

БИОТЕХ

РОСТ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ПЛЕНКАХ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА, ЗАГРУЖЕННЫХ ЛЕВОФЛОКСАЦИНОМ И СИМВАСТАТИНОМ

Демьянова Ирина Валерьевна

студент-магистр, Биологический факультет, Совместный Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова и Пекинский политехнический институт, КНР, г. Шэньчжэнь
E-mail: irinydem@yandex.com

Акулина Елизавета Александровна

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

Труонг Тан Хуонг

аспирант, Университет Томаса Бата в Злине, Центр Полимерных Систем, Чешская Республика, г. Злин
E-mail: Huong.Truong@seznam.cz

Воинова Вера Владимировна

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

Бонарцев Антон Павлович

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

THE GROWTH OF MESENCHYMAL STEM CELLS ON POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) FILMS LOADED WITH LEVOFLOXACIN AND SIMVASTATIN

Irina Demianova

student, Faculty of Biology, Joint M.V.Lomonosov Moscow State University and Beijing Institute of Technology, China, Shenzhen

Elizaveta Akoulina

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

Truong Thanh Huong

*Ph.D. student, Tomas Bata University in Zlin, Center of Polymer Systems,
Czech Republic, Zlin*

Vera Voinova

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

Tatiana Makhina

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

Garina Bonartseva

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

Anton Bonartsev

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

АННОТАЦИЯ

Были получены пленки из биоразлагаемого и биосовместимого полимера поли-3-оксибутирата, загруженные антибиотиком левофлоксацином (1% и 5% вес.) и остеоиндуктором симвастатином (1% и 5% вес.). Исследование пролиферации мезенхимальных стволовых клеток на поверхности полученных пленок показало, что пленки из поли-3-оксибутирата, загруженные левофлоксацином (1% и 5%) и симвастатином (1%) способствуют поддержанию жизнеспособности и пролиферации мезенхимальных стволовых клеток на поверхности пленки, но на пленках, содержащих 5% симвастатина рост наблюдалось подавление роста клеток. Лекарственные системы на основе ПОБ обладают хорошими перспективами для применения с целью регенерации костной ткани.

ABSTRACT

Films were produced from a biodegradable and biocompatible polymer poly(3-hydroxybutyrate) loaded with the antibiotic levofloxacin (1% and 5% wt.) and the osteoinducer simvastatin (1% and 5% wt.). A study of the proliferation of mesenchymal stem cells on the surface of the prepared films showed that the poly(3-hydroxybutyrate) loaded with levofloxacin (1% and 5%) and simvastatin (1%) contribute to the maintenance of viability and proliferation of mesenchymal stem cells on the film surface, but on the films containing 5% simvastatin, inhibition of cell growth was observed. PHB-based drug systems have good prospects for use in bone tissue regeneration.

Ключевые слова: поли-3-оксибутират, лекарственные системы, мезенхимальные стволовые клетки, симвастатин, левофлоксацин.

Keywords: poly(3-hydroxybutyrate), drug systems, mesenchymal stem cells, simvastatin, levofloxacin.

Введение

Поли-3-оксибутират (ПОБ) природный прототип всех полиоксиканоатов (ПОА), на сегодняшний день активно используемых в фармацевтике, представляет собой линейный полиэфир 3-оксимасляной кислоты [5]. Особое внимание ПОБ привлекает способностью к биодegradации без образования токсичных для организма веществ [6], биосовместимостью, высокой механической прочностью, термической пластичностью, специфическими диффузионными свойствами [3] и эффективностью получения при помощи биотехнологии.

Ключевым фактором активного использования ПОБ в клеточной биологии и биоинженерии является его высокая биосовместимость. Вместе с тем, различные физико-химические свойства полимера (морфология поверхности, микроструктура, химический состав, гидрофобность полимера etc.) оказывают неоднозначное влияние на рост клеток на

структурах, полученных из ПОБ [2,12]. Высокий уровень жизнеспособности и пролиферации на пленках из ПГБ *in vitro* проявляют разные типы клеток млекопитающих, в частности мезенхимальные стволовые клетки крыс, использованные в данной работе. [2] Согласно ранее полученным данным, скаффолды из ПОБ обладают способностью стимулировать остеогенез: при культивировании мезенхимальных стволовых клеток (МСК) на структурах, полученных из полимера, клетки способны дифференцироваться по остеогенному пути [1]. Однако следует отметить, что физико-химические свойства, а также структура полимерных матриц могут даже нивелировать эффект воздействия биоактивных молекул, оказывающих влияние на рост и дифференцировку клеток [12].

Перспективным направлением использования ПОА является изготовление систем контролируемого высвобождения лекарственных веществ (ЛВ).

Способность ПОБ образовывать композиты с биоактивными молекулами была использована для разработки лекарственных систем: были получены скаффолды на основе ПОБ с включением антибактериальных (левофлоксацин) и стимулирующих рост и дифференцировку клеток (симвастатин) ЛВ [4].

Статины, такие как, например, симвастатин, индуцируют остеогенез за счет усиления дифференцировки мезенхимальных клеток в остеобласты, повышая уровень морфогенетического протеина кости-2 (BMP-2) и снижая уровень апоптоза остеобластов. Более того, статины могут снижать резорбцию костной ткани путем ингибирования дифференцировки и активности остеокластов [9,14]. Будучи препаратом БКС II класса, симвастатин демонстрирует высокую вариабельность фармакологических эффектов, но ограниченную скорость растворения при пероральном всасывании. Поэтому поддержание его концентрации может привести к повышению биодоступности. Большинство доступных статинов, включая симвастатин, были разработаны как препараты немедленного высвобождения [8,11]. В настоящее время существует необходимость в разработке соответствующей системы доставки для поддержания высвобождения препарата для повышения терапевтической эффективности при одновременном снижении побочных эффектов [9].

Левифлоксацин это антибактериальное фторхинолоновый антибиотик широкого спектра действия, обладающий активностью в отношении целого ряда грамположительных и грамотрицательных аэробных бактерий и атипичных респираторных бактериальных патогенов, но ограниченной активностью в отношении большинства анаэробных бактерий. Антибактериальное действие левифлоксацина обусловлено его ингибирующим воздействием на бактериальную ДНК-гиразу и топоизомеразу IV типа. Он обеспечивает клиническую и бактериологическую эффективность при ряде инфекций, в том числе вызванных как чувствительными к пенициллину, так и резистентными штаммами *S. pneumoniae*. Левифлоксацин обладает высокой биологической толерантностью и имеет фармакокинетический профиль, совместимый с однократным ежедневным применением, что позволяет использовать его в качестве ЛВ для контролируемого высвобождения при загрузке биодеградируемых полимерных пленок [10,15].

Целью данной работы являлась оценка жизнеспособности МСК, культивируемых на поверхности биополимерных пленок из ПОБ, загруженных ЛВ – левифлоксацином и симвастатином, в различной массовой доле.

Материалы и методы

В работе были использованы непористые биополимерные пленки, полученные на основе ПОБ с добавлением ЛВ (симвастатина и левифлоксацина) в различной массовой доле. Для оценки биосовместимости *in vitro* использовали культуру МСК, выделенную из жировой ткани 3-х дневных самцов крыс линии Wistar.

Выделение МСК

Для выделения МСК из жировой ткани использовали 3-х дневных самцов крыс линии Wistar. Для получения МСК из крыс, после умерщвления путем декапитации, выделяли абдоминальную жировую ткань, стерилизовали и промывали в среде DMEM, затем гомогенизировали. Полученную суспензию (в среде DMEM) инкубировали 2 часа при 37°C в присутствии коллагеназы I типа [1]. Центрифугировали при 2000 rpm в течении 5 минут (Eppendorf AG 22331 Hamburg, Германия), полученный осадок культивировали в полной ростовой среде состава: DMEM (Dulbecco'S Modified Eagle Medium, «ПанЭко», Россия) с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS, Biological Industries, Израиль), антибиотик 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл раствора стрептомицина («ПанЭко», Россия A065) в термостате при 37°C, 5% CO₂ (SANYO Electric Co., Япония) в течении 7 дней. Для эксперимента использовали клетки II пассажа.

Получение биополимерных пленок.

ПОБ был получен методом контролируемого биосинтеза, описанным в предыдущих работах, с использованием высокоэффективного штамма-продуцента ПОБ *Azotobacter chroococcum* 7Б [7]. Пленки из ПОБ были изготовлены методом осаждения раствора полимера в трихлорметане ($C_{\text{раств}}=6,1$ г/дл) на поверхность стеклянных чашек Петри (D=5см). Для изготовления пленок, загруженных ЛВ, проводилось осаждение растворов ПОБ, содержащих 1% (вес.) левифлоксацина, 1% (вес.) симвастатина, 5% (вес.) левифлоксацина, 5% (вес.) симвастатина («Sigma-Aldrich», США).

Оценка биосовместимости *in vitro*.

Исследование биосовместимости *in vitro* проводили путем культивирования МСК на поверхности полимерных пленок с последующим количественным анализом клеток методом ХТТ (ХТТ Cell Proliferation Kit, Biological Industries, Израиль). Колориметрический метод на основе соли тетразолия ХТТ (2,3-би-с-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамид) позволяет измерять количество живых клеток в пробе. Биохимический анализ ХТТ основан на активности митохондриальных ферментов, которые инактивируются вскоре после гибели клеток. Таким образом, ферменты активны исключительно в живых клетках, в результате формируется водорастворимый оранжевый краситель, концентрация которого прямо пропорциональна количеству метаболически активных клеток [13].

Для проведения количественного анализа методом ХТТ, МСК, в количестве 3000кл/лунка, культивировали в течение 7 дней на поверхности пленок в плоском 96-луночном планшете (n=4). ХТТ тестирование проводили на 1, 3, 5 и 7 сутки. Для проведения теста пленки с МСК перемещали в чистые лунки и добавляли 100ul свежей ростовой среды, 50ul активированного раствора ХТТ и инкубировали 2 часа при 37°C в термостате, после чего пленки

удалялись из лунок и проводилось измерение оптической плотности растворов [6]. Измерение поглощения образцов производилось на спектрофотометре (Zenyth 3100 Microplate Multimode Detector) при длине волны 450 Нм. Для измерения неспецифических показаний использовалась длина волны 620 Нм.

Предварительно была проведена калибровка: при фиксированном количестве клеток 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15 и 20 тыс.кл./лунка проводили измерения оптической плотности (при длине волны 450 Нм и 620 Нм). По результатам измерений было получено уравнение калибровочной прямой, далее использованное для перевода экспериментальных значений оптической плотности в непосредственное количество клеток в лунке.

Сканирующая электронная микроскопия

Для исследования матриц из ПОБ были получены изображения с помощью сканирующего электронного микроскопа CAMSCAN – S4. Перед измерениями образцы высушивались и производилось напыление золотом. Для подготовки к СЭМ образцы фиксировали смесью для фиксации (2%

формалин, 0,2% глутаральдегид в PBS) в течении суток, после чего 3хкратно отмывали раствором PBS (в течение 5 мин.), далее производилось последовательное дегидрирование в течении 5 минут в растворах с повышающейся концентрацией этанола (30%, 50%, 70%, 82% и 96%), после чего образцы инкубировались 10 минут в смеси 100% гексаметилдисиладана (HMDS) и 96% спирта (1:1) и далее дважды по 10 минут в 100% HMDS. В завершении образцы оставляли в 100% HMDS до полного испарения в объеме, покрывающем образец.

Статистический анализ

Статистическая обработка была проведена с помощью программы Prism 6. Использовали парный непараметрический Т-критерий Уилкоксона. Данные на рисунках представлены в виде среднего значения в выборке (n=4) и стандартной ошибки.

Результаты и Обсуждения

Изучение образцов полимерных пленок из ПОБ методом сканирующей электронной микроскопией показало, что МСК, способны к адгезии с последующей пролиферацией на поверхности пленок, имеющих однородную плоскую структуру (рис. 1).

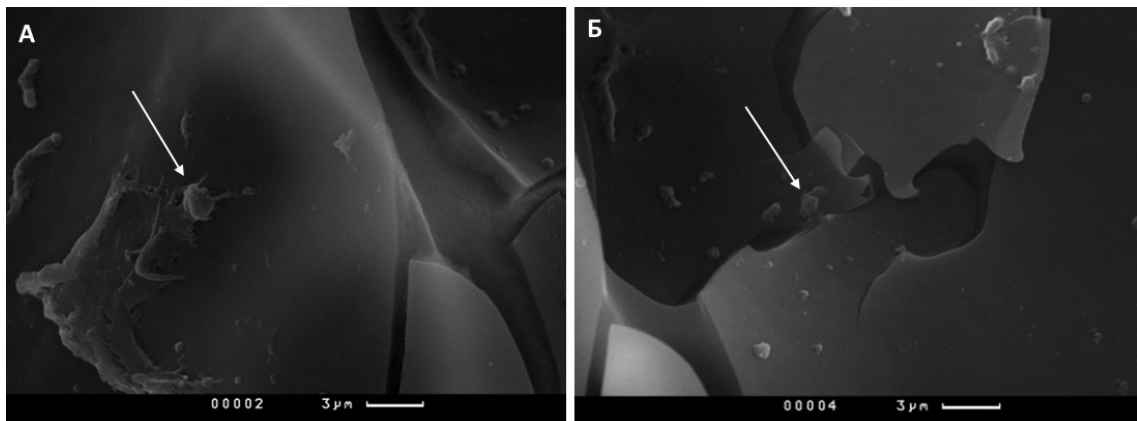


Рисунок 1. МСК, культивируемые на пленках из ПОБ в нормальной ростовой среде (СЭМ)

Результаты ХТТ теста на жизнеспособность МСК, культивируемых на пленках ПОБ показали, что биополимерные пленки способны эффективно поддерживать рост и пролиферацию клеток.

Динамика роста числа клеток в течении 7 суток (рис.2) наглядно показало, что рост клеток на стандартных пленках ПОБ, не содержащих ЛВ, как и на пленках ПГБ с добавлением лекарственных веществ (левофлоксацин 1%, 5% и симвастатин 1%, 5%) в течении всего периода времени происходит достаточно равномерно и в конечном результате количество клеток на 7 сутки находится в между 10 и 17 тыс. Интенсивность пролиферации клеток на культуральном пластике достоверно ($p < 0,05$; рис. 3) отличается в сравнении с интенсивностью пролиферации на других образцах, количество клеток, растущих на культуральном пластике достигает 28 тыс. клеток на лунку.

Заметно, что прирост клеток на 1 сутки существенно не различается во всех случаях (рис.3). Однако на 3 сутки количество клеток, полученных в культуре, выращенной на пленках ПОБ и культуральном пластике в сравнении с культурами, выращенными на пленках, содержащих ЛВ, заметно больше. К 5 суткам культивирования разница в количествах клеток, выращенных на пленках, нивелируется. И далее прирост клеток на пленках достоверно не различается ($p > 0,05$; рис. 3). Можно заметить, что на 7 сутки происходит незначительный спад прироста клеток, а также в случае с пленками ПОБ, загруженными левофлоксацином (1%, 5%) и симвастатином (1%) происходит незначительное ($p > 0,05$) уменьшение количества клеток, возможно, связанное со сменой среды. Таким образом, пленки ПОБ с включением обоих ЛВ способны к поддержанию жизнеспособности МСК, при этом достоверно ($p > 0,05$; рис.3) не оказывая существенного влия-

ние на рост клеток в сравнении с клетками, растущими на «пустых» пленках ПОБ.

Достоверного различия между приростом МСК в присутствии симвастатина 1% и левофлоксацина 1% не наблюдается (рис. 3), что также справедливо для симвастатина 5% и левофлоксацина 5%. Однако,

как можно заметить на рис. 3, при высоких концентрациях ЛВ происходит угнетение роста МСК по сравнению с ростом клеток на стандартных пленках ПОБ и пленках, содержащих симвастатин 1% и левофлоксацин 1%.

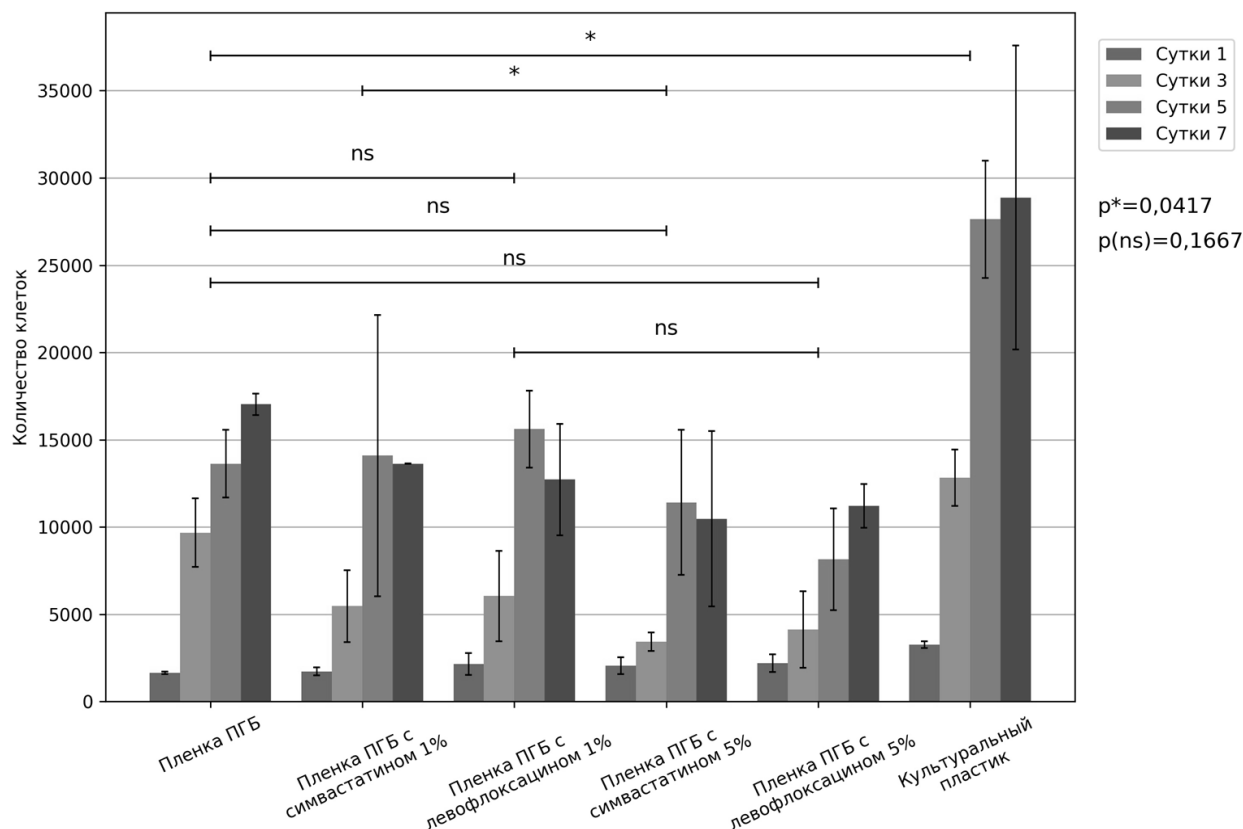


Рисунок 3. Жизнеспособность клеток МСК, культивируемых на полимерных пленках ПОБ, содержащих симвастатин (1% и 5%) и левофлоксацин (1% и 5%) по сравнению с культуральным пластиком и ПОБ пленкой, не содержащей лекарственных веществ

Результаты проведенного исследования указывают на то, что биополимерные плоские пленки из ПОБ способствуют пролиферации и поддержанию жизнеспособности МСК, культивируемых на их

поверхности. Пленки, загруженные ЛВ также не вызывают выраженного угнетения роста клеток и способны к поддержанию нормального роста МСК.

Список литературы:

1. Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Решетов И.В., Шайтан К.В., Кирпичников М.П. Применение полиоксиканоатов в медицине и природные функции поли-3-оксибутирата // Acta Naturae. – 2019. – V. 11. – N. 41 – P. 4-16.
2. Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Кирпичников М.П. Поли-3-оксибутират и биополимерные системы на его основе // Биомедицинская химия. –2011. – Т. 57. No 4. С. 374–391.
3. Artsis M.I., Bonartsev A.P., Iordanskii A.L., et al. Biodegradation and medical application of microbial poly(3-hydroxybutyrate) // Molecular Crystals and Liquid Crystals. – 2010.– 523(1):21–49.
4. Bonartsev A.P. Poly(3-hydroxybutyrate): applications. In: Mishra M, editor. Encyclopedia of Polymer Applications. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2019; 5250 p. DOI: 10.1201/9781351019422-140000085.
5. Bonartsev A.P., Voinova V.V., Bonartseva G.A. Poly(3-hydroxybutyrate) and human microbiota // Applied biochemistry and microbiology. –2018. – 54 (6): 547–68.

6. 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.
7. Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Makhina 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.
8. Brittain H. Simvastatin, *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*// -1998- Vol. 22
9. Chou J., Ito T., Bishop D., Otsuka M., Ben-Nissan B., et al. Controlled Release of Simvastatin from Biomimetic b-TCP Drug Delivery System. // *PLoS ONE.* – 2013. – 8(1)
10. Croom K.F., Goa K.L. Levofloxacin: a review of its use in the treatment of bacterial infections in the United States// *Drugs.* – 2003. – 63(24):2769-802.
11. Dipti Joshi, R. S. Gaud Formulation and Evaluation of Extended Release Solid Dispersions Containing Simvastatin // *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* – 2011. –V. 1 (3) 13-19
12. Fischer D., Li Y., Ahlemeyer B., Krieglstein J., Kissel T. // *Biomaterials.* – 2003. V. 24. No 7. P. 1121–1131.
13. Huyck L, Ampe C, Van Troys M. The XTT Cell proliferation assay applied to cell layers embedded in three-dimensional matrix. // *Assay Drug Dev Technol.* – 2012; 10(4): 382–92.
14. Moshiri A., Sharifi A.M., Oryan A. Role of Simvastatin on fracture healing and osteoporosis: a systematic review on in vivo investigations// *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* – 2016.– 43, 659–684
15. Swapna G., Deepika G. Development and Validation New Analytical Methods of Levofloxacin in IV Infusions by UV-Visible spectrophotometric Methods and Determine Assay, % Purity and Stability in Three Marketed Brands // *International Journal of Science and Research.* – 2014.– Vol 3 Issue 6