

ПОЛИМЕРНЫЕ, БИООРГАНИЧЕСКИЕ И ГИБРИДНЫЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ

УДК 57.085.23+677.494+66.022.6

ВЛИЯНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК И НАПОЛНЕНИЯ ПОЛИЛАКТИДНЫХ МАТРИКСОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК ЛИНИИ НЕК293Т

© 2024 г. А. М. Азиева^{1,*}, Д. А. Кириллова¹, Е. В. Ястремский², Р. В. Шариков¹,
Н. А. Шарикова¹, К. Г. Антипова¹, Т. Е. Григорьев¹, А. Л. Васильев^{1,2}

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова Курчатовского комплекса кристаллографии и фотоники НИЦ
“Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: asya.azieva@gmail.com

Поступила в редакцию 07.12.2023 г.

После доработки 07.12.2023 г.

Принята к публикации 01.02.2024 г.

Адгезия, пролиферация, дифференцировка и другие виды взаимодействия клеточной культуры с синтетическими биосовместимыми матриксами полностью зависят от типа клеток, а также от структуры, наполнения и поверхности самого матрикса. Представлены результаты исследования пролиферации клеток НЕК293Т на полилактидных матриксах различной архитектуры. Получена оценка скорости пролиферации клеток для ориентированных и неориентированных губчатых и нетканых волокнистых матриксов, а также композитных полилактидных матриксов с коллагеном и хитозаном.

DOI: 10.56304/S1992722324601472

ВВЕДЕНИЕ

Широкое использование имплантатов на основе искусственных синтетических материалов в регенеративной медицине делает разработки в области тканевой инженерии особенно актуальными. Синтетические полимерные матриксы доказали свою эффективность благодаря простоте получения, прочности и высокой степени растяжения [1]. Основными требованиями к таким матриксам являются биосовместимость, биодegradация и высокая клеточная адгезия, которые способствуют пролиферации, дифференцировке и формированию замещенной ткани [1]. В настоящее время для этих целей предложено множество синтетических полимеров, в том числе полистирол, полилактид (PLA), полигликолевая кислота и полилактид-гликолевая кислота [2–4].

Взаимодействие клеточной культуры с поверхностью матрикса полностью зависит от типа клеток [5]: большим нейрональным клеткам может потребоваться поверхность с крупной шероховатостью [6], тогда как мелким эндотелиальным клеткам — с наноразмерной [7].

Эксперименты по регенерации тканей [8] продемонстрировали хорошую биосовместимость матриксов из PLA, несмотря на гидрофобную природу соединения. Они разлагаются в тканях

организма до молочной кислоты путем гидролиза и метаболизируются до углекислого газа и воды. Проблема плохой смачиваемости поверхности матриксов, препятствующая адгезии клеток, может быть решена несколькими способами. Например, поверхность может быть предварительно обработана пептидами поли-D-лизина или полиэтиленimina, которые придают положительный поверхностный заряд и способствуют адгезии клеток [9].

К методам перманентной модификации матриксов относится комбинирование PLA с натуральными волокнами, такими как коллаген или хитозан, которые способствуют улучшению биосовместимости и регуляции физико-химических свойств поверхности. Поскольку клеточная мембрана отрицательно заряжена [10], для улучшения адгезии клеток, как правило, необходимы материалы, несущие положительный заряд [11]. Объемная модификация путем сополимеризации мономера гидроксильной кислоты с молекулами, содержащими гидрофильные или заряженные группы, также улучшает свойства поверхности и адгезию клеток [12].

В настоящей работе представлено исследование влияния поверхности матрикса на пролиферацию клеток эмбриональной почки человека НЕК293Т (Human Embryonic Kidney 293T). Клет-

ки данной линии делятся примерно 1 раз в 10 ч, достаточно хорошо изучены, просты в культивировании и в норме обладают хорошей выживаемостью [13]. Проведена оценка скорости пролиферации клеток линии НЕК293Т на PLA-матриксах различных типов: ориентированных и неориентированных губчатых, ориентированных и неориентированных нетканых волокнистых, а также композитных материалах с коллагеном и хитозаном.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление и обработка матриц. Для получения образцов с различной морфологией использовали полилактид марки 4032D (Nature-Works, США). В качестве растворителей использовали диоксан (ЧДА, “Компонент-Реактив”), хлороформ и этиловый спирт (ХЧ, “Компонент-Реактив”), уксусную кислоту (ледяная, “Компонент-Реактив”). Пропитывали материалы из PLA растворами хитозана (Primex ChitoClear 43040, Iceland) и коллагена (Белкозин, Россия).

Для получения губчатых материалов PLA растворяли в диоксане при постоянном перемешивании на магнитной мешалке в течение 24 ч. Концентрация раствора составила 3 мас. %. Для получения неориентированных губок раствор замораживали при температуре -22°C в рефрижераторе и для равномерного распределения кристаллов растворителя раствор перемешивали 1 раз в процессе заморозки. Для получения вертикально ориентированной структуры губок растворы подвергали однонаправленной заморозке в жидком азоте. Далее образцы лиофилизировали в течение 48 ч на установке Martin Christ Alpha 2-4LSC.

Для пропитывания всех образцов готовили раствор хитозана (0.5 мас. %) и раствор коллагена (0.25 мас. %) в 2%-ном водном растворе уксусной кислоты. Перед пропитыванием каждый образец погружали в этиловый спирт на 15 мин, затем промывали дистиллированной водой.

Губчатые неориентированные материалы пропитывали, используя вакуумную установку с мембраной. Растворы хитозана или коллагена пропускали через губки, затем губки помещали на 12 ч в соответствующие растворы полимеров. Образцы замораживали в рефрижераторе.

Ориентированные губчатые материалы пропитывали по стандартной методике: 24 ч выдерживали в растворе биополимера, затем извлекали и удаляли излишки раствора фильтровальной бумагой. Затем образцы замораживали в жидком азоте в условиях градиента температуры.

Нетканые материалы получали методом электроформования из раствора PLA (концентрация 9 мас. %) в смеси растворителей: хлороформа и этилового спирта (90 : 10). Электроформование проводили на установке, разработанной в НИЦ “Курчатовский институт”, при комнатной температуре и следующих технологических параметрах: прикладываемое напряжение 12 ± 1 кВ, расстояние между капилляром и осадительным электродом 25 ± 1 см, объемный расход полимерного раствора 5 мл/ч. Характерный геометрический размер нетканого волокнистого материала составлял 50×50 мм при толщине 550 ± 50 мкм.

Далее все образцы лиофилизировали в течение 48 ч, сушили в вакуумном шкафу в течение суток для удаления остатков растворителя.

Сшивку материалов, пропитанных хитозаном и коллагеном, проводили в парах глутарового альдегида. Водный раствор глутарового альдегида концентрацией 25 мас. % помещали в эксикатор с образцами на 30 мин.

Культивирование клеток линии НЕК293Т. Клетки линии НЕК293Т высаживали на предварительно обработанные в течение 20 мин полиэтиленмином (концентрация 0.05%) поверхности матриц различного типа, помещенные в чашки Петри, из расчета 375 000 клеток на 1 см^2 поверхности.

Клетки культивировали в течение двух суток в 2 мл среды DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium, GIBCO), содержащей 10% сыворотки FBS (fetal bovine serum, Sigma), 2мМ добавки Gluta-Max-I (GIBCO) и пенициллин-стрептомицин (Life Technologies), в инкубаторе GALAXY 170S (New Brunswick Scientific) при постоянных условиях: температуре 37°C , 100%-ной влажности и содержании 5% CO_2 в воздухе.

Через двое суток для получения изображений поверхности матрицы отмывали от культуральной среды и фиксировали с помощью 4%-ного параформальдегида (Sigma P6148) в течение 7–10 мин. После фиксации клетки отмывали 3 раза в течение 5 мин в однократном растворе PBS (Invitrogen 70011036). Далее поверхность образцов матриц с фиксированными нейронами на поверхности изучали с помощью флуоресцентной микроскопии. После фиксации ядра клеток окрашивали с помощью ДНК-специфического маркера Hoechst 33342 Solution (Thermo Scientific™ 62249) в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте, после чего клетки отмывали раствором PBS (Invitrogen 70011036) в течение 3–5 мин. Затем матрицы с клетками переносили на предметные стекла, покрывали водной заливоч-

Таблица 1. Подсчет количества клеток линии НЕК293Т на различных полилактидных матриксах: неориентированных губчатых (НГ), ориентированных губчатых (ОГ), неориентированных нетканых (НН) и ориентированных нетканых (ОН)

Количество клеток	НГ	НН	ОГ	ОН	НГк	ННк	ОГк	ОНк	НГх	ННх	ОГх	ОНх
При посадке	375000	375000	375000	375000	375000	375000	375000	375000	375000	375000	375000	375000
Через 2 сут	732000	517667	756466	744000	706667	715000	684000	744000	837333	688333	708000	763000
Прирост клеток, %	95.2	38.0	101.7	98.4	88.4	83.4	90.7	82.4	123.3	83.6	88.8	103.5

Примечание. Буквами “к” и “х” отмечены композитные материалы с коллагеном и хитозаном соответственно.

ной средой Fluoromount (Sigma F4680) и накрывали покровными стеклами.

Флуоресцентная микроскопия. Для исследования образцов методом флуоресцентной микроскопии использовали универсальный биологический микроскоп Carl Zeiss Axio Imager.Z1. Микрофотографии всех исследуемых образцов получали в одних и тех же условиях интенсивности возбуждающего света и экспозиции при использовании объектива 60 (увеличение ×600).

Оценка пролиферации. Для сравнения скорости пролиферации на разных матриксах использовали счетчик клеток Bio-Rad TC20 Automated Cell Counter [14]. Через двое суток после посадки матриксы с клетками переносили в новые чашки Петри, чтобы исключить из подсчета адгезированные на поверхности пластика клетки. Затем матриксы дважды промывали буфером PBS (Invitrogen 70011036), добавляли 1 мл 0.05%-ного трипсина (Invitrogen) и оставляли при 37°C на 3 мин. Далее весь объем матрикса с клетками перемещали в пробирку и центрифугировали 4 мин на 800 об./мин. Затем удаляли супернатант и ресуспендировали осадок в 100 мкл культуральной среды. После ресуспендирования отбирали 10 мкл и смешивали с 10 мкл трипанового синего (Bio-Rad), чтобы отделить живые клетки от мертвых, хорошо перемешивали и в количестве 10 мкл наносили на слайд (предметное стекло системы для автоматических счетчиков) [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 1 представлены результаты исследования пролиферации клеток линии НЕК293Т на различных PLA-матриксах: неориентированных губчатых (НГ), ориентированных губчатых (ОГ), неориентированных нетканых (НН) и ориентированных нетканых (ОН). Буквами “к” и “х” отмечены композитные материалы с коллагеном и хитозаном соответственно.

В ходе эксперимента по оценке пролиферации клеток линии НЕК293Т выявлено, что, за небольшим исключением, на обоих губчатых матриксах клетки делились в большем количестве по сравнению с неткаными матриксами.

Максимальное увеличение пролиферации клеток линии НЕК293Т наблюдали на композитном матриксе НГ с хитозаном (НГх). Обработка хитозаном привела к максимальному увеличению пролиферации клеток на неориентированном губчатом матриксе (НГх), а прирост клеток за двое суток составил 123.3%. Похожую картину наблюдали в отношении ориентированного нетканого матрикса с хитозаном (ОНх). Обработка хитозаном привела к значительному по сравнению с ОН и ОНк увеличению пролиферации, а прирост клеток за двое суток составил 103.5%.

Использование композитных матриксов с коллагеном не привело к максимальному увеличению пролиферации ни на одном из матриксов. Самую низкую пролиферацию клеток линии НЕК293Т наблюдали на всех типах неориентированных нетканых матриксов (НН, ННк, ННх), а в случае матрикса ОГ добавление композитных слоев не увеличило, а уменьшило пролиферацию.

Таким образом, использование матриксов на основе PLA с композитным слоем хитозана привело к максимальному увеличению пролиферации клеток линии НЕК293Т на самом пористом губчатом матриксе НГх на 123.3% и на матриксе с направленной ориентацией волокон ОНх на 103.5%.

Полученные результаты согласуются с данными по адгезии первичной нейрональной культуры [16].

Результаты исследования методом флуоресцентной микроскопии полностью подтвердили данные количественной оценки клеток линии НЕК293Т.

На рис. 1 представлены микрофотографии клеток линии НЕК293Т на полилактидных матриксах НГ, НН, ОГ, ОН (сверху), на композитных полилактидных матриксах с коллагеном:

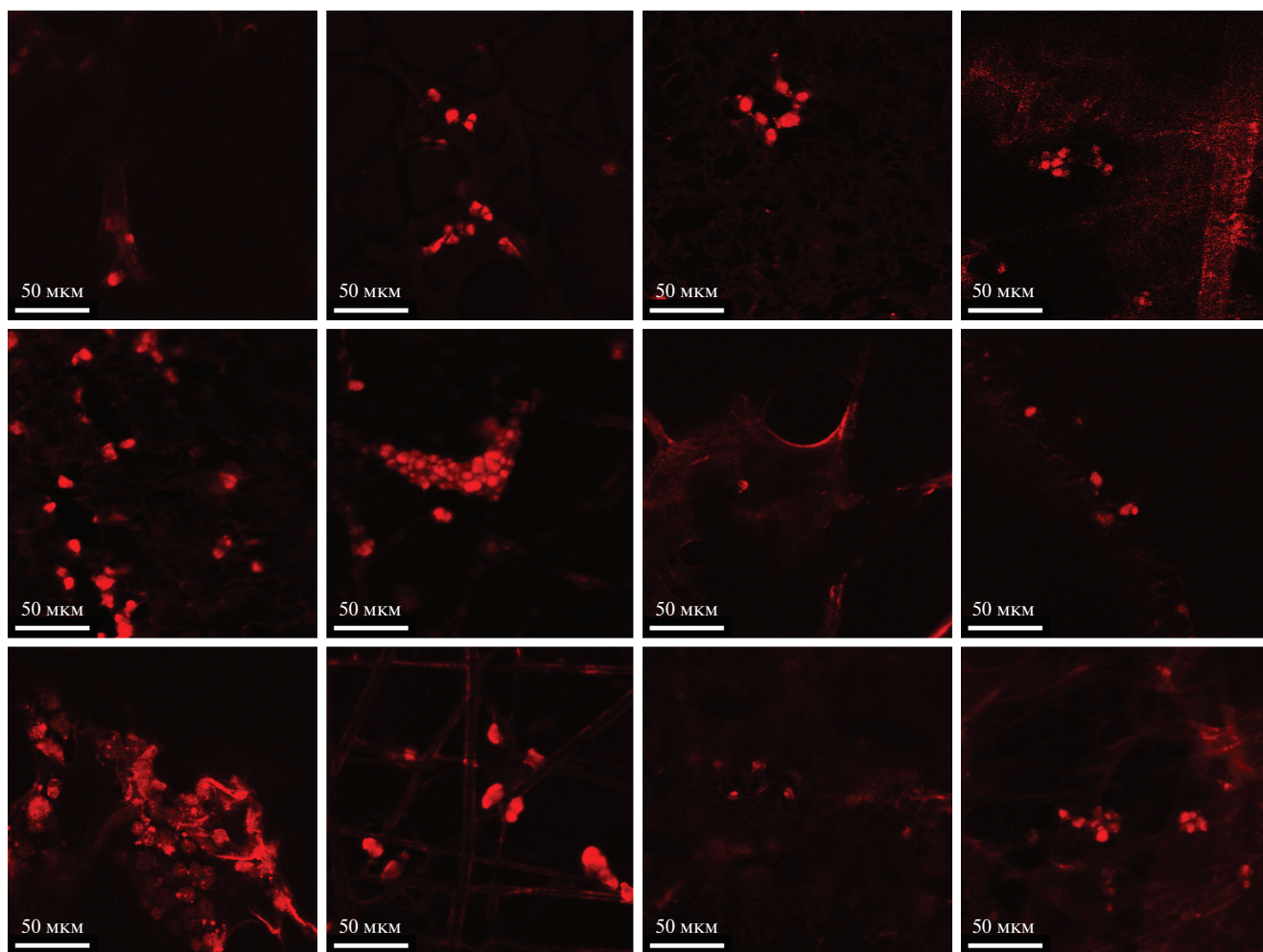


Рис. 1. Микрофотографии клеток линии HEK293T на PLA-матриксах НГ, НН, ОГ, ОН (сверху), на композитных PLA-матриксах с коллагеном: НГк, ННк, ОГк, ОНк (посередине) и на композитных PLA-матриксах с хитозаном: НГх, ННх, ОГх, ОНх (снизу).

НГк, ННк, ОГк, ОНк (посередине) и на композитных полилактидных матриксах с хитозаном: НГх, ННх, ОГх, ОНх (снизу).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в ходе эксперимента результаты демонстрируют зависимость скорости пролиферации от архитектуры, типа и наполнения PLA-матрикса. Показано, что на губчатых матриксах клетки делятся лучше, чем на нетканых. Обработка хитозаном приводит к увеличению пролиферации клеток линии HEK293T на матриксе НГх на 123.3% и на матриксе ОНх на 103.5%, тогда как обработка матриксов коллагеном не приводит к увеличению пролиферации. Минимальная пролиферация клеток наблюдалась на неориентированных нетканых матриксах (НН, ННк, ННх), а матрикс ОГ с композитными слоями продемон-

стрировал снижение пролиферации относительно исходного образца.

Таким образом, пролиферация клеток линии HEK293T значительно зависит от наполнения и поверхности PLA-матрикса. Полученные данные полностью согласуются с результатами флуоресцентной микроскопии, а также с полученными ранее данными по адгезии первичной нейрональной культуры.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-13-00321 “Деформационное поведение биоразлагаемых матриксов различного типа при механических нагрузках”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhang Y., Venkateswaran S., Higuera G.A. et al. // Adv. Healthc. Mater. 2020. V. 9 (4). P. 1901347. <https://doi.org/10.1002/adhm.201901347>

2. *Giordano G.G., Thomson R.C., Ishaug S.L. et al.* // J. Biomed. Mater. Res. 1997. V. 34. P. 87.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199701\)34:1<87::AID-JBM12>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199701)34:1<87::AID-JBM12>3.0.CO;2-M)
3. *Huang H.D., Xu J.Z., Fan Y. et al.* // J. Phys. Chem. 2013. V. 117. P. 10641.
<https://doi.org/10.1021/jp4055796>
4. *Huang W., Sunami Y., Kimura H., Zhang S.* // Nanomaterials. 2018. V. 8. P. 512.
<https://doi.org/10.3390/nano8070519>
5. *Bu Y., Ma J., Be J., Wang S.* // Front Bioeng. Biotechnol. 2019. V. 7. P. 98.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00098>
6. *Donoso M.G., Méndez-Vilas A., Bruque J.M., González-Martín M.L.* // Int. Biodeterior. Biodegradation. 2007. V. 59. № 3. P. 245.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.09.011>
7. *Chung T., Liu D., Wang S., Wang Sh.* // Biomaterials. 2003. V. 24. № 25. P. 4655.
[https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00361-2](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00361-2)
8. *Annunziata M., Nastri L., Cecoro G., Guida L.* // Molecules. 2017. V. 22. P. 2214.
<https://doi.org/10.3390/molecules22122214>
9. *Okamura Y., Kabata K., Kinoshita M. et al.* // Adv. Mater. 2009. V. 21. P. 4388.
<https://doi.org/10.1002/adma.200901035>
10. *Wen J., Weinhardt M., Lai B. et al.* // Biomaterials. 2016. V. 86. P. 42.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.067>
11. *Hoshiba T., Yoshikawa C., Sakakibara K.* // Langmuir. 2018. V. 34 (13). P. 4043.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00233>
12. *Amani A., Kabiri T., Shafiee S., Hamidi A.* // Iran J. Pharm. Res. 2019. V. 18. № 1. P. 125.
13. *Stepanenko A.A., Dmitrenko V.V.* // Gene. 2015. V. 569. № 2. P. 182.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.05.065>
14. *Gooskens S.L., Klasson T.D., Gremmels H. et al.* // Mol. Oncol. 2018. V. 12. № 2. P. 166.
<https://doi.org/10.1002/1878-0261.12149>
15. *Xie H., Heier C., Kien B. et al.* // Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids. 2020. V. 1865. № 9. P. 158737.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158737>
16. *Азиева А.М., Ястремский Е.В., Кириллова Д.А. и др.* // Кристаллография. 2023. Т. 68. № 6. С. 983.
<https://doi.org/10.1134/S1063774523600308>