

БИОТЕХ

**РОСТ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА СТРУКТУРИРОВАННЫХ
ПЛЕНКАХ БИОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА**

Воинова Вера Владимировна

*ст. науч. сотр., Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Биологический факультет,
РФ, г. Москва
E-mail: veravoynova@mail.ru*

Акулина Елизавета Александровна

*мл. науч. сотр., Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет,
РФ, г. Москва
E-mail: akoulinaliza@gmail.com*

Дудун Андрей Андреевич

*аспирант, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук, Институт биохимии им. А.Н. Баха,
РФ, г. Москва
E-mail: dudunandrey@mail.ru*

Жаркова Ирина Игоревна

*мл. науч. сотр., Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет,
РФ, г. Москва
E-mail: iblkr@mail.ru*

Меньших Ксения Андреевна

*студент-магистр, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Биологический факультет,
РФ, г. Москва
E-mail: kamenshikh@gmail.com*

Бонарцев Антон Павлович

*вед. науч. сотр., Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет,
РФ, г. Москва
E-mail: ant_bonar@mail.ru*

Чеснокова Дарьяна Владимировна

*студент-магистр, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Биологический факультет,
РФ, г. Москва
E-mail: daryana8@yandex.ru*

Махина Татьяна Константиновна

*науч. сотр., Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук, Институт биохимии им. А.Н. Баха,
РФ, г. Москва
E-mail: bonar@inbi.ras.ru*

Бонарцева Гарина Александровна

*ст. науч. сотр., Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук, Институт биохимии им. А.Н. Баха,
РФ, г. Москва
E-mail: bonar@inbi.ras.ru*

Чишанков Игнат Геннадьевич

*мл. науч. сотр., ГНУ «Институт химии новых материалов НАН Беларуси»
Республика Беларусь, г. Минск
E-mail: chishankov_ignat@mail.ru*

Жданко Тимофей Михайлович

*инженер, ГНУ «Институт химии новых материалов НАН Беларуси»
Республика Беларусь, г. Минск
E-mail: zhdankotimorfei@mail.ru*

Куликовская Виктория Игоревна

*зав. лаборатории, ГНУ «Институт химии новых материалов НАН Беларуси»
Республика Беларусь, г. Минск
E-mail: kulikouskaya@gmail.com*

Агабеков Владимир Енокович

*директор, ГНУ «Институт химии новых материалов НАН Беларуси»
Республика Беларусь, г. Минск
E-mail: ichnm@ichnm.basnet.by*

THE GROWTH OF MESENCHYMAL STEM CELLS ON THE STRUCTURED FILMS OF BIOSYNTHETIC POLY(3-HYDROXYBUTYRATE)

Vera Voinova

*senior researcher, M.V.Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
Russia, Moscow*

Elizaveta Akoulina

*junior researcher, M.V.Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
Russia, Moscow*

Andrey Dudun

*Ph.D. student, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
A.N. Bach Institute of Biochemistry,
Russia, Moscow*

Irina Zharkova

*junior researcher, M.V.Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
Russia, Moscow,*

Ksenia Menshikh

*student, M.V.Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
Russia, Moscow*

Anton Bonartsev

*leading researcher, M.V.Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
Russia, Moscow*

Dariana Chesnokova

*student, M.V.Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
Russia, Moscow*

Tatiana Makhina

*researcher, Ph.D. student, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
A.N. Bach Institute of Biochemistry,
Russia, Moscow*

Garina Bonartseva

*senior researcher, Ph.D. student, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
A.N. Bach Institute of Biochemistry,
Russia, Moscow*

Ihnat Chyshankou

junior researcher, State Scientific Institution "Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus", Belarus, Minsk

Tsimafei Zhdanko

engineer, State Scientific Institution "Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus", Belarus, Minsk

Viktoryia Kulikouskaya

head of laboratory, State Scientific Institution "Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus", Belarus, Minsk

Vladimir Agabekov

director, State Scientific Institution "Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus", Belarus, Minsk

АННОТАЦИЯ

Показана принципиальная возможность формирования на основе поли-3-оксибутирата микроструктурированных пленок методом «самоорганизации» микрокапель воды. Установлено, что морфология пленок зависит от концентрации полимера в растворе, изменяя которую можно формировать как сетчатые пленки с различным расположением и полидисперсностью пор, так и сплошные покрытия с располагающимися на их поверхности выступающими элементами. Полученные структуры могут представлять интерес для регулирования и исследования миграции, пролиферации и дифференцировки клеток разных типов для клеточной и тканевой инженерии.

ABSTRACT

The fundamental possibility of the formation of microstructured films based on poly(3-hydroxybutyrate) by the "self-assembly" water microdroplets technique has been shown. It has been found that the morphology of the films depends on the concentration of the polymer in the solution, changing which it is possible to form both honeycomb films with different locations and polydispersity of pores, and continuous coatings with protruding elements located on their surface. The obtained structures may be of interest for the regulation and study of migration, proliferation, and differentiation of different types of cells for cell and tissue engineering.

Ключевые слова: поли-3-оксибутират, микроструктурированные пленки, «самоорганизация» микрокапель воды, мезенхимальные стволовые клетки.

Keywords: poly(3-hydroxybutyrate), microstructured films, "self-assembly" water microdroplets, mesenchymal stem cells.

Введение.

Поли-3-оксибутират (ПОБ) является основным полимером гомологичного ряда полиоксисилканоатов (ПОА). ПОБ обладает способностью к биodeградации и высокой биосовместимостью по отношению к клеткам и тканям человека, что открывает перспективы для его медицинского применения в качестве материала для полимерных медицинских изделий и лекарственных форм в качестве альтернативы био-разлагаемым синтетическим термопластикам и другим полимерам медицинского назначения. В отличие от природных полимеров (хитозан, альгинат, декстран, коллаген и т. д.) и химически синтезированных полимеров, ПОБ и его сополимеры получают биотехнологическим путем, который позволяет задавать и контролировать в процессе биосинтеза физико-химические свойства биополимеров в узких пределах, а также достичь высокой степени их чистоты. ПОБ является частично кристаллическим полимером, что значительно влияет на его основные свойства: физико-термические, механические свой-

ства, скорость биodeградации, биосовместимость, а также нано- и микроструктуру изготавливаемых на его основе изделий. Кроме того, выяснилось, что этот полимер может обладать собственной биологической активностью. Так, он провоцирует дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в остеогенном направлении и обладает остеоиндуктивной активностью *in vivo*, что может быть связано с его надмолекулярной частично-кристаллической структурой [1].

Перспективными материалами для клеточной и тканевой инженерии являются полимерные микроструктурированные пленки, размер пор в которых соизмерим с размером клеток [6]. Известно [6], что изменяя размер пор можно регулировать рост клеток на таких сетчатых структурах. Перспективным подходом к созданию упорядоченных микросеток с гексагональной симметрией ячеек является их получение путем «самоорганизации» микрокапель воды в жидкой полимерной пленке [2]. Данный подход заключается в обработке жидкой полимерной плен-

ки, сформированной на какой-либо поверхности, влажным воздухом. Этот метод прост в практическом исполнении, не требует сложного и дорогостоящего оборудования и позволяет формировать полимерные структуры с регулируемым размером пор и степенью их упорядоченности.

Целью данной работы являлось получение пористых пленок на основе ПОБ методом «самоорганизации» микрокапель воды и исследование роста мезенхимальных стволовых клеток на полученных микроструктурированных пленках.

Методы.

ПОБ с заданной молекулярной массой получали с помощью метода контролируемого биосинтеза с использованием высокоэффективного штамма-продуцента ПОБ *Azotobacter chroococcum* 7Б. Для контроля молекулярной массы синтезируемого полимера в культуральную среду добавляли ее регулятор – ацетат натрия в концентрации 50 мМ. Культивирование *A. chroococcum* 7Б проводили в течение 72. Затем полимер выделяли и очищали в несколько стадий: экстракции хлороформом, фильтрации, осаждения изопропиловым спиртом, проведения нескольких циклов растворения и осаждения с последующим высушиванием.

Для определения молекулярной массы (ММ) полимера использовали метод капиллярной вискозиметрии, после чего по уравнению Марка-Хаувинка-Куна вычисляли ее значение. Физико-термические свойства полимера изучали при помощи метода дифференциальной сканирующей калориметрии, который позволял определить как температуры плавления и кристаллизации, так и теплоты плавления и кристаллизации. Температуру начала и максимума пика кристаллизации или плавления обозначали как $T_{пл.}^0$, $T_{пл.}^{пик}$ и $T_{кр.}^{пик}$, соответственно. Кристалличность ПОА (X_c) рассчитывали согласно:

$$X_c = \Delta H_m(ПОА) / \Delta H_m^0(ПОБ) \times 100\%,$$

где $\Delta H_m^0(ПОБ)$ – теоретическое значение термодинамической энтальпии плавления, которая составляет 146.6 Дж/г у 100% кристаллического ПОБ, а $\Delta H_m(ПОА)$ – экспериментальная энтальпия плавления для исследуемого образца ПОА.

Механические свойства ПОБ, а именно, модуль упругости Юнга (E) и параметр удлинения при разрыве измеряли при помощи универсального динамометра Инстрон (Zwick Roell, Германия). Гидрофильность ПОБ оценивали с помощью измерения контактного угла смачивания поверхности пленок полимера, с использованием цифрового угломера Contact Angle Meter 110 VAC (Cole-Parmer, США) [5].

Получение микроструктурированных сетчатых пленок ПОБ осуществлялось по ранее разработанной методике [3]. Для этого каплю раствора полимера в хлороформе наносили на поверхность кремниевой подложки. Через 5–10 сек на полученную жидкую полимерную пленку действовали потоком воздуха с относительной влажностью 75% и температурой 30 °С. Необходимая влажность воздуха со-

здавалась путем его барботирования через насыщенный водный раствор хлорида натрия, температура которого регулировалась с помощью водяного термостата. Поток воздуха подавался перпендикулярно к поверхности жидкой полимерной пленки. Концентрацию раствора ПОБ, наносимого на подложку, варьировали от 10 до 40 мг/мл. Были также получены стандартные (неструктурированные) пленки из ПОБ толщиной около 50 мкм методом осаждения из раствора полимера в хлороформе.

Для тестирования прикрепления и пролиферации клеток на структурированных пленках из ПОБ были использованы мезенхимальные стволовые клетки (МСК). МСК выделяли из костного мозга трехдневных крыс линии Вистар. Для этого после умерщвления путем декапитации из крысы извлекали бедренные кости, их очищали от мышечной ткани, простерилизовывали и промывали. Затем отрезали эпифизы, которые помещали в керамическую ступку с ростовой средой, в качестве которой использовали модифицированную среду Игла (DMEM, Invitrogen, США) с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л), а также содержащей эмбриональную телячью сыворотку (10%), антибиотик (100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл раствора стрептомицина) и коллагеназу – фермент, расщепляющий внеклеточный матрикс. Полученный биоматериал гомогенизировали и помещали в чашки Петри для инкубации на шейкере в течение 1 часа. Затем, после замены среды, клеточный материал помещали в термостат при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Остатки костей удаляли через сутки после начала инкубации, а на вторые сутки инкубации на чашках Петри образовывался клеточный монослой [4].

Для того, чтобы удостовериться в том, что выделенные клетки действительно являются мезенхимальными стволовыми проводят их идентификацию с помощью иммуноферментного анализа. Для этого клетки снимают путем 5-минутной инкубации с раствором трипсин-версена с культурального пластика, после чего оценивают их количество на гемцитометре. Затем суспензию 10⁵ клеток в 100 мкл of PE буфера (2 мл ЭДТА-0.5% ETS в фосфатно-солевом буфере) инкубировали с антителами к позитивным маркерам фенотипа МСК: CD90 and CD29; к негативным поверхностным маркерам: CD45 and CD11b/c (eBioscience, США); а также с красителем для оценки жизнеспособности клеток 7-аминоактиномицином Д (7AAD) в темноте в течение 40 мин при температуре 5°C [4].

Рост МСК поддерживали в среде DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium, «ПанЭко», Россия), которая содержит 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biological Industries, Израиль), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко»), в атмосфере с 5% CO₂ при 37°C со сменной среды раз в 3 дня. Стерильные образцы полученных ранее структурированных пленок ПОБ (n = 3) помещали в лунки 96-луночного планшета, клеточную суспензию наносили сверху из расчета 1500 клеток на образец. Использовали клетки второго

пассажа, определяли жизнеспособность клеток, культивируемых на полимерных пленках, на 1, 3, 5 и 7 сут. Для оценки жизнеспособности клеток использовали тест ХТТ, который является аналогом широко применяемого теста МТТ. С помощью этого теста можно определить активность митохондриальных дегидрогеназ, что является показателем жизнеспособности клетки. Тест основан на превращении неокрашенной соли тетразолия в окрашенные соединения формазана под действием NADPH-зависимых оксидоредуктаз. Был использован набор для ХТТ (ХТТ Cell Proliferation Kit, Biological Industries, Израиль). При достижении заданного срока культивирования среду из лунок удаляли, а вместо

нее в новые чистые лунки вносили 100 мкл свежей среды, после чего переносили туда образцы пленок. Затем к этой свежей среде добавляли 50 мкл свежеприготовленного раствора ХТТ согласно протоколу. По прошествии 4 ч инкубации при плавном покачивании при 37°C образцы вынимали и измеряли оптическую плотность на приборе Zenyth 3100 Microplate Multimode Detector (Anthos Labtec Instruments GmbH, Австрия) при 450 нм против 690 нм [4].

Результаты и обсуждение.

Физико-химические свойства ПОБ, полученного биотехнологическим путем представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Физико-химические свойства пленок ПОА

Образец	ММ, $\times 10^3$ г/моль	$T_{кр.пл.}$, °С	$T_{пл.}^0 / T_{пл.пл.}$, °С	X_c , %	Е, ГПа	Удлинение на разрыв, %	Контактный угол, °
ПОБ	364	87	159/176	65	2,0	4,5	60

Таким образом, полученный полимер обладает относительно высокой степенью кристалличности, жесткостью и относительно невысокой гидрофильностью.

Установлено, что методом «самоорганизации» микрокапель воды из ПОБ можно сформировать микроструктурированные пленки, при этом их морфология зависит от концентрации полимера в растворе. Так, при использовании высоких концентраций ПОБ (40 мг/мл) образуются пленки с сетчатой структурой и размером ячеек ~1-1,5 мкм (рис. 1а). Уменьшение концентрации полимера в растворе в 2 раза (до 20 мг/мл) приводит к кардинальному изменению морфологии покрытия: на пленке визуализируются не поры, а выступающие элементы округлой формы размером 1,5-2,5 мкм (рис. 2б). Дальнейшее снижение содержания ПОБ в растворе (до 10 мг/мл) вызывает образование пленки с неоднородно расположенными порами диаметром от 1 до 4 мкм (рис. 2в).

Исследование фенотипа МСК с помощью точной цитометрии с использованием основных маркеров клеточной поверхности клеток этого типа показало, что доля жизнеспособных клеток в популяции составила 95,8 % (7AAD), доля клеток с поверхностными фенотипами CD 90 - 95%, CD 45 - 2,1%, CD 11b/c - 26%, CD 29(+) - 50%. Существует критерий, согласно которому при идентификации МСК любого вида (мышь, крыса, человек), обязательным является отсутствие поверхностного маркера CD 45 и наличие поверхностного маркера CD 90, что мы и видим в нашем случае [6]. Таким образом, клетки, используемые в нашей работе, действительно являются мезенхимальными стволовыми.

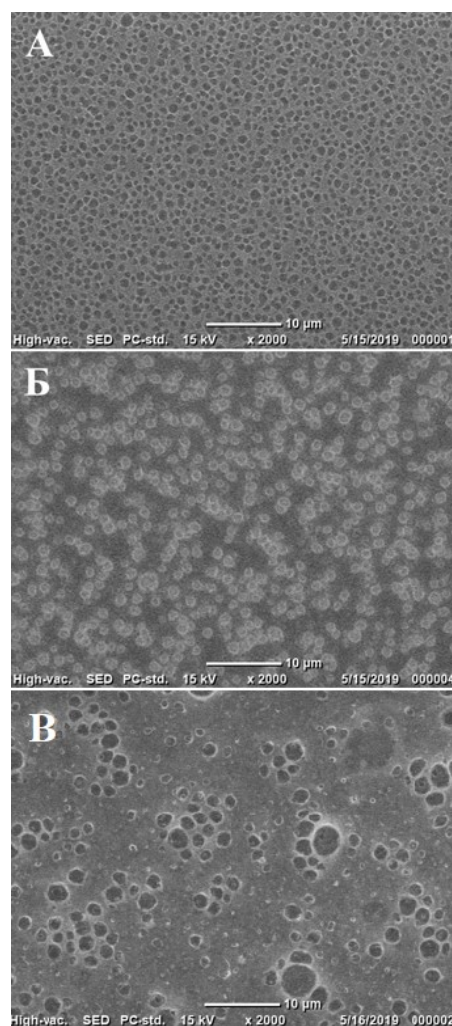


Рисунок 1. СЭМ-изображения пленок ПОБ (образцы #1, #2, #3), полученных из растворов в хлороформе с концентрацией 40 (а), 20 (б) и 10 (в) мг/мл

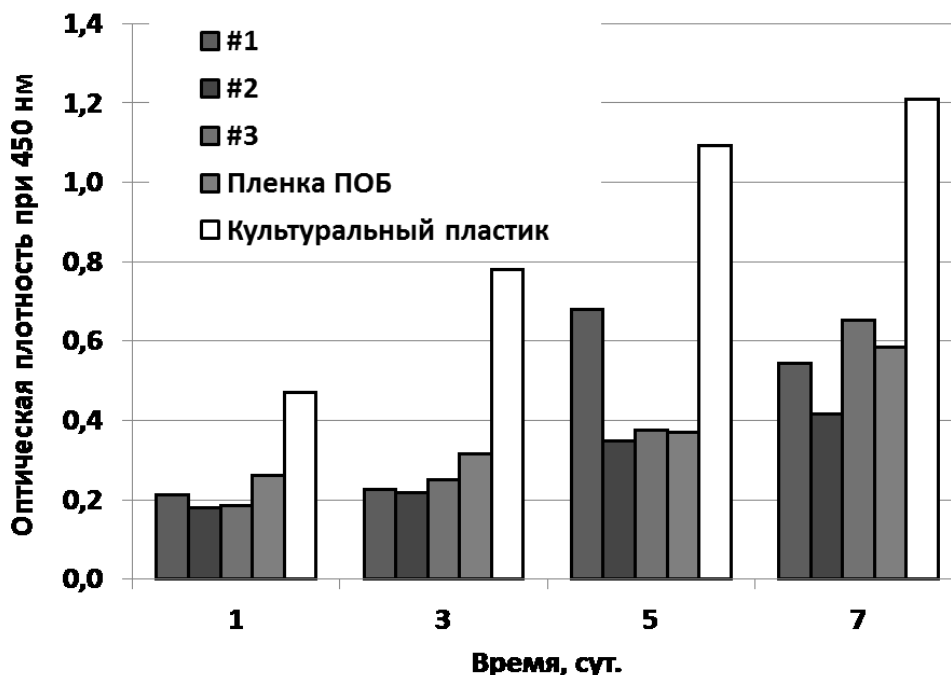


Рисунок 1. Жизнеспособность МСК, культивируемых на структурированных пленках из ПОБ (образцы #1, #2, #3) по сравнению со стандартной пленкой ПОБ и культуральным пластиком

Исследование жизнеспособности и, соответственно, пролиферации МСК, культивируемых на полученных структурированных пленках показало, что МСК прикрепляются и растут на полученных пленках, хотя и значительно менее интенсивно, чем на культуральном пластике. Интенсивность пролиферации клеток на образцах пленок #2 и #3 практически не отличается от таковой на стандартной неструктурированной пленке из ПОБ на всех временных точках, только рост клеток на образце #1 на 5-ые сут. почти в 2 раза был более интенсивным, чем на других структурированных пленках и на стан-

дартной пленке. Исследования роста клеток будут продолжены на других образцах структурированных пленок.

Таким образом, в данной работе показана принципиальная возможность формирования из ПОБ сетчатых пленок с различной морфологией. Полученные структуры являются перспективными для создания поверхностей с различной топографией с целью регулирования и исследования миграции, пролиферации и дифференцировки клеток разных типов, в частности, мезенхимальных стволовых клеток для клеточной и тканевой инженерии.

Список литературы:

1. Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Решетов И.В., Шайтан К.В., Кирпичников М.П. Применение полиоксипропиленов в медицине и природные функции поли-3-оксибутирата // Acta Naturae. – 2019. – V. 11. – N. 41 – P. 4-16.
2. Куликовская, В.И. Получение сетчатых микроструктурированных тонкопленочных материалов из нитроцеллюлозы / В.И. Куликовская, В.Е. Агабеков // Материалы. Технологии. Инструменты. – 2010. – Т. 15. № 4. – С. 84–87.
3. Шадрин В.И., Башмаков И.А., Грачева Е.А., Агабеков В.Е., Капуцкий Ф.Н. Влияние условий формирования сетчатых нитроцеллюлозных пленок на их морфологию // Журнал прикладной химии. – 2010. – Т. 84, № 7. – С. 1212–1216.
4. Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Voinova V.V., Kuznetsova E.S., Zhuikov V.A., Makhina T.K., Myshkina V.L., Potashnikova D.M., Chesnokova D.V., Khaydapova D.D., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. Poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ethylene glycol) scaffolds with different microstructure: the effect on growth of mesenchymal stem cells // 3 Biotech. – 2018. V. 8. P. 328.
5. Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Mahina T.K., Voinova V.V., Zernov A.L., Zhuikov V.A., Akoulina E.A., Ivanova E.V., Kuznetsova E.S., Shaitan K.V., Bonartseva G.A. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) copolymers by Azotobacter chroococcum 7B: a precursor feeding strategy // Preparative Biochemistry and Biotechnology. – 2017. V. – 47. N. – 2. – P. 173-184.
6. Nishikawa et al. Fabrication of honeycomb film of an amphiphilic copolymer at the air–water interface // Langmuir. – 2002. – Vol. 18. – P. 5734–5740.