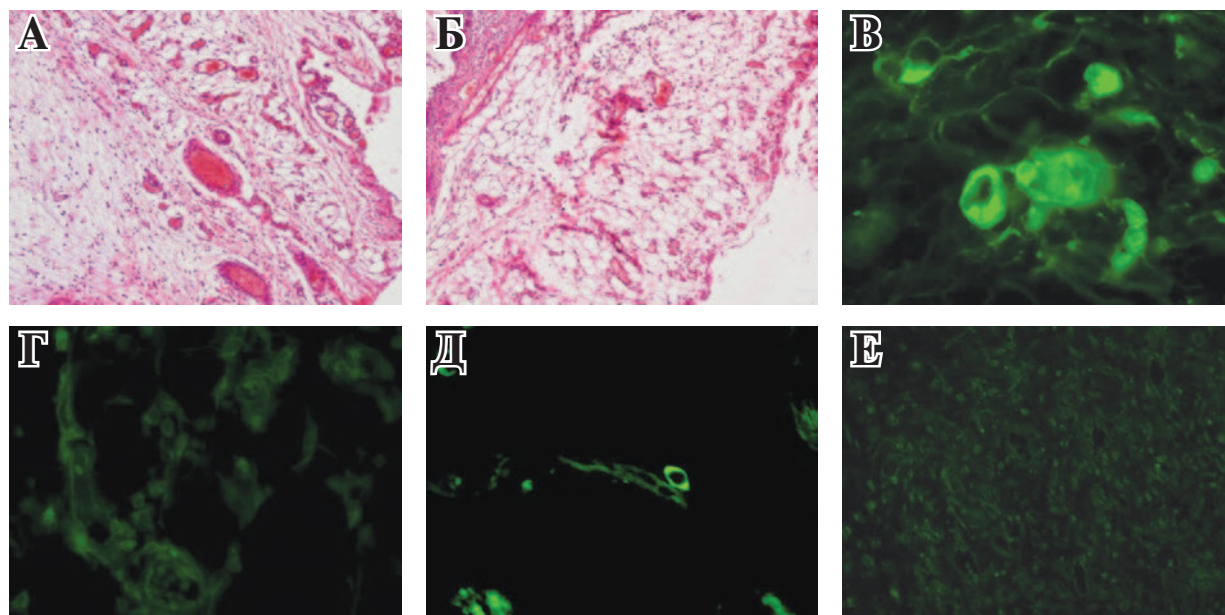
Вариационные ряды обрабатывали на прикладной статистической программе MS Excel 7.0 (Microsoft, USA), определяли среднее арифметическое и ошибку среднего арифметического ( $M \pm m$ ). Достоверность различий сравниваемых средних величин определяли на основании критерия Стьюдента для заданного порога вероятности безошибочных прогнозов. Достоверным считали различие между сравниваемыми рядами с уровнем доверительной вероятности 95% и выше. Если  $p \leq 0,05$ , то это означало, что ряды совпадают на 95% на уровне доверительной вероятности. При расчетах учитывали, что распределение исследуемых признаков было близким к нормальному.

## Результаты

Через 4 суток после операции во всех тканях вокруг пленок из ПГА были найдены грануляции и явления острого воспалительного процесса, причем среди лейкоцитов, инфильтрирующих ткани, было очень много сегментоядерных нейтрофилов (рис. 1 А, Б). Обращает на себя внимание большая в 2,4 раза объемная плотность сосудов на срезах грануляций после имплантации полимера с АММСККП ( $11,4 \pm 1,33\%$  вокруг ПГА с АММСККП против  $4,72 \pm 1,18\%$  от площади среза грануляций вокруг полимера без АММСККП,  $p < 0,05$ ). Сами пленки были деформированы.

При исследовании неокрашенных срезов ПГА с окружающими тканями (брюшная полость и подкожно-жировая клетчатка) в отраженном ультрафиолетовом свете были найдены ярко светящиеся отдельные клетки, цепочки из них и небольшие кольцевые структуры (рис. 1 В, Г).

Однако при имплантации полимера в мышечную ткань были обнаружены только единичные клетки с ярко светящейся цитоплазмой и темным ядром (рис. 1 Д, Е). Следует отметить, что внутримышечное введение ПГА сопровождалось миграцией имплантатов: Во всех случаях (6 животных) инородное тело было найдено под кожей различных отделов



**Рис. 1.** Морфологические результаты имплантации пленок из ПГА с адсорбированными АММСККП через 4 суток в эксперименте.

**А** – большое число различных по размерам кровеносных сосудов в рыхлой волокнистой соединительной ткани после имплантации ПГА с адсорбированными АММСККП в подкожно-жировую клетчатку. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 200$

**Б** – грануляции из рыхлой волокнистой соединительной ткани с небольшим числом кровеносных сосудов вокруг имплантированного ПГА без клеток в подкожно-жировой клетчатке. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 200$

**В** – на неокрашенном срезе подкожно-жировой клетчатки после имплантации ПГА с АММСККП присутствуют отдельные светящиеся клетки, цепочки светящихся клеточных элементов и кольцевидные структуры. Ув.  $\times 800$

**Г** – неокрашенный срез подкожно-жировой клетчатки после имплантации ПГА без стволовых клеток. Ярко светящиеся объекты отсутствуют. Ув.  $\times 600$

**Д** – в мышечной ткани после внедрения ПГА с АММСККП имеются только отдельные клетки с ярким свечением цитоплазмы и темным крупным овальным ядром. Ув.  $\times 600$ . **Е** – после имплантации ПГА без стволовых клеток в мышечную ткань ярко светящиеся объекты отсутствуют. Ув.  $\times 400$

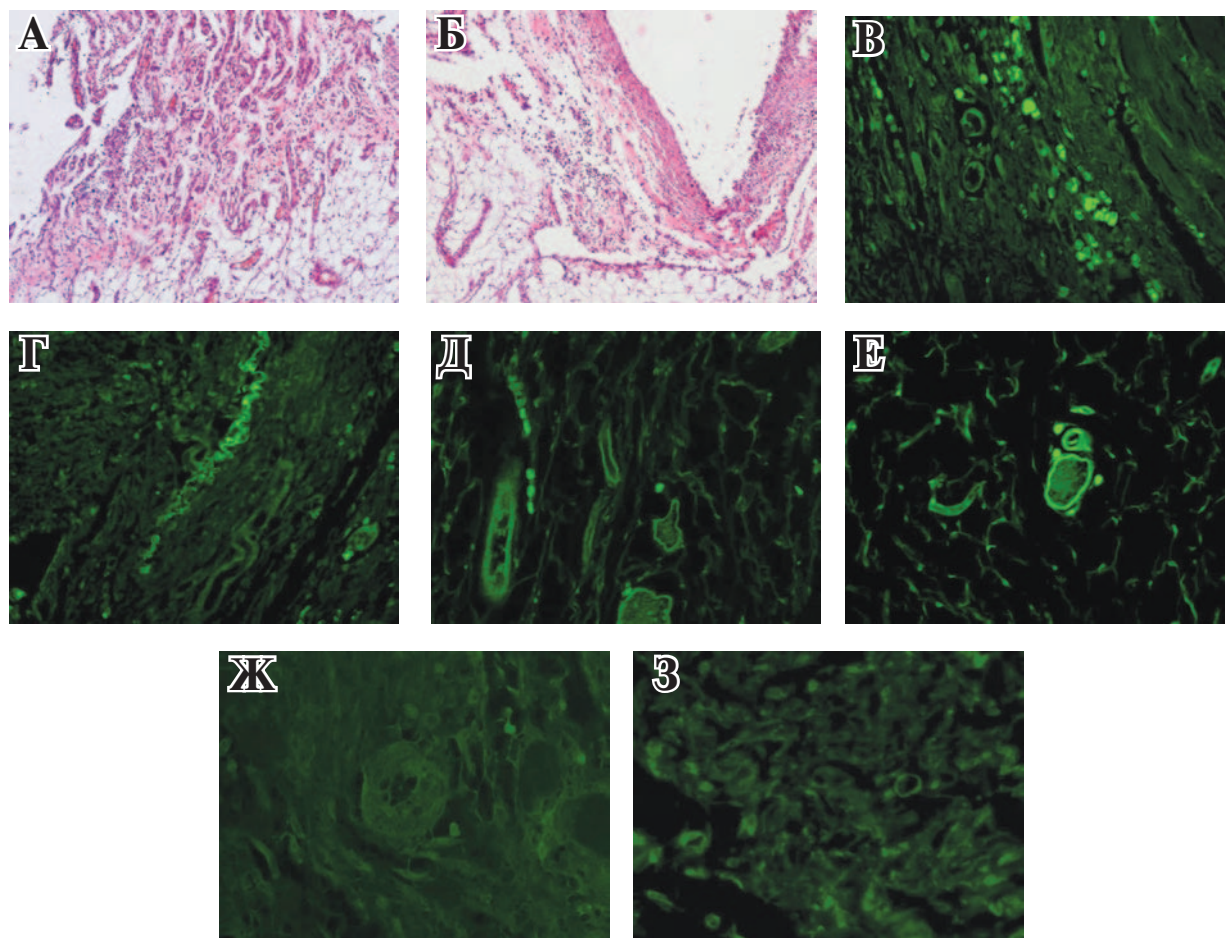
бедр и даже паховой области. Видимо, это связано с сокращением мышц (выдавливание полимерной пленки из ПГА) при движениях животного. В литературе также присутствует множество сообщений о спонтанных смещениях, перемещениях, ротации и элиминации трансплантированных объектов [8].

В некоторых случаях к 12 дню имплантаты были окружены толстой капсулой из плотной волокнистой соединительной ткани. К этому сроку в таких капсулах уже присутствовали признаки фиброзирования и крупные многоядерные макрофаги со слившейся цитоплазмой (гигантские клетки инородных тел). Однако значительно чаще вокруг имплантатов была отмечена выраженная лейкоцитарная (лимфоцитарно-макрофагальная) инфильтрация тканей, грануляции и геморрагии. Пленки были еще более деформированы капсулой, в отдельных наблюдениях даже свернуты в кольцо, и иногда была отмечена фрагментация полимера на 2 и больше частей. Толщина капсулы и

грануляций, а также объемная плотность сосудов в грануляциях были значительно больше на фоне введения ПГА с адсорбированными АММСККП. Капсула была шире в 2,4 раза ( $171 \pm 49,3$  мкм при использовании АММСККП против  $404 \pm 97,7$  мкм после имплантации полимера без клеток,  $p < 0,05$ ), слой грануляций – в 3 раза ( $113 \pm 54,4$  мкм против  $338 \pm 96,8$  мкм,  $p < 0,05$ ), относительная площадь сосудов на срезе грануляций больше в 5 раз ( $20,6 \pm 2,81\%$  против  $4,11 \pm 1,18\%$ ,  $p < 0,05$ ) (рис. 2 А, Б).

На неокрашенных срезах тканей вокруг полимерных пленок присутствовали большие группы и цепочки светящихся клеток и отмечено уже четкое формирование молодых извитых кровеносных сосудов со светящимися оболочками (рис. 2 В, Г, Ж).

Образование еще более толстой фиброзной капсулы со склерозом окружающих тканей и развитием гранул инородного тела было отмечено спустя 18 суток после имплантации ПГА. В толще подобных капсул всегда при-



**Рис. 2.** Результаты микроскопического изучения полимера на основе ПГА с адсорбированными АММСККП после имплантации в брюшную полость крыс.

**А** – большой массив грануляций со значительным числом кровеносных сосудов и признаками развития грубоволокнистой и фиброзной ткани вокруг имплантированного ПГА с адсорбированными АММСККП через 12 суток после операции. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 200$

**Б** – капсула из грубоволокнистой соединительной ткани с признаками фиброобразования и практически без грануляций в окружающих тканях после внедрения ПГА без клеток спустя 12 суток после имплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 200$

**В** – большие группы и цепочки ярко светящихся клеток в окружающих ПГА тканях через 12 суток после его имплантации с адсорбированными АММСККП. Ув.  $\times 300$

**Г** – яркое свечение оболочек извитого сосуда капиллярного типа тканях спустя 12 суток после внедрения ПГА с АММСККП. Ув.  $\times 300$

**Д** – небольшие цепочки клеток, светящихся незначительно ярче фона через 18 суток после имплантации ПГА с адсорбированными АММСККП. Ув.  $\times 300$

**Е** – единичные крупные сосуды со светящимися стенками спустя 18 суток после внедрения ПГА с АММСККП. Ув.  $\times 300$

**Ж** – отсутствие светящихся объектов в тканях вокруг ПГА, имплантированного без стволовых клеток, на 12 день после операции. Ув.  $\times 600$

**З** – через 18 суток после операции в тканях вокруг ПГА, внедренного без стволовых клеток, ярко светящихся объектов нет. Ув.  $\times 600$

существовали участки геморрагий, в основном, по краю имплантатов, а также были признаки умеренной гранулематозной реакции с формированием гигантских клеток инородных тел, видимо, для лизиса мелких фрагментов ПГА. Полимерные пленки были деформированы капсулой сильнее, часто происходило переламывание и фрагментация ПГА с образованием

частей, имеющих острые края. В единичных случаях были найдены обширные гранулемы инородного тела с толстой фиброзной капсулой вокруг, где происходило разрушение ПГА на мелкие фрагменты, окружение их компонентами соединительной ткани и поглощение макрофагами со слившейся цитоплазмой (гигантскими клетками инородных тел).

На данный срок только в стенке некоторых кровеносных сосудов было отмечено слабое свечение, практически на уровне фона, также значительно уменьшилась численность отдельных светящихся клеток и длина цепочек, сформированных такими клеточными элементами (рис. 2 Д, Е, З).

### Обсуждение

Формирование соединительнотканной капсулы вокруг имплантированного материала обусловлено реакцией организма на инородное тело — это процесс заживления, процесс очень длительный из-за физического присутствия имплантата.

Отмечают идентичную последовательность реакций организма на введение чужеродного материала, хотя их выраженность является величиной переменной. Первоначально стимулируется система свертывания крови и происходит активация тромбоцитов. Через несколько минут происходит накопление лейкоцитов для нейтрализации инородного тела. Фагоциты не могут быстро разрушить материал имплантата, образуется макрофагальный вал, отграничивающий имплантат от окружающих тканей. Если нет гиперреактивности, фибробласты формируют гранулему и изнутри от макрофагов окружают имплантат соединительной тканью [7].

ПГА в организме, как и любое инородное тело, сразу покрывается фибрином, несколько позже отграничивается валом из лейкоцитов: сначала нейтрофилов и лимфоцитов, далее эти клетки, при отсутствии инфекции, заменяются моноцитами и макрофагами и постепенно туда мигрируют фибробласты, дифференцируются в фиброциты и продуцируют коллаген. Далее инородное тело покрывается соединительнотканной капсулой из грубоволокнистой или фиброзной ткани, к 18 суткам эксперимента уже наблюдали хорошо сформированную соединительнотканную капсулу с признаками фиброизирования. То есть начинается и продолжается асептическая воспалительная реакция, индуцируемая инородным телом.

Процесс имплантации и процесс интеграции полимерной пленки в организм сопровождается воспалением, обусловленным альтерацией и репарацией тканей и формированием соединительнотканной капсулы, что, в свою очередь, приводит к развитию и инволюции грануляционной ткани. Грануляции характеризуются наличием большого числа кровеносных сосудов, которые развиваются как вследствие разрастания уже существующих сосудов, так и роста новых, обусловленных миграцией

клеток-предшественников эндотелиоцитов и перицитов, имеющих костномозговое происхождение [9, 10].

После внедрения в подкожную клетчатку полимера вместе с адсорбированными АММСККП было найдено увеличение объемной плотности кровеносных сосудов в грануляциях, больший объем самих грануляций и большая толщина фиброзной капсулы, формирующейся вокруг инородного тела (рис. 1 А, Б; 2 А, Б).

Доказательством того, что сосуды в грануляциях были сформированы именно в результате введения АММСККП и из них, является свечение стенки этих сосудов (рис. 1 В, Д; 2 В-Е). Ген GFP, введенный в ДНК АММСККП, неизменным передается дочерним клеткам и клеткам следующих поколений. Эти клетки и структуры, сформированные из них, точно также светятся в отраженном ультрафиолетовом свете. В случае имплантации ПГА без клеток объекты с ярким свечением в окружающих тканях отсутствуют (рис. 1 Г, Е; 2 Ж, З).

Свечение оболочек сосудов, обнаруженное в наших исследованиях (рис. 1 В, Д; 2 В-Е), указывает на то, что именно введенные АММСККП прямо, а не опосредованно (через цитокины или другие клеточные сигналы), участвуют в формировании сосудов, возможно, из-за присутствия мультипотентных клеток, уже стимулированных к дифференцировке в эндотелиоцитарном или перицитарном направлении. Также не исключено, что гипоксия тканей в результате воспаления или перекрестки структур вместе с сосудами стимулирует дифференцирование введенных АММСККП в эндотелиоциты [11].

Кроме этого, присутствие в стенке сосудов очень ярких светящихся объектов (рис. 1 В, Д; 2 В-Е) указывает, что в данном случае введенные АММСККП, не мигрируют из места инъекции, не разрушаются и не служат только «строительным материалом» или «сигналом» к началу ангиогенеза для собственных клеток организма-донора. Во всех этих случаях, конечно, возможен выход из разрушенных АММСККП светящегося белка и трансфицированного гена GFP и поглощение их соседними клетками. Однако, белки и фрагменты ДНК, попавшие в клетки в результате фагоцитоза или пиноцитоза, подвергаются деградации с потерей способности к люминисценции и встраиванию в геном. То есть при разрушении введенных АММСККП свечение должно быть минимальным (выход светящегося белка GFP из АММСККП) и очень быстро полностью исчезнуть, тем более в данном случае не

должно быть четко очерченных и ограниченных светящихся структур.

По-видимому, имплантация ПГА с АММСККП ускоряет процесс ангиогенеза при развитии грануляций за счет привнесения в место повреждения тканей (операция и процессы отграничения инородного тела) клеточных элементов, способных к дифференцировке в любом, в том числе эндотелиоцитарном и перицитарном, направлениях. Не исключено, что нарушения микроциркуляции при воспалении (прямое повреждение сосудов, пережатие сосудов инородным телом, отек, тромбозы и пр.) и соответствующая гипоксия вызывают направленную дифференцировку введенных АММСККП в направлении клеток-предшественников эндотелиоцитов и перицитов. Таким образом экономится время на миграцию собственных стволовых клеток. А ускорение роста сосудов приводит к улучшению оксигенации поврежденных тканей и способствует миграции лейкоцитов в участок воспаления для более быстрого и успешного лизиса тканевого и клеточного детрита.

В литературе имеются данные, что применение ММСК способствует ангиогенезу [12, 13, 14], гипоксия тканей *in vivo* и клеток *in vitro* стимулирует этот процесс [11].

Уменьшение со временем интенсивности свечения в сосудах после введения АММСККП (рис. 2 Д, Е), видимо, объясняется постепенным восстановлением генома трансфицированных клеток или вытеснением собственными клетками пусть и аутологичных, но все-таки взятых у другой особи клеток костного мозга.

Необходимо обратить внимание, что и при культивировании клеток, трансфицированных плазмидой pEGFP-N1, без селекции было показано снижение количества объектов, синтезирующих зеленый флуоресцентный белок, вследствие их вытеснения нетрансфицированными клетками.

Возможно, что в случае острой воспалительной реакции с небольшим объемом поврежденной ткани применение АММСККП и связанные с этим ангиогенез и быстрое развитие грануляций приведет к более быстрому очищению тканей от детрита. Однако в случае имплантации синтетических биоинертных материалов (согласно нашим данным, материалы из ПГА являются именно такими [7]) активное формирование сосудов рядом с полимером приводит к большему объему грануляций (рис. 1 А, Б; 2 А, Б), которые в дальнейшем способствуют формированию более толстой капсулы вокруг инородного тела.

Следует отметить, что высокая активность воспаления, формирование толстой капсулы с признаками фиброобразования после имплантации ПГА с АММСККП, скорее всего, являются неблагоприятными прогностическими признаками, указывающими на более высокую вероятность развития в дальнейшем различных осложнений [15].

## Выводы

1. После имплантации ПГА с адсорбированными АММСККП в окружающих тканях происходит увеличение числа сосудов за счет процессов неоангиогенеза. В данном случае АММСККП не мигрируют и не разрушаются в месте введения, а формируют кровеносные сосуды за счет дифференцировки в клетки их структур.

2. Имплантация ПГА с АММСККП приводит к образованию большего числа кровеносных сосудов в грануляциях, формирующихся вокруг имплантированного инородного тела, большему объему самих грануляций и более толстой капсулы, отграничивающей в дальнейшем полимер.

**Работа выполнена при финансовой поддержке программы *Фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (проект № 5.18 «Разработка технологий применения биodeградируемых полимеров на основе полигидроксиалканоатов в качестве матрицы для доставки стволовых клеток в организм»).***

## ЛИТЕРАТУРА

1. Enhancement of *in vivo* bone regeneration efficacy of osteogenically undifferentiated human cord blood mesenchymal stem cells / J. M. Kang [et al.] // *J Biomed Mater Res A*. – 2010 May. – Vol. 93, N 2. – P. 666–72.
2. Repairing defects of rabbit articular cartilage and subchondral bone with biphasic scaffold combined bone marrow stromal stem cells / M. Liu [et al.] // *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. – 2010 Jan. – Vol. 24, N 1. – P. 87–93.
3. Articular cartilage tissue engineering based on a mechano-active scaffold made of poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone): *In vivo* performance in adult rabbits / J. Xie [et al.] // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. – 2010 Jul. – Vol. 94, N 1. – P. 80–88.
4. Re'em T. The effect of immobilized RGD peptide in macroporous alginate scaffolds on TGFbeta1-induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cells / T. Re'em, O. Tsur-Gang, S. Cohen // *Biomaterials*. – 2010 Sep. – Vol. 31, N 26. – P. 6746–55.
5. Реакция тканей на имплантацию микрочастиц из резорбируемых полимеров при внутримышечном введении / Е. И. Шишацкая // *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. – 2007. – Т. 144, № 12. – С.

635–39.

6. Biocompatibility of polyhydroxybutyrate microspheres: in vitro and in vivo evaluation / E. I. Shishatskaya [et al.] // *J Mater Sci Mater Med.* – 2008 Jun. – Vol. 19, N 6. – P. 2493–502.

7. Особенности реакции тканей крыс на внутрибрюшинные имплантаты из биodeградируемого полигидроксиалканата / И. В. Майбородин [и др.] // *Морфология.* – 2011. – Т. 139, № 2. – С. 62–66.

8. Baeke J. L. Breast deformity caused by anatomical or teardrop implant rotation / J. L. Baeke // *Plast Reconstr Surg.* – 2002 Jun. – Vol. 109, N 7. – P. 2555–64.

9. Carmeliet P. The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis / P. Carmeliet, A. Luttun // *Thromb Haemost.* – 2001 Jul. – Vol. 86, N 1. – P. 289–97.

10. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells / Q. Shi [et al.] // *Blood.* – 1998 Jul. – Vol. 92, N 2. – P. 362–67.

11. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis / X. Hu [et al.] // *J Thorac Cardiovasc Surg.* – 2008 Apr. – Vol. 135, N 4. – P. 799–808.

12. Ангиогенез в рубце матки крыс после введения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения / И. В. Майборо-

дин [и др.] // *Бюл. Эксперим. биологии и медицины.* – 2010. – Т. 150, № 12. – С. 705–11.

13. Морфологический анализ результатов введения аутологичных стволовых стромальных клеток костномозгового происхождения в рубец матки крыс / И. В. Майбородин [и др.] // *Морфология.* – 2010. – Т. 138, № 6. – С. 47–55.

14. Fabrication of vascularized bone grafts of predetermined shape with hydroxyapatite-collagen gel beads and autogenous mesenchymal stem cell composites / S. H. Chang [et al.] // *Reconstr Surg.* – 2010 May. – Vol. 125, N 5. – P. 1393–402.

15. Rouanet P. Cancer update on breast reconstruction / P. Rouanet, M. Duchene, F. Quenet // *Bull Cancer.* – 2002 Jan. – Vol. 89, N 1. – P. 125–29.

#### Адрес для корреспонденции

630090, Российская Федерация,  
г. Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, д. 8,  
Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины СО РАН,  
Центр новых медицинских технологий,  
лаборатория стволовой клетки,  
тел. моб.: +7 913 753-07-67,  
e-mail: imai@mail.ru,  
Майбородин Игорь Валентинович

#### Сведения об авторах

Майбородин И.В., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории стволовой клетки Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

Шевела А.И., д.м.н., профессор, Заслуженный врач РФ, заместитель директора Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по науке, г. Новосибирск.

Матвеева В.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории стволовой клетки Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

Дровосеков М.Н., к.м.н., докторант лаборатории стволовой клетки Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

Баранник М.И., к.м.н., докторант лаборатории стволовой клетки Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

Кузнецова И.В., к.м.н., научный сотрудник лаборатории стволовой клетки Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

*Поступила 27.11.2012 г.*