ОСОБЕННОСТИ АДГЕЗИИ И ПРОЛИФЕРАЦИИ ФИБРОБЛАСТОВ МЫШИ ЛИНИИ NIH/3T3 НА ПЛЕНКАХ ИЗ БАКТЕРИАЛЬНОГО СОПОЛИМЕРА ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТ-СО-3-ГИДРОКСИВАЛЕРАТА) С РАЗЛИЧНОЙ ШЕРОХОВАТОСТЬЮ ПОВЕРХНОСТИ

Сургученко В.А. 1 , Пономарева А.С. 2 , Ефимов А.Е. 1 , Немец Е.А. 1 , Агапов И.И. 1 , Севастьянов В.И. 1

Проведен анализ адгезии и пролиферации фибробластов мыши линии NIH/3T3 на поверхности пленок из бактериального сополимера поли(3-гидроксибутирата-со-3-гидроксивалерата) с разной величиной шероховатости поверхности. Методом атомно-силовой микроскопии показано, что все образцы пленок обладали значительно большей шероховатостью ($92,0\pm7,0;290,8\pm7,0;588,8\pm16,0$ нм), чем культуральный пластик, использовавшийся в качестве контроля ($9,5\pm0,6$ нм). Обнаружено, что при увеличении шероховатости наблюдается существенное снижение адгезии и метаболической активности клеток. Фибробласты мыши линии NIH/3T3 слабо удерживаются на поверхности исследуемых пленок и легко смываются с субстрата в процессе отмывки и окраски.

Ключевые слова: фибробласты, пролиферация, метаболическая активность, бактериальный сополимер, шероховатость.

CHARACTERISTICS OF ADHESION AND PROLIFERATION OF MOUSE NIH/3T3 FIBROBLASTS ON THE POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) FILMS WITH DIFFERENT SURFACE ROUGHNESS VALUES

Surguchenko V.A.¹, Ponomareva A.S.², Efimov A.E.¹, Nemets E.A.¹, Agapov I.I.¹, Sevastianov V.I.¹

¹ Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

Adhesion and proliferation of NIH/3T3 mouse fibroblasts on the surfaces of bacterial copolymer poly(3-hydroxy-butyrate-co-3-hydroxyvalerate) films with different roughness was investigated. Atomic force microscopic analysis showed that surface roughness values of all films were significantly greater (92.0 ± 7.0 ; 290.8 ± 7.0 ; 588.8 ± 16.0 nm) than that of the cultural plastic control (9.5 ± 0.6 nm). It was revealed that adhesion and metabolic activity of the cells decreases with the increase of surface roughness values. NIH/3T3 mouse fibroblasts attached weakly to the surface of copolymer films and washed away the substrate during rinsing and staining.

Key words: fibroblasts, proliferation, metabolic activity, bacterial copolymer, roughness.

¹ ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России, г. Москва

² АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», г. Москва

² ANO «Institute of Biomedical Research and Technology», Moscow

ВВЕДЕНИЕ

Регенеративная (восстановительная) медицина – это обобщенный термин для обозначения различных терапевтических и хирургических клеточных технологий, направленных на частичную или полную компенсацию функций поврежденных или утраченных органов (тканей) [2]. В регенеративной медицине выделяют два основных направления. Одно из них связано со стимулированием клеточной/тканевой регенерации с помощью трансплантации стволовых клеток или их ассоциатов с соматическими клетками. Второе направление заключается в восстановлении целостности, структуры и функций тканей и органов с помощью так называемых тканеинженерных конструкций и биоискусственных органов, которые включают в себя следующие компоненты:

- клетки, способные формировать функционирующий внеклеточный матрикс;
- подходящий биодеградируемый носитель (матрикс) для трансплантации клеток;
- биоактивные молекулы (цитокины, факторы роста), которые оказывают биостимулирующее действие на клетки поврежденной ткани.

Тканеинженерные носители создаются для обеспечения двух- или трехмерного окружения клеток, способствующего улучшению их пролиферативных и функциональных свойств. Физико-химические и биологические свойства матриксов являются определяющими в обеспечении жизнедеятельности клеток [8].

Шероховатость и топография поверхности, как известно, влияют на адгезию и распластывание клеток различных типов на субстрате, пролиферацию как в условиях in vitro, так и in vivo, определяют их двигательную активность, морфологию, ориентацию, а также влияют на синтез специфических белков и внутриклеточную сигнализацию [5, 11]. Даже небольшие изменения профиля поверхности субстрата могут приводить к изменению клеточного ответа в большом диапазоне - от слабого усиления клеточной активности до значительного ее угнетения. Различные типы клеток отличаются по своей чувствительности к вариациям шероховатости и топографии поверхности. Так, например, исследование поведения нейрональных клеток на поверхностях с разбросом величин шероховатости от 6 нм до 200 мкм показали, что при шероховатости 6-49 нм происходило увеличение длины аксона клеток, а нейриты становились более разветвленными. В случае шероховатости в диапазоне 87-200 нм нейроны были менее развиты, тело нейрона имело округлую морфологию, процессы разветвления замедлялись [4]. Для клеток пупочной вены человека (HUVEC) увеличение шероховатости в диапазоне от 10 до 102 нм способствует адгезии и пролиферации данного типа клеток [6].

Цель данной работы — изучение влияния шероховатости поверхности пленок из бактериального сополимера поли(3-гидроксибутирата-со-3-гидроксивалерата) на адгезию и пролиферацию фибробластов мыши линии NIH/3T3.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление пленок

Образцы исследуемых материалов в виде пленок изготавливали методом полива из 1%-го бактериального сополимера поли(3гидроксибутирата-со-3-гидроксивалерата) (п(3-ГБсо-3-ГВ), с содержанием гидроксивалерата 12%, Fluka, США, и 26%, Институт биофизики СО РАН, г. Красноярск, Россия) в метиленхлориде. С целью изменения шероховатости поверхности пленок полиэтиленгликоль (ПЭГ, Merck, Германия) в количестве 20% от веса п(3-ГБ-со-3-ГВ) вносили в рецептуру на стадии растворения сополимера. После полного испарения растворителя на дне чашек Петри образовывалась пленка из сополимера толщиной 40-50 мкм. Полученные пленки сушили при 50 °C в течение 2 ч и инкубировали в дистиллированной воде в течение суток при комнатной температуре и постоянном перемешивании с целью удаления водорастворимых примесей. Затем пленки высушивали при 50 °C и вакуумировали в течение 20 ч при комнатной температуре.

Образцы полученных пленок были промаркированы следующим образом: 1 – сополимер п(3-ГБ-со-3-ГВ), 26% ГВ; 2 – сополимер п(3-ГБ-со-3-ГВ), 12% ГВ; 3 – сополимер п(3-ГБ-со-3-ГВ), 12% ГВ+20% ПЭГ. В качестве контроля использовали поверхность культурального пластика (КП) (Corning-Costar, США).

Метод атомно-силовой микроскопии

Анализ топографии и величины шероховатости поверхности пленок проводили методом атомносиловой микроскопии (ACM) с помощью сканирующего зондового микроскопа NST Certus («Нано Скан Технология», Россия) в полуконтактном режиме с использованием зондовых датчиков NSC15 (МікгоМаsch Со., Эстония) с резонансной частотой ~320 кГц и радиусом острия ~10 нм. Данные по шероховатости поверхности были получены с помощью вычисления среднеквадратичного отклонения (RMS). В работе использована статистика по 5 АСМ-изображениям в разных точках для каждого образца.

Адгезия и пролиферация фибробластов линии NIH/3T3

Фибробласты мыши линии NIH/3T3, полученные из коллекции перевиваемых соматических клеток позвоночных ГУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН» (НИИВ РАМН), перед посевом на образцы пленок и контроль культивировали в стандартных культуральных флаконах площадью 25 см² (Corning-Costar, США), в ростовой среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Perbio-HyClone, США), 2 мМ L-глютамина («ПанЭко», Россия), 50 мкг/мл гентамицина (ФГУП «НПО «Микроген», Россия), 1 мМ HEPES (ПанЭко, Россия) в CO₂-инкубаторе при стандартных условиях: 37 °C, во влажной атмосфере, содержащей $5 \pm 1\%$ CO₂. Исходное количество клеток в суспензии определяли с использованием гемоцитометра (камеры Горяева).

Исследуемые стерильные образцы пленок, предварительно помещенные в культуральные плоскодонные 6-луночные планшеты, в асептических условиях засевали фибробластами мыши линии NIH/3T3. Исходная плотность посева на исследуемые образцы и контроль КП составляла 2×10^3 кл./см². После посева 6-луночные планшеты с образцами культивировали в $\mathrm{CO_2}$ -инкубаторе при стандартных условиях в течение 24, 48, 72 и 96 ч, после чего проводили соответствующие исследования. Визуально прикрепившиеся и распластанные клетки оценивали с помощью бинокулярного инвертированного микроскопа «Биолам П-I» (Россия) при увеличении $\times 300$.

Метаболическую активность фибробластов, культивируемых на поверхности исследуемых пленок, оценивали через 24, 48, 72 и 96 ч с помощью витального pearenta alamarBlue® (Invitrogen, Beликобритания) согласно протоколу, рекомендуемому производителем. В лунки, содержащие исследуемые образцы, добавляли 10% витального реагента alamarBlue®, после чего образцы инкубировали с alamarBlue® в течение 4 ч при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей $5 \pm 1\%$ CO₂. alamarBlue[®] – витальный краситель, в состав которого входит индикатор окислительно-восстановительных процессов. Пролиферирующие клетки восстанавливают alamarBlue®, вследствие чего происходит изменение его цвета с индиго на розовый. Изменение поглощения среды регистрировали с помощью комбинированного ридера для микропланшет SynergyTM2, модель SLFPA (Bio Tec Instruments Inc., США) на длинах волн 570 и 600 нм. В качестве контроля использовали среду без клеток с добавлением alamarBlue[®]. Процент восстановленного alamarBlue® характеризует метаболическую активность клеток.

Жизнеспособность фибробластов на поверхности пленок исследовали с помощью набора Live/ dead® Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen, Великобритания) согласно протоколу, рекомендуемому производителем для фибробластов мыши линии NIH/3T3. Метод заключается в двойном флуоресцентном окрашивании, с одновременным определением живых и мертвых клеток посредством связывания красителей: бромистого этидия (ethidium bromide homodimer, EthD-1) и ацетоксиметил кальцеина (calcein acetoxymethyl, calcein AM). EthD-1 является маркером мертвых клеток, проникая через поврежденную плазматическую мембрану и связываясь с нуклеиновыми кислотами, дает яркокрасное флуоресцентное свечение (возб./эмиссия ~495 нм/~635 нм). Calcein AM, проникая в жизнеспособные клетки, подвергается воздействию внутриклеточных эстераз, превращаясь в кальцеин, дающий ярко-зеленое однородное флуоресцентное свечение (возб./эмиссия ~495 нм/~515 нм). Исследуемые пленки инкубировали в растворе фосфатного буфера Дюльбекко, содержащем 2 мкМ calcein АМ и 4 мкМ EthD-1, в течение 30 мин, после чего результаты окрашивания визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Люмам Р1 (Ломо, Россия) и фотографировали с помощью цифровой камеры Nicon Coolpix 990 (Япония).

Количественную и статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ Microplate data collection & Analysis software Gen5TM, а также Microsoft Excel. Все результаты представлены в виде среднего значения \pm среднеквадратичное отклонение. Различия считали достоверными при р < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование образцов методом ACM показало, что все образцы пленок обладают значительно большей шероховатостью, чем КП, использовавшийся в качестве контроля (табл.). Из трех серий биополимерных пленок минимальной шероховатостью обладает образец $1 (92,0 \pm 7,0 \text{ нм})$.

Таблица Значения шероховатости для исследуемых образцов

Образец	Шероховатость поверхности (RMS), нм (n = 5)
КП	9,5 ±0,6
1 – сополимер п(3-ГБ-со-3-ГВ), 26% ГВ	$92,0 \pm 7,0$
2 – сополимер п(3-ГБ-со-3-ГВ), 12% ГВ	290,8 ± 7,0
3 – сополимер п(3-ГБ-со-3-ГВ), 12% ГВ + 20% ПЭГ	$588,8 \pm 16,0$

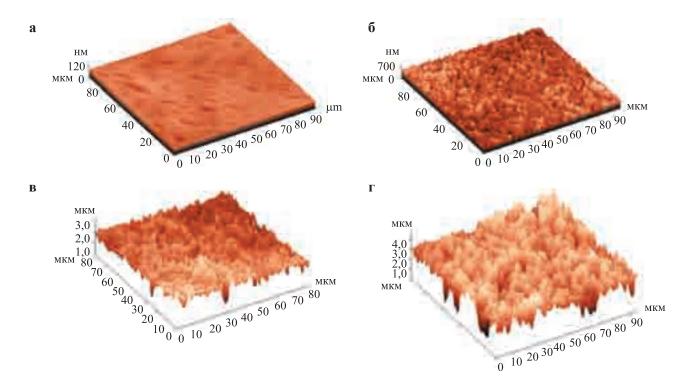


Рис. 1 АСМ-изображения поверхности: а – культурального пластика (КП); б – образца 1 (п(3-ГБ-со-3-ГВ), 26% ГВ); в – образца 2 (п(3-ГБ-со-3-ГВ), 12% ГВ); г – образца 3 (п(3-ГБ-со-3-ГВ), 12% ГВ + 20% ПЭГ. Площадь сканирования 100×100 мкм

Образцы 2 и 3 имеют существенно отличающуюся морфологию: поверхность более рыхлая, содержит ярко выраженные поры и волокнистые структуры, а также более высокую шероховатость, чем образец 1. Показано, что добавление ПЭГ в значительной степени влияет как на значение шероховатости поверхности ($588,8 \pm 16,0$ нм, что в 2 раза превосходит шероховатость поверхности образца 2 и в 6 раз образца 1), так и на морфологию – поверхность содержит более крупные поры и волокнистые структуры большего размера (рис. 1).

Результаты исследования метаболической активности мышиных фибробластов представлены на рис. 2. На протяжении всего времени исследования метаболическая активность фибробластов NIH/3T3 на поверхности контроля — КП с шероховатостью порядка 10 нм была существенно выше, чем на поверхности всех исследуемых образцов, клетки лучше адгезировали и интенсивнее пролиферировали, достигая плотного монослоя через 96 ч.

На образце 3 с наибольшей шероховатостью $588,8\pm16,0$ нм метаболическая активность фибробластов на протяжении всего периода исследования была значительно ниже по сравнению с контролем и образцами 1 и 2, имеющими шероховатость $92,0\pm7,0$ и $290,8\pm7,0$ нм соответственно. Через 24 ч метаболическая активность фибробластов на образцах 1 и 2 одинакова, примерно в 3 раза ниже, чем в контроле, большинство клеток имеют округлую форму, наблюдаются единичные распластанные клет-

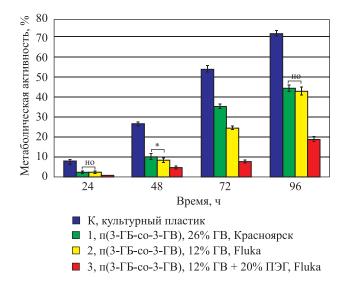


Рис. 2. Метаболическая активность фибробластов мыши линии NIH/3T3 на поверхности: K — контроля (КП); 1 — образца 1 (п(3-ГБ-со-3-ГВ), 26% ГВ); 2 — образца 2 (п(3-ГБ-со-3-ГВ), 12% ГВ); 3 — образца 3 (п(3-ГБ-со-3-ГВ), 12% ГВ + 20% ПЭГ). (но — различия статистически не значимы, * — достоверные различия, р < 0,05)

ки. Через 48 ч между образцами 1 и 2 обнаружено значимое различие метаболической активности, для образца 1 несколько выше, через 72 ч различие растет, а через 96 ч становится снова статистически не различимым. К 96 ч на образцах 1 и 2 образуется монослой, как и в контроле, но в отличие от контроля не все клетки распластанные, фибробла-

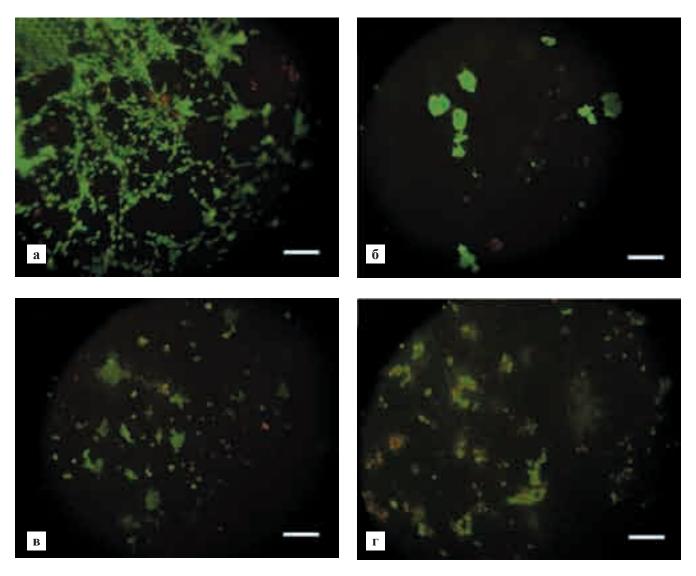


Рис. 3. Фибробласты мыши линии NIH/3T3 на поверхности: а — культурального пластика (КП); б — образца 1 (п(3-ГБ-со-3-ГВ), 26% ГВ); в — образца 2 (п(3-ГБ-со-3-ГВ), 12% ГВ); г — образца 3 (п(3-ГБ-со-3-ГВ), 12% ГВ + 20% ПЭГ). Время культивирования — 72 ч. Окрашивание Live/dead® Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen, Великобритания). Бар 100 мкм

сты на образце 3 монослоя не достигали. Данные по исследованию жизнеспособности фибробластов на поверхности исследуемых пленок (рис. 3) показали, что через 72 ч на всех исследуемых поверхностях клетки жизнеспособны. Наибольшее количество распластанных фибробластов наблюдается в контроле, в то время как на остальных образцах клетки имеют преимущественно округлую морфологию и собраны в конгломераты. Наибольшее количество мертвых клеток обнаружено на образце 3.

Было показано, что микрошероховатость поверхности (100 нм – 100 мкм) стимулирует дифференцировку клеток в остеогенном направлении [5]. Например, первичные остеобласты крысы на поверхности с шероховатостью порядка 0,81 мкм активнее пролиферируют и имеют повышенный уровень активности щелочной фосфатазы и экспрессии остеокальцина по сравнению с гладкой поверхностью (меньше 1 мкм). Аналогичный эффект на-

блюдали с эмбриональными остеобластами человека (hFOB 1.19) [10]. Обнаружено, что при культивировании на поверхности с шероховатостью порядка 13 нм фибробласты человека показывают высокую адгезионную и пролиферативную активность, повышение уровня экспрессии белков и активности цитоскелета. При шероховатости субстрата порядка 95 нм существенно снижается даже первоначальная адгезия фибробластов [7, 9].

Другие авторы продемонстрировали увеличение адгезии фибробластов человека и усиление ранних межклеточных взаимодействий на поверхностях с шероховатостью 20 и 50 нм [12].

Таким образом, на поверхности культурального пластика с шероховатостью порядка 10 нм фибробласты мыши линии NIH/3T3 прочно прикреплялись, распластывались, пролиферировали и демонстрировали интенсивную метаболическую активность. В ряду исследованных образцов бактериаль-

ного сополимера при увеличении шероховатости поверхности с 92.0 ± 7.0 до 588.8 ± 16.0 нм наблюдается существенное снижение адгезии и метаболической активности клеток. Фибробласты мыши линии NIH/3T3 слабо удерживаются на поверхности исследуемых пленок и легко смываются с поверхности субстрата в процессе отмывки и окраски.

Известно, что сополимеры п(3-ГБ-со-3-ГВ) в зависимости от содержания гидроксивалерата отличаются по своим физико-химическим свойствам [1]. Ранее нами было показано, что введение 20% ПЭГ в объем сополимера п(3-ГБ-со-3-ГВ) с содержанием 26% ГВ повышало гидрофильность, приводило к снижению шероховатости на воздухе до 57,9 ± 2,0 нм, что способствовало адгезии, распластыванию и пролиферации фибробластов мыши линий L929 и NIH/3T3 и мезенхимальных стромальных фибробластоподобных клеток крысы [1, 3]. В данной работе добавление ПЭГ драматически повысило шероховатость сополимера п(3-ГБ-со-3-ГВ) с содержанием 12% ГВ, что привело к существенному снижению процессов адгезии и пролиферации фибробластов мыши линии NIH/3T3 на поверхности исследуемых образцов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Добавление ПЭГ в состав бактериальных сополимеров одного состава, но отличающихся соотношением мономерных составляющих, по-разному влияет как на физико-химические свойства поверхности (морфология, шероховатость), так и характер ее взаимодействия с клеточными культурами.

Найденный эффект необходимо учитывать при выборе области применения имплантатов на основе бактериальных сополимеров. Так, введение ПЭГ в бактериальный сополимер с 26% ГВ приводит к снижению шероховатости и способствует адгезии, распластыванию и пролиферации фибробластов мыши, что является необходимым функциональным свойством матрикса тканеинженерной конструкции. При концентрации 12% ГВ присутствие ПЭГ в сополимере, напротив, существенно увеличивает шероховатость поверхности и снижает процессы адгезии и пролиферации фибробластов. Такие материалы целесообразно использовать для профилактики образования спаечных процессов, например, в виде биодеградируемого искусственного перикарда при операциях на открытом сердце или при герниопластике грыж передней брюшной стенки в качестве покрытий сетчатых полимерных имплантатов. Естественно, что характер взаимодействия имплантата с клетками будет зависеть не только от физико-химических свойств поверхности материала, но и от вида клеточной культуры. В связи с этим для каждого вида клеток необходимо проведение дополнительных исследований по выяснению влияния физико-химических свойств поверхности на процессы адгезии и пролиферации клеточных культур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Волова Т.Г., Севастьянов В.И., Шишацкая Е.И. Полиоксиалканоаты — биоразрушаемые полимеры для медицины: Монография. 2-е изд., дополн. и переработ. Красноярск, 2006. 288 с.
- 2. Севастьянов В.И., Перова Н.В., Немец Е.А. и др. Примеры экспериментально-клинического применения биосовместимых материалов в регенеративной медицине // Биосовместимые материалы (учебное пособие); под ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. Часть ІІ. Глава З. М.: МИА, 2011. С. 237–252.
- 3. *Сургученко В.А.* Матриксы для тканевой инженерии и гибридных органов // Биосовместимые материалы (учебное пособие); под ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. Часть ІІ. Глава 1. М.: МИА, 2011. С. 199–228.
- 4. *Bartolo L.D., Rende M., Morelli S. et al.* Influence of membrane surface properties on the growth of neuronal cells isolated form hippocampus // Journal of Membrane Science. 2008. Vol. 325. P. 139–149.
- 5. Chang 1 H.-I., Wang Y. Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds in Regenerative medicine and tissue engineering Cells and Biomaterials ed. By Daniel Eberli. 2011. P. 569–588.
- 6. *Chung T.-W., Liu D.-Z., Wang S.-Y. et al.* Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale // Biomaterials. 2003. Vol. 24. P. 4655–4661.
- 7. Dalby1 M.J., Riehle M.O., Sutherland D.S. et al. Morphological and microarray analysis of human fibroblasts cultured on nanocolumns produced by colloidal lithography // European Cells and Materials. 2005. Vol. 9. P. 1–8.
- 8. *Kikuchi M., Kanama D.* Current status of biomaterial research focused on regenerative medicine // Quarterly Review. 2007. 24. P. 51–67.
- 9. Kumbar S.G., Kofron M.D., Nair L.S. et al. Cell behavior toward nanostructured surfaces in Biomedical Nanostructures / Edited by Kenneth E. Gonsalves, Craig R. Halberstadt, Cato T. Laurencin, Lakshmi S. Nair. 2008. P. 261–287.
- 10. *Lim J.Y., Hansen J.C., Siedlecki C.A. et al.* Human foetal osteoblastic cell response to polymer-demixed nanotopographic interfaces // Journal of Royal Society Interface. 2005. Vol. 2. P. 97–108.
- 11. *Singhvi R.*, *Stephanopoulos G.*, *Wang D.I.C.* Effects of substratum morphology on cell physiology // Biotechnol. and Bioeng. 1994. Vol. 43 (8). P. 764–771.
- 12. Xu H., Bhavsar Z.A., Nguyen K.T. Nanoparticles-incorporated scaffolds for tissue engineering applications in Nanotechnology in tissue engineering and regenerative medicine / Edited by Ketul Popat. 2011. Part 14. P. 14-1 14-17.