

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 63, номер 3, 2021

---

---

- Цитогенетическая характеристика диплоидных линий мезенхимных мультипотентных стромальных клеток  
*В. А. Никитина, Т. А. Астрелина, И. В. Кобзева, В. Ю. Нугис, Е. Е. Ломоносова, В. В. Семина, В. А. Брунчуков, Д. Ю. Усупжанова, В. А. Брумберг, А. А. Расторгуева, Т. В. Карасева, А. С. Самойлов* 207
- Клеточно-молекулярные вопросы гемо- и биосовместимости алмазоподобных углеродных пленок. Краткий критический обзор  
*А. Е. Полухина, В. В. Малащенко, А. С. Гренадёр, К. А. Юрова, А. А. Соловьёв, Л. С. Литвинова, И. А. Хлусов* 221
- Экспрессия генов в опухоли и ее микроокружении при фолликулярной лимфоме  
*А. В. Горбунова, Ю. А. Криволапов, Е. С. Божокина, И. В. Евсюков, М. М. Фирулева, П. В. Харченко* 237
- Определение активности цитостатиков в 3D-условиях культивирования в сравнении с монослойной культурой  
*Е. В. Кудан, С. П. Кудан, С. Ш. Каршиева, Ю. Д. Хесуани, В. А. Миронов, Е. А. Буланова* 244
- Морфология поверхности хондросфер после обработки цитохалазином Д  
*А. А. Грядунова, Е. А. Буланова, Е. В. Кудан, В. А. Касьянов, Ю. Д. Хесуани, В. А. Миронов* 256
- Использование коллагена высокой концентрации в тканевой инженерии хряща методом трехмерной биопечати  
*Е. В. Исаева, Е. Е. Бекетов, В. В. Южаков, Н. В. Аргучинская, А. А. Кисель, Е. П. Малахов, Т. С. Лагода, Н. Д. Яковлева, П. В. Шегай, С. А. Иванов, А. Д. Каприн* 260
- Влияние карбодиимида на структурно-механические и биологические свойства коллагеновых пленок  
*Ю. А. Нащекина, М. Ю. Сироткина, Д. М. Дарвиш, И. А. Барсук, О. А. Москалюк, Н. А. Михайлова* 272
- Реконструкция сосудов малого диаметра с использованием тканеинженерной клеточной конструкции на основе поликапролактона  
*Н. М. Юдинцева, Ю. А. Нащекина, М. А. Шевцов, В. Б. Карнович, Г. И. Попов, И. А. Самусенко, Н. А. Михайлова* 281
- Локальный механозависимый вход кальция контролирует активность кальций-зависимых калиевых каналов высокой и низкой проводимости в клетках лимфомы человека  
*В. Ю. Васильева, В. И. Чубинский-Надеждин* 292
- Состояние эритроцитов в посттравматический период черепно-мозговой травмы у крыс при действии цитофлавина. Оценка методом лазерной интерференционной микроскопии  
*А. В. Дерюгина, А. В. Полозова, М. Н. Иващенко, П. С. Игнатьев, В. Б. Метелин* 300
- 
-

# Contents

---

---

Vol. 63, No. 3, 2021

---

---

## Reviews

- The cytogenetic characteristic of mesenchymal multipotent stromal cell diploid lines  
*V. A. Nikitina, T. A. Astrelina, I. V. Kobzeva, V. Yu. Nugis, E. E. Lomonosova, V. V. Semina, V. A. Brunchukov, D. Yu. Usupzhanova, V. A. Brumberg, A. A. Rastorgueva, T. V. Karaseva, A. S. Samoylov* 207
- Cellular and molecular problems of hemo- and biocompatibility of diamond-like carbon films:  
A brief critical review  
*A. E. Polukhina, V. V. Malaschenko, A. S. Grenadyorov, K. A. Yurova, A. A. Solovyeu, L. S. Litvinova, I. A. Khlusov* 221
- 

## Original articles

- Tumor and its microenvironments gene expression in follicular lymphoma  
*A. V. Gorbunova, Yu. A. Krivolapov, E. S. Bozhokina, I. V. Evsyukov, M. M. Firuleva, P. V. Kharchenko* 237
- The determination of cytostatic activity on a 3D spheroids-based model in comparison with conventional monolayer culture  
*E. V. Koudan, S. P. Kudan, S. Sh. Karshieva, Yu. D. Khesuani, V. A. Mironov, E. A. Bulanova* 244
- Chondrospheres Surface Morphology after Cytochalasin D Treatment  
*A. A. Gryadunova, E. A. Bulanova, E. V. Koudan, V. A. Kasyanov, Yu. D. Khesuani, V. A. Mironov* 256
- The use of collagen in a high concentration for the engineering of cartilage tissue with 3D-bioprinting  
*E. V. Isaeva, E. E. Beketov, V. V. Yuzhakov, N. V. Arguchinskaya, A. A. Kisel, E. P. Malakhov, T. S. Lagoda, N. D. Yakovleva, P. V. Shegai, S. A. Ivanov, A. D. Kaprin* 260
- Effect of Carbodiimide on the Structural, Mechanical and Biological Properties of Collagen Films  
*Yu. A. Nashchekina, M. Yu. Sirotkina, D. M. Darvish, I. A. Barsuk, O. A. Moskalyuk, N. A. Mikhailova* 272
- Small-diameter vessels reconstruction using cell tissue-engineering graft based on the poly( $\epsilon$ -caprolactone)  
*N. M. Yudintceva, Yu. A. Nashchekina, M. A. Shevtsov, V. B. Karpovich, G. I. Popov, I. A. Samusenko, N. A. Mikhailova* 281
- Local mechano-dependent calcium influx controls the activity of calcium-dependent potassium channels of big and small conductance in human lymphoma cells  
*V. Yu. Vasileva, V. I. Chubinskiy-Nadezhdin* 292
- Erythrocyte condition in the post-traumatic period of craniocerebral trauma under the action of cytoflavin. Assessment by laser interference microscop  
*A. V. Deryugina, A. V. Polozova, M. N. Ivashchenko, P. S. Ignatiev, V. B. Metelin* 300
- 
-

УДК 57.085.2

## ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИПЛОИДНЫХ ЛИНИЙ МЕЗЕНХИМНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

© 2021 г. В. А. Никитина<sup>1</sup>\*, Т. А. Астрелина<sup>1</sup>, И. В. Кобзева<sup>1</sup>, В. Ю. Нугис<sup>1</sup>, Е. Е. Ломоносова<sup>1</sup>, В. В. Семина<sup>1</sup>, В. А. Брунчуков<sup>1</sup>, Д. Ю. Усупжанова<sup>1</sup>, В. А. Брумберг<sup>1</sup>, А. А. Расторгуева<sup>1</sup>, Т. В. Карасева<sup>1</sup>, А. С. Самойлов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, 123098 Россия

\*E-mail: nikitinava@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.11.2020 г.

После доработки 20.01.2021 г.

Принята к публикации 17.02.2021 г.

Проведено цитогенетическое исследование клеточных линий мезенхимных мультипотентных стромальных клеток (ММСК), выделенных из костного мозга, жировой ткани, плаценты и слизистой оболочки десны человека. Кариологический анализ с использованием двух методов окраски хромосом (GTG и mFISH) показал нормальный диплоидный кариотип большинства линий ММСК до 5 пассажа культивирования. Клональные хромосомные транслокации были выявлены в 3 из 22 исследованных ММСК, что составляет 14%. При анализе 22 линий ММСК выявлена достаточно низкая частота клеток с хромосомными aberrациями (ХА) (в пределах 5%). Среди клеток с хромосомными повреждениями (3–5%), выявленных при mFISH-анализе 1440 метафазных пластинок, на нестабильные хромосомные aberrации (фрагменты, дицентрические хромосомы) приходится около 65, а на стабильные (транслокации) – 35% всех повреждений. Полученные результаты подтверждают важность цитогенетических исследований клеточных линий ММСК, предназначенных для медицинских целей. Накопление данных о хромосомной и кариотипической изменчивости при разных сроках культивирования позволит определить допустимые пределы для отбора генетически стабильных диплоидных клеточных линий ММСК с целью предотвращения нежелательных последствий их применения в терапевтических целях.

**Ключевые слова:** мезенхимные мультипотентные стромальные клетки, кариотип, хромосомные aberrации, клонообразование, мультицветная флуоресцентная гибридизация

DOI: 10.31857/S0041377121030081

К диплоидным клеточным линиям человека относятся однородные клеточные популяции с ограниченным сроком жизни и стабильным кариотипом с диплоидным набором хромосом, их получают из первичных клеточных культур тканей здоровых доноров. Диплоидные линии фибробластоподобных клеток востребованы во многих отраслях науки и практической медицины, а также при производстве вакцинных и иммунобиологических препаратов (Petricciani, 2006; Полянская, 2018). Мезенхимные мультипотентные стромальные клетки (ММСК) – фибробластоподобные, недифференцированные, диплоидные соматические стволовые клетки с ограниченным числом генераций, редко трансформирующиеся и нетуморогенные при введении интактным животным (Soukup et al., 2006; Wang et al., 2012). Высокий проли-

феративный потенциал и способность к образованию больших колоний клеток при культивировании *in vitro* позволяет производить однородную стабильную клеточную популяцию за короткий промежуток времени и делает ММСК удобной моделью изучения биологических процессов у человека. А благодаря значительному регенеративному потенциалу, низкой иммуногенности и быстрой дифференцировке в специализированные типы клеток ММСК востребованы в практической медицине (Mastrolia et al., 2019; Neri, 2019; Costa et al., 2020).

Требования к первичным и перевиваемым клеточным линиям регулируются в РФ общей фармакопейной статьей (ОФС.1.7.2.0011.15), руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Миронов, 2013), федеральным законом 180-ФЗ “О биомедицинских клеточных продуктах”. Кариологический анализ является необходимым элементом в первых двух. Его проведение можно разделить на два этапа: видовая идентификация (анализ набора и строения хромосом, характер-

**Принятые сокращения:** ММСК – мезенхимные мультипотентные стромальные клетки; ХА – хромосомные aberrации; GTG – дифференциальная окраска хромосом с использованием трипсина и красителя Гимза; mFISH – мультицветная флуоресцентная гибридизация *in situ*.

ных для клеток данного биологического вида) и оценка стабильности кариотипа (оценка частоты спонтанных хромосомных аномалий) исследуемой клеточной линии. Часто кариологический анализ линий ММСК, предназначенных для медицинских целей, ограничивается первым этапом. Научные данные о генетической стабильности ММСК человека неоднозначны. Разными авторами продемонстрирована как неизменность кариотипа, так и различные типы клональных и неклональных хромосомных aberrаций (ХА) и анеуплоидий в ММСК (Soukup et al., 2006; Wang et al., 2012; Barcholt et al., 2013; Айзенштадт и др., 2018).

Выявление хромосомных аномалий в любой клеточной популяции, растущей *in vitro*, в первую очередь связано со спонтанным уровнем ХА в клетках донора, имеющим определенный темп возникновения и реализации в популяции человека (Бочков, Чеботарёв, 1989). Он возникает в связи с постоянным воздействием внешних и внутренних мутагенных факторов физической (различных типов излучений, в основном, естественного радиационного фона, экстремальной температуры), химической (химических мутагенов, загрязняющих окружающую среду, некоторых лекарственных препаратов) и биологической (вирусов) природы. Во вторую — с aberrантными клетками, возникшими *de novo* уже в процессе культивирования при отсутствии тканевой регуляции. ХА могут стать причиной возникновения мутаций в генах, контролирующих процессы клеточной пролиферации, дифференцировки и гибели, что ведет к генетической нестабильности клеток и, возможно, к злокачественной трансформации (Rangel, 2017). Поддержание нормального кариотипа является надежным индикатором генетической стабильности и может рассматриваться как критерий медицинского использования клеточной линии (Borgonovo et al., 2014).

Целью настоящего исследования стало описание кариотипов и оценка частот ХА в клеточных линиях ММСК человека, выделенных из разных тканей. Использовали два метода кариотипирования — GTG и mFISH, которые позволяют с одинаковой чувствительностью оценить состав хромосом в кариотипе, провести анализ отдельных хромосом, определить ХА размером более 5–10 млн пар нуклеотидов, а также описать точки разрывов хромосом в ММСК здоровых доноров.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали клеточные линии ММСК, выделенные из: аспиратов костного мозга после пункции подвздошной кости; липоаспирата передней брюшной стенки; слизистой оболочки зубодесневых карманов; пупочного канатика; плодной части плаценты (хориональной пластинки и ворсин плаценты) человека. Линии одного происхождения были получены от разных здоровых доноров.

Плаценту получали от рожениц с одноплодной, физиологически протекавшей беременностью, закончившейся нормальными родами после самостоятельного или оперативного родоразрешения. Информированное согласие на забор, сохранение и использование было получено от 22-х доноров клеточного материала (табл. 1). Клеточные линии из плодной части плаценты и пупочного канатика при изложении результатов исследования объединены в одну группу “ММСК плаценты”, так как они имеют общее происхождение в эмбриогенезе внезародышевых органов.

Для выделения ММСК использовали механический (в случае костного мозга) или ферментативный метод (остальные ткани). Костный мозг разводили в равном объеме фосфатно-солевого буферного раствора pH 7.4 (Stem Cell Biology, USA) и наслаивали на рабочий раствор с градиентом плотности (1.077 г/л), центрифугировали 30 мин при 400 g. Мононуклеарные клетки, собранные с границы раздела фаз, дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (при 300 g, 7 мин).

Липоаспират отмывали фосфатно-солевым буфером и суспендировали, после чего подвергали ферментативной диссоциации с помощью 0.1%-ной коллагеназы I типа (Worthington Biochemical Corporation, США). Деагрегацию ткани проводили на магнитной мешалке при температуре 37°C в течение 40 мин, затем центрифугировали 7 мин при 300 g.

Биоптат слизистой десны инкубировали в среде, содержащей DMEM F12, 2% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 200 Ед/мл пенициллина, 200 мг/мл стрептомицина, 200 Ед/мл амфотерицина и 100 Ед/мл гентамицина (StemCell Technology, США), при 37°C не менее 8 ч. Затем диспергировали и инкубировали в 0.25%-ном растворе трипсин—EDTA при 37°C в течение 1 ч, отмывали фосфатно-солевым буфером и инкубировали в 0.15%-ной коллагеназе II типа (Sigma, США) при 37°C в течение 2 ч.

Фрагменты пупочного канатика, хориональной пластинки или ворсин плаценты тщательно промывали фосфатно-солевым буфером и подвергали ферментативной диссоциации с помощью 0.075%-ной коллагеназы I типа (Worthington Biochemical Corporation, США) в течение 40 мин при 37°C. Далее проводили фильтрацию через нейлоновое сито с размером пор 100 мкм (Corning, США), центрифугировали при 300 g 7 мин.

Полученные клеточные суспензии высаживали в вентилируемые культуральные флаконы при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в культуральной среде MesenCult™ MSC Basal Medium Human (Stem Cell Biology, США). Через 1–3 сут неприлипшие клетки удаляли сменной среды. Через 14 сут клетки снимали с пластика с помощью 0.25%-ного раствора трипсин—EDTA и затем пассировали каждые 7 сут до окончания культивирования. Все клеточные линии культивировали в одинаковых условиях в бессывороточной среде Mes-

Таблица 1. Краткое описание клеточных линий и метода цитогенетического исследования

Линия	Описание источника клеточной линии	Метод
BM136	Аспират костного мозга из задней ости подвздошной кости мужчины	GTG
BM175	Аспират костного мозга из задней ости подвздошной кости мужчины	GTG
BM183	Аспират костного мозга из задней ости подвздошной кости женщины	GTG mFISH
BM231	Аспират костного мозга из задней ости подвздошной кости мужчины	mFISH
DB1	Аспират костного мозга из задней ости подвздошной кости мужчины	mFISH
LB1	Аспират костного мозга из задней ости подвздошной кости мужчины	mFISH
Adip360	Липоаспират передней брюшной стенки женщины	mFISH
Adip381	Липоаспират передней брюшной стенки женщины	mFISH
Adip442	Липоаспират передней брюшной стенки женщины	mFISH
Adip685	Липоаспират передней брюшной стенки мужчины	GTG
Adip690	Липоаспират передней брюшной стенки мужчины	GTG
Chor-354	Плодная часть плаценты, срок гестации: 39 нед., самостоятельные роды	mFISH
E1	Плодная часть плаценты, срок гестации: 40 нед., кесарево сечение	mFISH
PEpl-10	Плодная часть плаценты, срок гестации: 39 нед., кесарево сечение	mFISH
PE12	Плодная часть плаценты, срок гестации: 36 нед., кесарево сечение	GTG
Plac115	Плодная часть плаценты, срок гестации: 39 нед., кесарево сечение	GTG
Plac186	Плодная часть плаценты, срок гестации: 39 нед., кесарево сечение	GTG
Plac674	Плодная часть плаценты, срок гестации: 36 нед., кесарево сечение	GTG
Plate352	Плодная часть плаценты, срок гестации: 40 нед., кесарево сечение	mFISH
Vart351	Вартонов студень пупочного канатика, срок гестации: 39 нед., самостоятельные роды	mFISH
Dg15	Слизистая оболочка десны зубодесневых карманов мужчины	GTG
Ging-Ram	Слизистая оболочка десны зубодесневых карманов мужчины	mFISH

enCult™ MSC Basal Medium Human (Stem Cell Biology, США).

Принадлежность к ММСК оценивали с учетом требований международной организации клеточной терапии (Dominici et al, 2006). Дифференцировку клеток проводили по стандартным методикам согласно инструкции производителя (Biological Industries, США). На 3-ем пассаже при достижении клетками 80–90% конfluence проводили смену питательной среды на индукционные среды: полные питательные среды с дифференцировочными факторами для остеогенной (MSCgo™ Osteogenic XF dif-

ferentiation media; Biological Industries, США), хондрогенной (MSCgo™ Chondrogenic differentiation medium; Biological Industries, США) и адипогенной (MSCgo™ Adipogenic XF differentiation media; Biological Industries, США) дифференцировки. В качестве контроля использовали ММСК тех же образцов и пассажей, культивированные в стандартной ростовой среде без добавления дифференцировочных добавок.

Иммунофенотип ММСК исследовали на проточном цитометре BDFACS Canto II. Окрашивание клеток проводили с помощью моноклональных антител

против поверхностных антигенов CD90, CD73, CD105, CD34, CD45, HLA-DR, конъюгированных с флюорохромами в соответствии с рекомендациями производителя (BDBiosciences, США).

Для контроля происхождения и отсутствия кросс-контаминации клеточных линий проводили анализ коротких tandemных повторов (STR-типирование) с использованием набора реагентов COrDIS Plus (Гордиз, Россия). Для выделения ДНК использовали ПЦР-совместимый реагент для лизиса COrDIS Sprint (Гордиз, Россия), а также мультиплексную амплификацию 19-ти STR-маркеров и локуса амелогенина человека; капиллярный электрофорез выполняли по инструкции производителя (Гордиз, Россия).

Для проведения цитогенетического исследования через 2–3 сут после пассирования клеток при достижении клетками фазы логарифмического роста во флакон добавляли колхицин на 4–5 ч, в отдельных случаях – на 18 ч для накопления митотических клеток. После этого клетки снимали со дна флакона с помощью раствора трипсин–ЭДТА (StemCell, США) (2–5 мин при 37°C). Гипотонизацию проводили 0.55%-ным раствором KCl (10 мин при 37°C). Фиксировали клетки смесью метилового спирта и ледяной уксусной кислоты (в соотношении 3 : 1) с использованием 3-х смен фиксатора. Полученные клеточные суспензии раскапывали на охлажденные влажные стекла и подсушивали. Для GTG-анализа цитогенетические препараты обрабатывали 0.25%-ным трипсином и окрашивали красителем Гимза.

Для окраски mFISH цитогенетические препараты подвергали щелочной денатурации, проводили гибридизацию с дифференциально мечеными специфичными ДНК-зондами (24Xyte; MetaSystems, Germany) в течение 24–48 ч. Затем препараты отмывали в растворе 0.4-кратного SSC при 72°C 2 мин и в растворе 2-кратного SSC-Tween 20, 30 с при комнатной температуре, контрастировали красителем DAPI, следуя протоколу производителя (MetaSystems, Germany). Препараты автоматически сканировали и фотографировали, а затем анализировали с помощью программного обеспечения Ikarus или Isys (Metasystems, Германия). Для анализа отбирали метафазные пластинки, в том числе полиплоидные, по принципу общей цитологической пригодности. Количество полиплоидных клеток (%) оценивали по общепринятым критериям (Миронов, 2013) с помощью микроскопа при увеличении объектива 10× при анализе 500–1000 метафазных пластинок после сканирования препарата в системе MetaSystems Metafer (Metasystems, Германия). Признаком клональной в соответствии с международной цитогенетической номенклатурой (Shaffer et al., 2013) считали выявление трех идентичных клеток с гипопloidией или двух с гиперплоидией или структурной хромосомной аномалией.

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали *t*-критерий Стьюдента при альтернативной изменчивости. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы с уровнем значимости  $P < 0.05$  (Рокицкий, 1967).

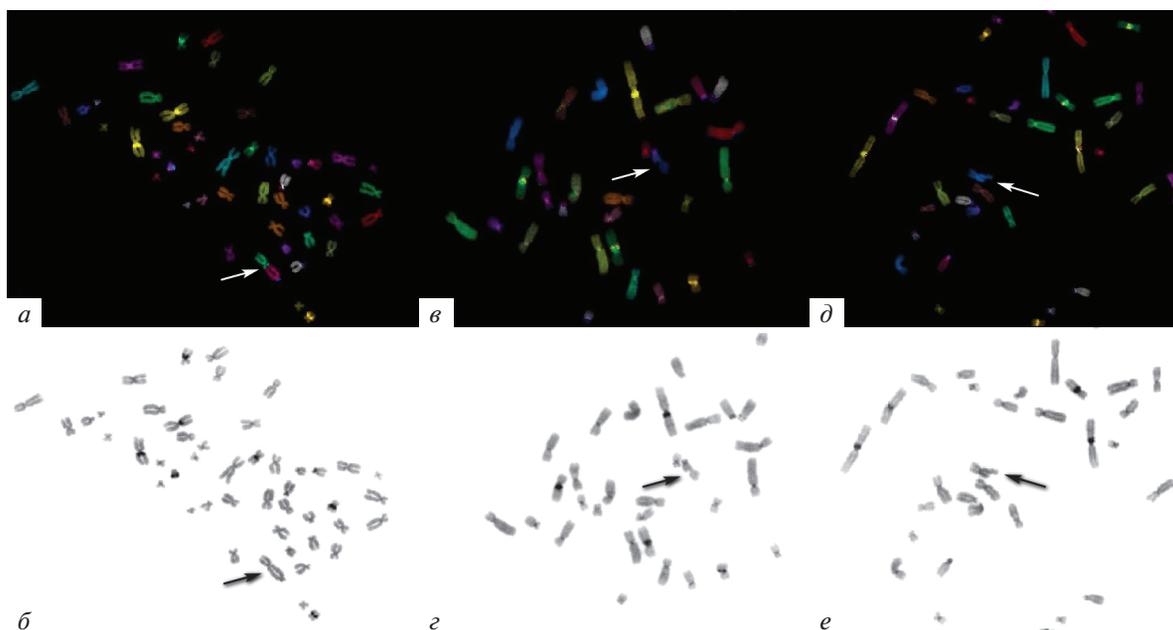
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведено исследование 22-х линий ММСК человека, выделенных из разных источников: костного мозга (6), жировой ткани (5), плаценты (9), слизистой оболочки десны (2) (табл. 1). Первичные культуры разных тканей отличались по клеточному составу. Наряду с веретеновидными клетками в культурах костного мозга наблюдали округлые клетки без митотического рисунка с частичным прикреплением к пластику, плацентарных тканей (распластанные клетки полигональной или звездчатой формы с несколькими отростками), жировой ткани (полигональные клетки с вакуолями в цитоплазме) и слизистой десны (эпителиоподобные клетки). После первого пассажа клеточные линии, выделенные из разных тканей, морфологически практически не отличались, были гомогенными по клеточному составу, состояли из фибробластоподобных клеток с четко очерченным ядром, перинуклеарной зернистостью и длинными отростками, образующими многослойные колонии.

Вне зависимости от первичного источника, во всех линиях ММСК была подтверждена способность клеток к дифференцировке в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях (данные не представлены). При анализе иммунофенотипа с помощью проточной цитометрии во всех клеточных линиях, вне зависимости от первичного источника, было выявлено присутствие в большом количестве (более 96%) маркеров ММСК: CD90 (N-гликозилированный заякоренный белок с вариабельным иммуноглобулиноподобным доменом), CD105 (эндоглин), CD73 (экто-5'-нуклеотидаза); и малое количество (менее 1.7%) маркеров гемопоэтического и лимфоцитарного происхождения – CD34, CD45, а также HLA-DR.

Анализ амплифицированных ПЦР-продуктов STR-локусов (электрофореграммы STR-профилей не представлены) подтвердил стабильность генетических профилей и отсутствие кросс-контаминации в исследованных клеточных образцах при культивировании.

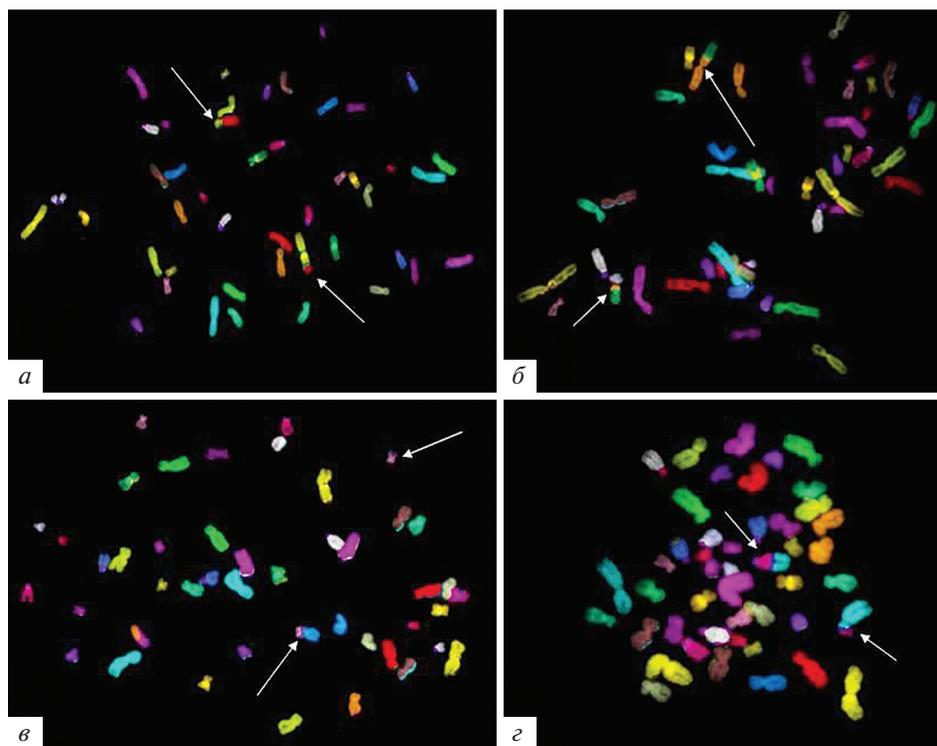
Конституциональный кариотип доноров всех клеточных линий был нормальным: 46,XX (женский) или 46,XY (мужской). Для анализа хромосомной изменчивости во всех исследованных клеточных линиях оценивали частоты возникновения ХА: одиночных и парных фрагментов, внутри- и межхромосомных хроматидо-хроматидных обменов, крупных делеций, дупликаций и инверсий, сбалансированных и несбалансированных транслокаций, дисцентри-



**Рис. 1.** Фрагменты метафазных пластинок с хромосомными aberrациями. Окраска по методу FISH (*a, б, д*) и красителем DAPI (инвертированное изображение) (*б, г, е*). *Стрелками* обозначены: дицентрическая хромосома (*a, б*) и хроматидные фрагменты (*б, г, д, е*).

ческих хромосом (рис. 1, 2). Попарное межлинейное сравнение долей aberrантных клеток во всех линиях ММСК из разных источников показало отсутствие

значимых различий между линиями от разных доноров из одинаковых и разных источников при разных методах окраски хромосом (во всех случаях  $P > 0.01$ ).



**Рис. 2.** Метафазные пластинки со сбалансированными хромосомными транслокациями между хромосомами 1 и 15 (*a*), 8 и 9 (*б*), хромосомами X и 17 (*в*), 2 и 15 (*д*); перестроенные хромосомы обозначены *стрелками*, окраска mFISH.

Таблица 2. Хромосомная изменчивость в линиях ММСК

Линия	Метафазы, %	Хромат. фрагменты, %	Хромос. фрагменты, %	ТЛ, %	ДЦ, %	Доли клеток с ХА, %
Окраска GTG						
BM136	43	0(0)	0(0)	1(233)	0(0)	2.33 ± 2.30
BM175	35	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0.00 ± 2.63
BM183	33	0(0)	1(303)	1(303)	0(0)	6.06 ± 4.15
Adip685	50	1(20)	0(0)	0(0)	0(0)	2.00 ± 1.98
Adip690	25	1(40)	0(0)	0(0)	0(0)	4.00 ± 3.90
Plac115	27	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0.00 ± 3.03
Plac186	66	0(0)	0(0)	2(303)	0(0)	3.03 ± 2.11
Plac674	40	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0.00 ± 2.09
PE12	105	1(095)	0(0)	1(095)	0(0)	1.90 ± 1.33
Dg15	22	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0.00 ± 4.00
Всего метафаз	446					
M ± m, %		067 ± 039	023 ± 022	112 ± 050	0 ± 0	<b>2.02 ± 0.67</b>
Окраска mFISH						
BM183	115	3(261)	0(0)	0(0)	0(0)	2.61 ± 1.49
DB1	100	2(2)	0(0)	2(2)	0(0)	4.00 ± 1.96
LB1	64	0(0)	1(156)	1(156)	0(0)	3.13 ± 2.17
BM231	31	2(646)	1(3.23)	1(323)	0(0)	12.92 ± 6.02
Adip360	61	0(0)	1(164)	2(328)	0(0)	4.92 ± 2.77
Adip381	16	0(0)	0(0)	1(625)	0(0)	6.25 ± 6.05
Adip442	31	0(0)	0(0)	0(0)	1(323)	3.23 ± 3.17
Vart351	43	0(0)	0(0)	1(233)	0(0)	2.33 ± 2.30
Plate352	33	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0.00 ± 2.79
E1	122	0(0)	2(164)	0(0)	0(0)	1.64 ± 1.15
Ging-Ram	49	0(0)	1(204)	0(0)	0(0)	2.04 ± 2.02
Всего метафаз	665					
M ± m, %		1.05 ± 0.40	0.91 ± 0.37	1.20 ± 0.42	0.15 ± 0.15	<b>3.31 ± 0.69</b>

Примечание к табл. 2, 3. ХА – хромосомные aberrации; Хромат., Хромос. – хроматидные, хромосомные соответственно; ТЛ – транслокации; ДЦ – дицентрические хромосомы.

В среднем, при окраске GTG было выявлено ХА в ММСК костного мозга  $2.80 \pm 1.56\%$ , жировой ткани –  $3.00 \pm 1.97\%$ , плаценты –  $1.23 \pm 0.71\%$ , десны –  $0 \pm 0\%$ ; статистически достоверные отличия между этими группами отсутствуют ( $P > 0.05$ ). Суммарная частота ХА при анализе 446 метафаз, окрашенных методом GTG, составила  $2.02 \pm 0.67\%$ . При окраске mFISH было выявлено ХА в ММСК костного мозга в среднем  $5.66 \pm 1.31\%$ , жировой ткани –  $4.80 \pm 2.06\%$ , плаценты –  $1.32 \pm 0.71\%$ , десны –  $2.04 \pm 2.02\%$ ; статистически достоверные отличия между этими значениями отсутствуют ( $P > 0.05$ ). Суммарная частота ХА в mFISH-окрашенных метафазах ММСК составила  $3.31 \pm 0.69\%$  (табл. 2).

**Кариотип клеточных линий PEp1-10 и Chog-354.** Для изучения структуры кариотипа ММСК был проведен расширенный цитогенетический анализ

методом mFISH двух линий, выделенных из плацентарной ткани (PEp1-10 и Chog-354, табл. 3). В 96.6% случаев (426 из 441 митотических клеток) линии PEp1-10 был определен нормальный диплоидный кариотип 46,XX, а в 3.4% случаев выявлены ХА (табл. 3). 67% ХА приходилось на хроматидные, хромосомные фрагменты и дицентрические хромосомы с парными фрагментами а 33% ХА – на транслокации, в том числе робертсоновские.

Из 334 метафаз линии Chog-354 в 17 (5.1%) были выявлены хромосомные повреждения, 312 (93.4%) имели нормальный кариотип. Остальные клетки (1.5%) несли клональные перестройки, ХА в них учитывали как одно событие. Расчет доли ХА проводили исходя из общего числа проанализированных клеток. Соотношение частот хромосомных транслокаций и фрагментов составило 35 к 65. Кроме того, в

Таблица 3. Хромосомные aberrации в клеточных линиях REp1-10 и Chor354

Линия ММСК	Метафазы	Хромат. фрагменты	Хромос. фрагменты	ТЛ	ДЦ	Всего ХА
REp1-10	441 (100%)	4 (0.91%)	4 (0.91%)	5 (1.13%)	2 (0.45%)	15 (3.40 ± 0.86%)
Chor-354	334 (100%)	5 (1.50%)	6 (1.80%)	6 (1.80%)	0 (0%)	17 (5.09 ± 1.20%)

Выявленные ХА: t(3;10;22)(p13;q112;q112); t(11;14)(q12;p112); t(12;14)(p112;p112); rob(14;22)(q10;q10); t(16;20)(p112;p112),chr(16;20)(p112;p112); dic(7;14)(q112;q24),chr(7;14)(q112;q24)x2; dic(10;11)(q23;q13),chr(10;11)(q23;q13); chtb(X)(q22); chtb(6)(q14); chtb(7)(q22); chtb(14)(q24); chr(X)(q22); chr(1)(p22); chr(2)(p21); chr(6)(q21)

ХА, выявленные в диплоидных клетках: t(X;17)(p221;q21) [3]; t(1;5)(q31;p13) [4]; t(1;10)(p361;q112); t(2;6;16)(q31;q25;q112); t(8;21)(p21;p112); rob(14;14)(p10;p10); chtb(1)(p31); chtb(3)(q22); chtb(8)(q13); chtb(14)(q23); chtb(19)(p12); chr(X)(q27); chr(6)(q12); chr(8)(q23); chr(10)(q24); chr(17)(p12); chr(19)(p13)  
 полиплоидных клетках\*: t(2;6;16)(q31;q25;q112)x2; t(11;14)(q22;q24); t(14;22)(p112;q112); chtb(X)(p21); chtb(2)(q32); chtb(3)(q26); chr(6); chr(X)(?); chr(1)(p10)

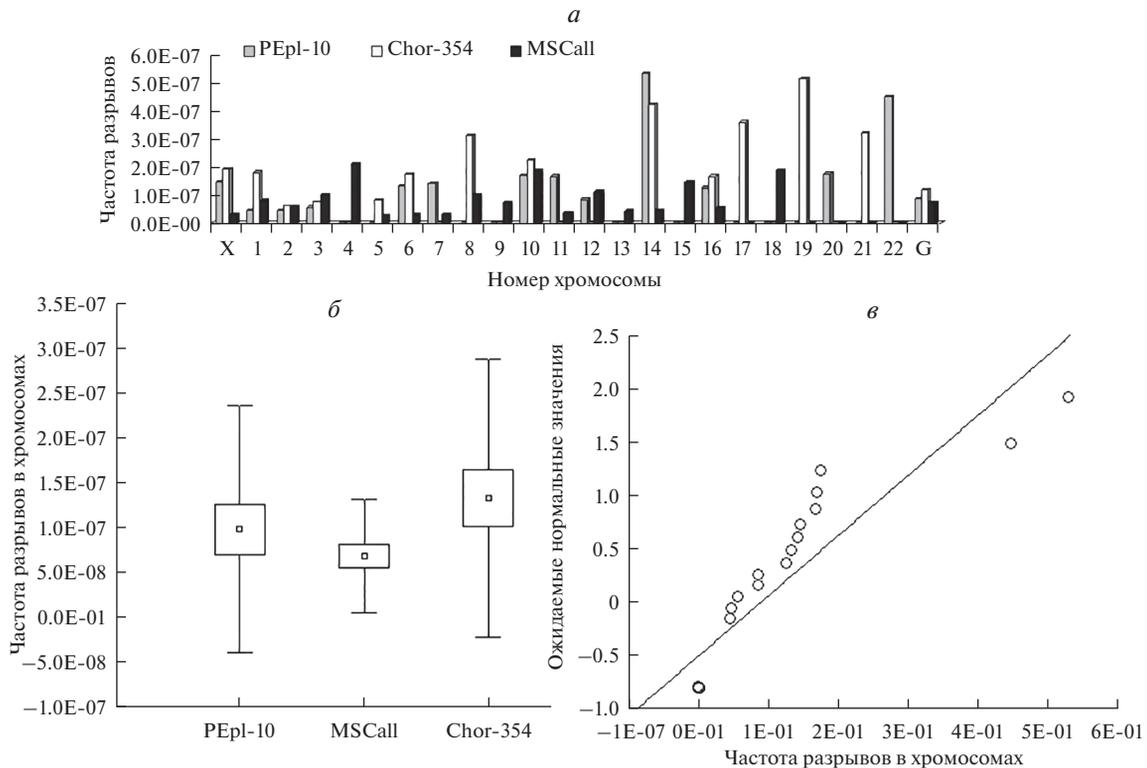
Курсивом выделены клональные ХА, в квадратных скобках указано их число; t – транслокация, rob – робертсоновская транслокация, dic – дицентрическая хромосома, chtb – хроматидный разрыв, chr – хромосомный разрыв. \* ХА, выявленные в полиплоидных клетках, не учитывали при подсчете среднего; полиплоидные клетки не входят в общее число проанализированных метафаз.

этой линии выявили три клональных ХА со структурными сбалансированными маркерными перестройками хромосом (см. ниже), одна из которых была дублирована в полиплоидной клетке, то есть повреждение произошло в диплоидной клетке до полиплоидизации.

**Распределение спонтанных разрывов хромосом по геному в ММСК.** На рис. 3 представлены результаты распределения частот разрывов на 1 Мб (1 млн пар оснований) длины каждой из хромосом, рассчитанные с использованием геномной базы Human Genome Assembly, версии GRCh38.p13. Клональные aberrации учитывались как одно событие. Всего 1776 метафазных клеток и 93 хромосомных повреждения были проанализированы в клеточных линиях REp1-10, Chor-354 и в объединенной группе ММСК из разных тканей. Средние частоты разрывов хромосом в этих группах не отличались ( $P > 0.05$ ). При анализе межхромосомных колебаний частот разрывов статистически достоверных отличий не выявлено в Chor-354 и в объединенной группе ММСК. В кле-

точной линии REp1-10 разрывы в хромосомах 14 и 22 возникали чаще, чем в других (достоверные отличия от основной генеральной совокупности данных,  $t$ -критерий  $P < 0.05$ ) (рис. 3).

**Клональные ХА.** Эти ХА были обнаружены в 3-х из 22-х исследованных клеточных линий (двух из костного мозга и одной из плацентарной ткани). Все клоны были небольшими, появлялись до 5-го пассажа культивирования. В клональных aberrациях были задействованы хромосомы X, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 15, 16, 17. В двух линиях ММСК, выделенных из костного мозга – VM136 и LB1 – выявлены малочисленные клоны с кариотипами 46,XY,t(1;15)(q12;q21) (рис. 4) и 46,XY,t(4;7)(q21;q22), составляющие 4.6 ± 3.2% и 3.1 ± 2.2% соответственно. В клетках Chor-354 выявлено сразу три клона клеток с хромосомными перестройками, доли которых составляют 0.9 ± 0.52, 1.2 ± 0.6 и 0.3 ± 0.3%. Для двух первых были характерны простые реципрокные сбалансированные транслокации с участием двух хромосом: 46,X,t(X;17)(p22.1;q21) и 46,XX,t(1;5)(q31;p13) (рис. 4). В третьем клоне была



**Рис. 3.** Распределение частот разрывов хромосом на 1 млн пар оснований (1 Mb) в ММСК линий PEpl-10, Chor-354 и в объединенной группе ММСК (MSCall). *а* – Средние частоты разрывов (столбцы) по каждой из хромосом, X – половая хромосома X, G – средняя частота разрывов хромосом. *б* – Средние частоты разрывов хромосом (квадратик внутри столбца), ошибки средних значений (верхняя и нижняя границы столбца), стандартное отклонение (вертикальные отрезки). *в* – Распределение частот разрывов хромосом (кружки) в клеточной линии PEpl-10; прямая линия – ожидаемые значения нормального распределения. Хромосомы 14 и 22 отличаются от основной генеральной совокупности данных ( $P < 0.05$ ).

определена комплексная перестройка с участием хромосом 2, 6 и 16 с образованием трех дериватов:  $der(2)(2pter \rightarrow 2q31::16q11.2 \rightarrow 16qter)$ ;  $der(6)(6pter \rightarrow 6q25::2q31 \rightarrow 2qter)$ ;  $der(16)(16pter \rightarrow 16q11.2::6q25 \rightarrow 6qter)$ . Такая же перестройка была дублирована в одной из полиплоидных клеток.

**Полиплоидия.** Частота встречаемости полиплоидных делящихся клеток в линиях ММСК значительно варьировала (от 0 до 24.6%, табл. 4). В целом, в клетках линий, выделенных из плаценты, частота полиплоидов была выше (13.6%) по сравнению с клетками линий, выделенных из костного мозга (7.02%), жировой ткани (7.48%) и десны (2.0%). Пределы варибельности частоты полиплоидных клеток были наименьшими в ММСК, выделенных из плаценты (7.6–18.6%) по сравнению с клетками линий из костного мозга (1.8–17.1%) и жировой ткани (0–24.6%).

При кариотипическом анализе в 4-х плацентарных ММСК (Vart351, E1, PEpl-10 и Chor354) на 3–5 пассажах культивирования были выявлены эндомтозы (эндоредупликации), обнаружившиеся в виде квадрихромосом в метафазе (рис. 5). Это тип полиплоидии, характерный для быстроделющихся тканей,

при котором после репликации ДНК хромосомы не расходятся к полюсам.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Первичные культуры ММСК имели фенотипические особенности, свойственные тканям, из которых они были выделены. Ко второму passages культуры исследованные клеточные линии можно было охарактеризовать как однородные фибробластоподобные, со схожими уровнями иммунологических маркеров.

Несмотря на то, что разные по происхождению ММСК окрашивали разными методами, мы заметили некоторые особенности при определении ХА при GTG- и mFISH-анализах. Разные методы в равной степени хорошо выявляли хромосомные транслокации (1.12 и 1.2% соответственно; табл. 2), но не ацентрические фрагменты и дицентрические хромосомы с парными фрагментами. Фрагменты визуализировались хуже после обработки препаратов трипсином (GTG-окраска), чем при DAPI-контрастировании хромосом (mFISH). От общего числа хромосомных повреждений на них приходилось 44% при GTG- и

Таблица 4. Частоты полиплоидии в разных линиях ММСК

Линия	Метафазы	ПП-метафазы, %	Линия	Метафазы	ПП-метафазы, %
BM136	645	2.3 ± 0.6	Dg15	1000	2.0 ± 0.4
BM175	525	17.1 ± 1.6	Ging-Ram	812	2.0 ± 0.5
BM183	660	9.2 ± 1.1	Vart351	516	18.6 ± 1.7
DB1	1000	1.8 ± 0.4	Plate352	660	12.1 ± 1.3
LB1	960	2.0 ± 0.4	E1	1098	15.6 ± 1.1
BM231	775	9.7 ± 1.1	Plac186	660	7.6 ± 1.0
Adip360	610	24.6 ± 1.7	Plac674	600	12.5 ± 1.3
Adip381	512	6.3 ± 1.1	PE12	1050	15.2 ± 1.1
Adip442	496	6.5 ± 1.1	PEpl-10	995	11.5 ± 1.0
Adip685	875	0 ± 0.1	Chor-354	668	13.8 ± 1.3
Adip690	920	0 ± 0.1	115pl-p4	1000	15.2 ± 1.1

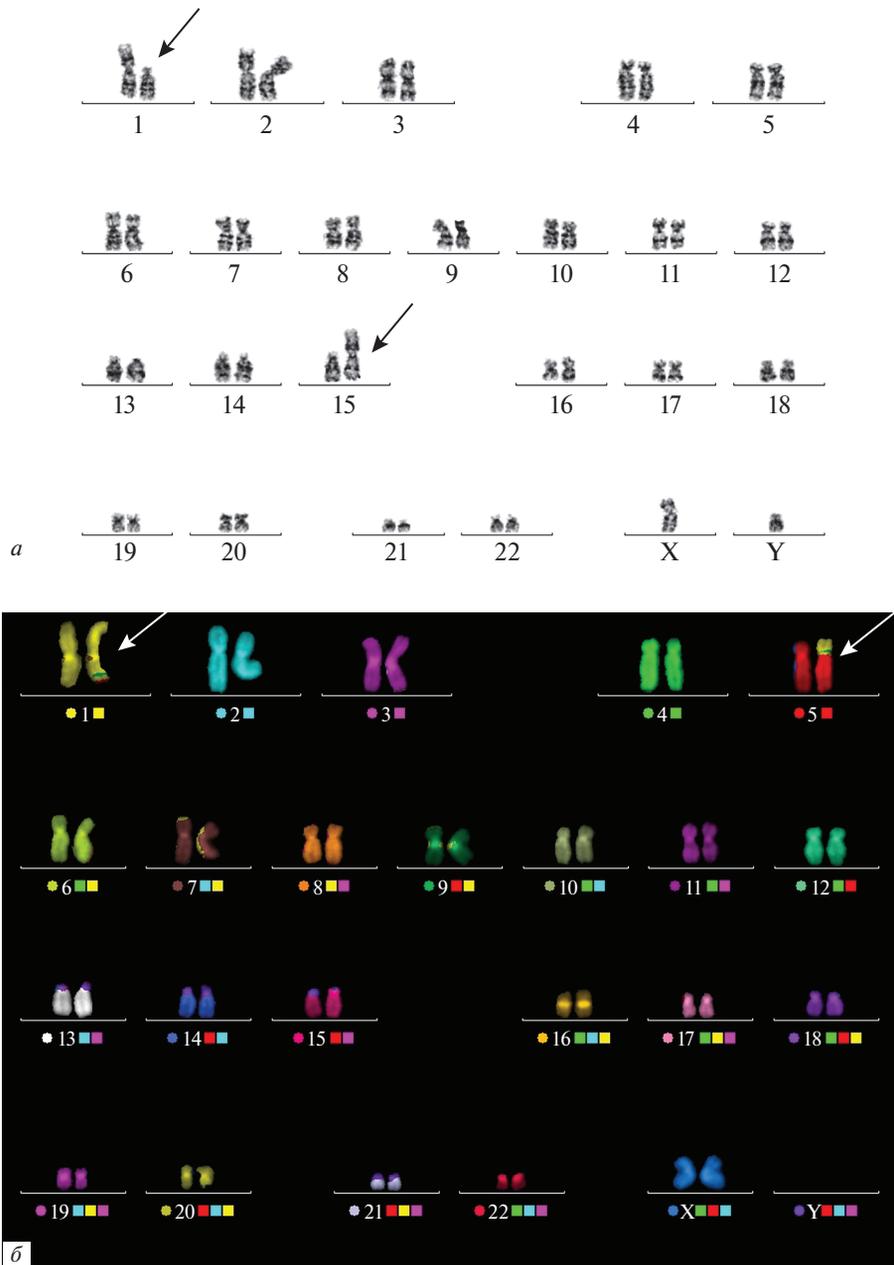
ПП – полиплоидные.

59% при mFISH-окраске. Примерное соотношение (65 : 35) между нестабильными (хромосомные и хроматидные фрагменты, дицентрические хромосомы) и стабильными (транслокации) абберациями было характерно для всех исследованных ММСК при окраске mFISH, а при GTG-анализе оно составляло 44 : 56 (табл. 2, 3). Метод mFISH позволил более точно и однозначно интерпретировать большинство ХА в метафазах с разной степенью конденсации ДНК.

Средние значения частот неклональных ХА составили 2–3% и соответствовали ранее описанным для ММСК (Бочков, Никитина, 2008). Неклональные ХА выявляли в ММСК человека, выделенных из кожи век, костного мозга, вены пупочного канатика (Duarte et al., 2012; Borgonovo et al., 2014; Полянская, 2018). Исследование частот ХА является актуальной задачей при оценке генетической стабильности ММСК. Высокая частота хромосомных повреждений может быть признаком кариотипической нестабильности (Полянская, 2018) и причиной инактивации генов опухолевой супрессии и амплификации онкогенов в культивируемых клеточных линиях (Borgonovo et al., 2014).

Нестабильность отдельных районов хромосом можно описать распределением разрывов в них. Исходя из того, что основной вклад в спонтанный уровень ХА в неопухолевых клетках человека вносит естественный фон радиации, распределение разрывов по хромосомам должно было быть равномерным. Это подтвердилось для среднегрупповых значений ММСК из разных тканей и клеток линии Chor-354, но не для клеточной линии PEpl-10, в которой разрывы в хромосомах 14 и 22 происходили чаще, чем в других. Однако небольшое количество выявленных мутационных событий пока не позволяет сделать окончательный вывод о специфичности хромосомных повреждений и тканевой или индивидуальной вариабельности. На ранних пассажах (3–5) в процессе адаптации к условиям культивирования в клеточных линиях могут возникать разные типы ХА, их описание и анализ частот являются важными задачами регулирования вопросов о цитогенетической пригодности биомедицинских продуктов.

В независимых исследованиях в ММСК были описаны цитогенетические клоны с три- и тетрасомией 8, моносомией 6, сбалансированными хромосомными транслокациями (Бочков и др., 2007; Буя-



**Рис. 4.** Кариограммы с клональными хромосомными транслокациями (обозначены стрелками). *а* – клетки VM136: 46,XY,t(1;15)(q12;q21), окраска GTG; *б* – клетки Chor-354: 46,XX,t(1;5)(q31;p13), окраска mFISH.

новская и др., 2009; Serakinci et al, 2014; Nikitina et al, 2018; Кольцова и др., 2020) на разных пассажах культивирования. При длительном культивировании рост патологических клонов мог прекращаться, приостанавливаться или значительно подавлять пролиферацию нормальных клеток в культуре. Например, по результатам исследования линии VM136, не вошедшим в эту статью, клон с транслокацией  $t(1;15)$  не удалось выявить уже на 7 пассаже культивирования.

Мы наблюдали клонообразование клеток с цитогенетическими нарушениями в 14% (3-х из 22) ММСК до 5-го пассажа культивирования. Все кло-

ны были небольшими и не превышали 10%-ный уровень, допустимый Международным обществом по клеточной терапии (Barkholt et al., 2013). Линия Chor-354 отличалась от двух остальных выраженной хромосомной нестабильностью как в диплоидных, так и в кариотипированных полиплоидных клетках. Кроме того, в ней было выявлено сразу три клональных транслокации, причем, одна из них была дублирована в полиплоидной клетке. Известно, что полиплоидия является компенсаторным механизмом восполнения части потерянного в результате делеций, анеуплоидий и несбалансированных перестро-

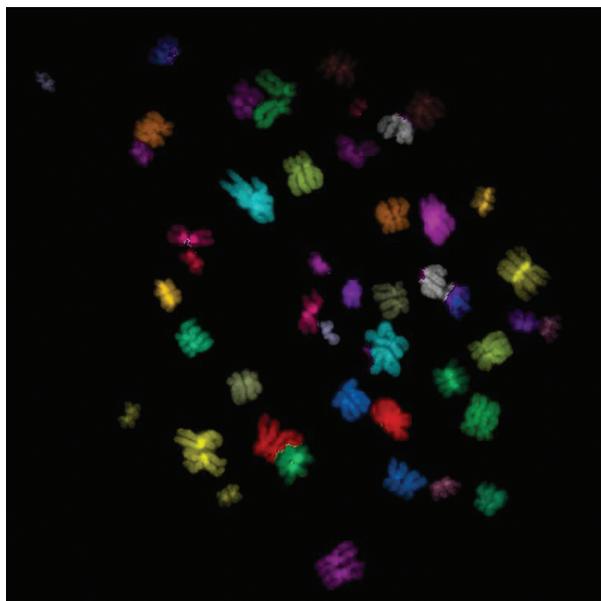


Рис. 5. Пример клетки с эндоредупликацией, окраска mFISH.

ек генетического материала при формировании субклонов в процессе адаптации постоянных опухолевых клеточных линий к условиям *in vitro* (Мамаева, 1996). С другой стороны, прогрессию хромосомной нестабильности и анеуплоидии в полиплоидных клетках рассматривают как важное звено патогенеза злокачественных опухолей и тканевых нарушений, связанных со старением (Tanaka et al., 2018).

Полиплоидия встречается и в физиологических условиях в некоторых тканях человека (Tanaka et al., 2018), в диплоидных клеточных линиях фибробластов она может достигать 3–5%, в ММСК костного мозга после культивирования – до 2% (Borgonovo et al., 2014). По результатам некоторых научных исследований (Grimes et al., 2009; Borgonovo et al., 2014) и нашим данным частота полиплоидов может широко варьировать не только в клеточных линиях из разных источников и от разных доноров, но и в разных популяциях одной линии ММСК (Кольцова и др., 2020). Повышенная частота полиплоидии в линиях плаценты в нашей работе требует дальнейшего изучения с использованием дополнительных методов анализа (интерфазной цитогенетики, измерения количества ДНК в клетке). В тоже время, полученные данные могут свидетельствовать о тканевой принадлежности полиплоидных клеток, что косвенно подтверждается сведениями о присутствии клеток с эндоредупликациями в тканях плаценты человека (Edgar et al., 2014). Также известно, что высокая частота тетраплоидии в прямых препаратах хориона довольно регулярно встречается, причем при развивающейся нормальной беременности эта форма полиплоидии может быть ограничена исключительно пла-

центой (Баранов, Кузнецова, 2007). А в первичных культурах ворсин хориона человека доля полиплоидных клеток может достигать 12% (Grimes et al., 2009).

В большинстве исследованных линий около 90% клеток имели нормальный диплоидный кариотип. В клетках Chor-354 это значение с учетом полиплоидии (13.8%), спонтанных ХА (5.1%) и клонов (2.4%) составило всего около 79%. Допустимое количество клональных, неклональных хромосомных или геномных нарушений для диплоидных клеточных линий ММСК можно обсуждать в связи с их назначением. Для тех, которые используют только *in vitro* подойдут регламенты оценки клеточных линий-продуцентов иммунобиологических препаратов. Поддержание диплоидного стабильного кариотипа в 75% клеток достаточно для сохранения биологических свойств линии в фазе активного роста (ОФС.1.7.2.0011.15). Для медицинского использования Международное общество клеточной терапии не рекомендует к терапевтическому применению ММСК с 10%-ыми клонами aberrantных клеток. При этом предельная частота полиплоидии и неклональных ХА не регулируются (Barkholt et al., 2013; Полянская, 2018). Чаще всего такой подход дает представление только о конституциональном кариотипе донора ткани, но не хромосомной стабильности клеточной линии.

В тоже время, данные об осложнениях клеточной терапии (в том числе, глионейрональных новообразованиях из донорских клеток) у людей после трансплантации ММСК и других стволовых клеток, культивируемых *in vitro*, вызывают настороженность

(Bauer et al., 2018). Пока патологическая значимость тех или иных хромосомных нарушений и их влияние на физиологические, биологические свойства и онкогенность ММСК обсуждается, решение об их терапевтическом применении принимается с учетом оптимального соотношения риска и пользы (Negi, 2019). Накопление данных о частоте хромосомной и кариотипической изменчивости и характере распределения разрывов в хромосомах позволит определить допустимые пределы для отбора генетически стабильных диплоидных клеточных линий ММСК, предназначенных для медицинских целей.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы “Обеспечение ядерной и радиационной безопасности на 2016–2025 гг. на период до 2030 г.” Медицинского биофизического центра им. А.И. Бурназяна ФМБА России.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

От каждого из включенных в исследование доноров клеточного материала было получено информированное добровольное согласие на его забор, сохранение и использование.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Айзенштадт А.А., Сказина М.А., Котелевская Е.А., Елсукова Л.В., Золина Т.Л., Пономарцев Н.В., Галактионов Н.К., Галембо И.А., Иволгин Д.А., Масленникова И.И., Енукашвили Н.И. 2018. Характеристики мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека при длительном культивировании *in vitro*. Вестник Сев.-Зап. гос. мед. университета им. И.И. Мечникова. Т. 10. № 1. С. 11. (Aizenshtadt A.A., Skazina M.A., Kotelevskaya E.A., Yelsukova L.V., Zolina T.L., Ponomartsev N.V., Galaktionov N.K., Galemba I.A., Ivolgin D.A., Maslennikova I.I., Erukashvily N.I. 2018. Characterization of umbilical cord mesenchymal stromal cells during long-term expansion *in vitro*. Herald of North-Western I.I. Mechnikov State Medical University. V. 10 № 1. P. 11.)
- Баранов В.С., Кузнецова Т.В. 2007. Цитогенетика эмбрионального развития человека: научно-практические аспекты. СПб.: Издательство Н-Л. 640 С. (Baranov V.S., Kuznetsova T.V. Cytogenetics of human embryonic development: scientific and practical aspects. 2007. St. Petersburg: Publishing House N-L. 640 pp.)
- Бочков Н.П., Воронина Е.С., Косякова Н.В., Лир Т., Ржанинова А.А., Катосова Л.Д., Платонова В.И., Гольдштейн Д.В. 2007. Хромосомная изменчивость мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека. Клеточные технологии в биологии и медицине. № 1. С. 11. (Bochkov N.P., Voronina E.S., Kosyakova N.V., Lyir T., Rzhaniнова A.A., Katosova L.D., Platonova V.I., Rzhaniнова A.A., Goldshtein D.V., Liehr T. 2007. Chromosome variability of human multipotent mesenchymal stromal cells. Bulletin of Exper. Biol. Med. V. 143. № 1. P. 122.)
- Бочков Н.П., Никитина В.А. 2008. Цитогенетика стволовых клеток человека. Молекулярная медицина. № 3. С. 40. (Bochkov N.P., Nikitina V.A. 2008. Cytogenetics of human stem cells. Mol. Med. (Russ.) № 3. P. 40.)
- Бочков Н.П., Чеботарёв А.Н. 1989. Наследственность человека и мутагены внешней среды. М.: Медицина. 270 С. (Bochkov N.P., Chebotarev A.N. 1989. Human heredity and environmental mutagens. M.: Medicine. 270 pp.)
- Буяновская О.А., Кулешов Н.П., Никитина В.А., Воронина Е.С., Катосова Л.Д., Бочков Н.П. 2009. Спонтанная анеуплоидия и клонообразование в стволовых клетках жировой ткани при разных сроках культивирования. Клеточные технологии в биологии и медицине. № 3. С. 123. (Buyanovskaya O.A., Kuleshov N.P., Bochkov N.P., Nikitina V.A., Voronina E.S., Katosova L.D. 2009. Spontaneous aneuploidy and clon formation in adipose tissue stem cells during different periods of cultivation. Bull. Exper. Biol. Med. V. 148 № 1. P. 109.)
- Кольцова А.М., Зенин В.В., Петросян М.А., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2020. Получение и характеристика линий мезенхимных стволовых клеток, выделенных из разных областей плаценты одного донора. Цитология. Т. 62. № 9. С. 623. (Koltsova A.M., Zenin V.V., Petrosyan M.A., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Polyanskaya G.G. 2020. Obtaining and characterization of lines of mesenchymal stem cells isolated from different areas of the placenta of one donor. Tsitologiya. V. 62. № 9. P. 623.)
- Кольцова А.М., Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. 2019. Получение и характеристика линии мезенхимных стволовых клеток, выделенной из десны человека. Цитология. Т. 61. № 8. С. 658. (Koltsova A.M., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Polyanskaya G.G. 2019. Derivation and characterization of mesenchymal stem cell line isolated from human gingiva. Tsitologiya. V. 61. № 8. P. 658.)
- Мамаева С.Е. 1996. Закономерности кариотипической эволюции клеток в культуре. Цитология. Т. 38. № 8. С. 787. (Mamaeva S.E. 1996. Regularities of karyotypic evolution of cells in culture. Tsitologiya. V. 38. № 8. P. 787.)
- Миронов А.Н. (ред.). 2013. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). 2. М.: Гриф и К. 536 с. (Mironov A.N. (Ed.) 2013. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs (immunobiological drugs). 2. M.: Grif and K. 536 pp.)
- Полянская Г.Г. 2018. Сравнительный анализ характеристик линий мезенхимных стволовых клеток человека, полученных в коллекции культур клеток позвоночных (обзор). Клеточные культуры. №. 34. С. 3. (Polyanskaya G.G. 2018. Comparative analysis of the lines of human mesenchymal stem cells derived in the collection of cell cultures of vertebrates. (Review). Cell Cultures (Inform. Bull.), № 34. P. 3.)

- Рокицкий П.Ф. 1967. Биологическая статистика. Минск: Высшая школа. 328 с. (Rokitsky P.F. 1967. Biological statistics. Minsk: Vishaya shkola. 328 p.)
- Barkholt L., Flory E., Jekerle V., Lucas-Samuel S., Ahnert P., Bisset L., Buscher D., Fibbe W., Foussat A., Kwa M., Lantz O., Mačiulaitis R., Palomäki T., Schneider C.K., Sensebé L. et al. 2013. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies – bridging scientific observations and regulatory viewpoints. *Cytotherapy*. V. 15. P. 753.
- Bauer G., Elsallab M., Abou-El-Enein M. 2018. Concise review: A comprehensive analysis of reported adverse events in patients receiving unproven stem cell-based interventions. *Stem Cells Transl. Med.* V. 7. P. 676.
- Borgonovo T., Vaz I.M., Senegaglia A.C., Rebelatto C.L., Brofman P.R. 2014. Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-banded karyotyping in a Cell Technology Center. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* V 36. P. 202.
- Costa L.A., Eiro N., Fraile M., Gonzalez L.O., Saá J., Garcia-Portabella P., Vega B., Schneider J., Vizoso F.J. 2020. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses. *Cell. Mol. Life Sci.* V. 22. P. 1.
- Duarte D.M., Cornélio D.A., Corado C., Medeiros V.K., de Araújo L.A., Cavalvanti G.B. Jr., de Medeiros S.R. 2012. Chromosomal characterization of cryopreserved mesenchymal stem cells from the human subendothelium umbilical cord vein. *Regen Med.* V. 7. P. 147.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*. V. 8. P. 315.
- Edgar B., Zielke N. & Gutierrez C. 2014. Endocycles: a recurrent evolutionary innovation for post-mitotic cell growth. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* V. 15. P. 197.
- Grimes B.R., Steiner C.M., Merfeld-Clauss S., Traktuev D.O., Smith D., Reese A., Breman A.M., Thurston V.C., Vance G.H., Johnstone B.H., Slee R.B., March K.L. 2009. Interphase FISH demonstrates that human adipose stromal cells maintain a high level of genomic stability in long-term culture. *Stem Cells Dev.* V. 18. P. 717.
- Mastrolia I., Foppiani E.M., Murgia A., Candini O., Samarelli A.V., Grisendi G., Veronesi E., Horwitz E.M., Dominici M. 2019. Challenges in Clinical Development of Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Concise Review. *Stem Cells Transl. Med.* V. 8. P. 1135.
- Neri S. 2019. Genetic stability of mesenchymal stromal cells for regenerative medicine applications: A fundamental bio-safety aspect. *Int. J. Mol. Sci.* V. 20. P. 2406.
- Nikitina V., Astrelina T., Nugis V., Ostashkin A., Karaseva T., Dobrovolskaya E., Usupzhanova D., Suchkova Y., Lomonosova E., Rodin S., Brunchukov V., Lauk-Dubitskiy S., Brumberg V., Machova A., Kobzeva I., Bushmanov A., Samoilo V. 2018. Clonal chromosomal and genomic instability during human multipotent mesenchymal stromal cells long-term culture. *PLoS One.* 2018. V. 13. P. e0192445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192445>
- Petricciani J.C. 2006. Cell substrates: where do we stand after 50 years of discussion? *Dev. Biol. (Basel).* V. 123. P. 11.
- Rangel N., Forero-Castro M., Rondón-Lagos M. 2017. New Insights in the Cytogenetic Practice: Karyotypic Chaos, Non-Clonal Chromosomal Alterations and Chromosomal Instability in Human Cancer and Therapy Response. *Genes (Basel).* V. 3. P. 155.
- Serakinci N., Fahrioglu U., Christensen R. 2014. Mesenchymal stem cells, cancer challenges and new directions. *Eur. J. Cancer.* V. 50. P. 1522.
- Shaffer L.G., McGowan-Jordan J., Schmid M. 2013. ISCN 2013: An international system for human cytogenetic nomenclature. International standing committee on human cytogenetic. Karger. 144 p.
- Soukup T., Mokry J., Karbanová J., Pytlík R., Suchomel P., Kucerová L. 2006. Mesenchymal stem cells isolated from the human bone marrow: Cultivation, phenotypic analysis and changes in proliferation kinetics. *Acta Medica.* 2006. V. 49. P. 27.
- Tanaka K., Goto H., Nishimura Y., Kasahara K., Mizoguchi A., Inagaki M. 2018. Tetraploidy in cancer and its possible link to aging. *Cancer Sci.* V. 109. P. 2632.
- Wang Y., Han Z.B., Song Y.P., Han Z.C. 2012. Safety of mesenchymal stem cells for clinical application. *Stem Cells Int.* 2012. P. 652034. <https://doi.org/10.1155/2012/652034>

## The Cytogenetic Characteristic of Mesenchymal Multipotent Stromal Cell Diploid Lines

V. A. Nikitina<sup>a,\*</sup>, T. A. Astrelina<sup>a</sup>, I. V. Kobzeva<sup>a</sup>, V. Yu. Nugis<sup>a</sup>, E. E. Lomonosova<sup>a</sup>, V. V. Semina<sup>a</sup>,  
V. A. Brunchukov<sup>a</sup>, D. Yu. Usupzhanova<sup>a</sup>, V. A. Brumberg<sup>a</sup>, A. A. Rastorgueva<sup>a</sup>,  
T. V. Karaseva<sup>a</sup>, and A. S. Samoylov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>State Research Center Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA of Russia, Moscow, 123098 Russia

\*e-mail: nikitinava@yandex.ru

The cytogenetic study of mesenchymal multipotent stromal cells (MMSC) lines isolated from bone marrow, adipose tissue, placenta and mucous human have been carried out Karyological analysis had showed a normal diploid karyotype of MMSC up to the 5th passage of cultivation Clonal chromosomal translocations have detected in 3 of the 22 (14%) MMSCs The rate of cells with chromosomal aberrations in GTG analysis was  $202 \pm 0.67\%$  (10 cell lines), and in mFISH –  $331 \pm 0.69\%$  (11 cell lines) Unstable chromosomal aberrations (fragments, dicentric chromosomes)

have been accounted for 65%, and stable (translocations) – 35% of all cells with chromosomal damages (3–5%) identified by mFISH analysis of 1440 metaphase. These results have confirmed the importance of cytogenetic studies of MMSCs intended for medical purposes. The accumulation of chromosomal and karyotypic variability data at different periods of cultivation will have made determination of limits for the selection of genetically stability diploid MMSCs in order to prevent unwanted consequences of their use for therapeutic purposes.

**Keywords:** Mesenchymal multipotent stromal cells, karyotype, chromosome aberrations, clone formation, multicolor fluorescent in situ hybridization

## КЛЕТОЧНО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВОПРОСЫ ГЕМО- И БИОСОВМЕСТИМОСТИ АЛМАЗОПОДОБНЫХ УГЛЕРОДНЫХ ПЛЕНОК. КРАТКИЙ КРИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

© 2021 г. А. Е. Полухина<sup>1,2</sup>, В. В. Малащенко<sup>1,3</sup>, А. С. Гренадёр<sup>1</sup>, К. А. Юрова<sup>3</sup>, А. А. Соловьёв<sup>1</sup>,  
Л. С. Литвинова<sup>3,\*</sup>, И. А. Хлусов<sup>3,4,5</sup>

<sup>1</sup>Институт сильноточной электроники Сибирского отделения Российской академии наук, Томск, 634055 Россия

<sup>2</sup>Кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики  
Сибирского государственного медицинского университета, Томск, 634050 Россия

<sup>3</sup>Центр иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. И. Канта,  
Калининград, 236041 Россия

<sup>4</sup>Кафедра морфологии и общей патологии Сибирского государственного медицинского университета, Томск, 634050 Россия

<sup>5</sup>Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий Томского политехнического университета,  
Томск, 634050 Россия

\*E-mail: larisalitinova@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.02.2021 г.

После доработки 16.02.2021 г.

Принята к публикации 16.02.2021 г.

По публикациям последних 20 лет проведен обзор тонких аморфных пленок, состоящих из углерода в состоянии  $sp^3$  (алмаз) и  $sp^2$  (графит) гибридизации атомных орбиталей, и называемых поэтому алмазоподобными (diamond-like carbon, DLC). Основной акцент сосредоточен на связи биомедицинских и физико-химических параметров анализируемых покрытий. Представлены: методы формирования и общие требования к DLC покрытиям для сердечнососудистых имплантатов; *in vitro* реакция белков крови, тромбоцитов, лейкоцитов, фибробластов, эндотелиальных и гладкомышечных клеток; влияние легирования DLC-покрытий кремнием и его оксидами на клеточные и молекулярные параметры их гемо- и биосовместимости. Широкие вариации физико-химических, механических и трибологических свойств DLC-пленок, разброс методов их биомедицинского тестирования *in vitro* не позволяют пока выделить наиболее подходящие покрытия для конкретных приложений в области стентов, сердечных клапанов и перфузионных насосов. Сделано заключение о необходимости смещения разрозненных фундаментальных исследований DLC-покрытий в направлении прикладных разработок, а также изучения поведения конкретных покрытий, исходя из конструкторских, (био)механических, физико-химических и биомедицинских требований для каждого вида медицинских изделий, контактирующих с кровью.

**Ключевые слова:** клетки крови, клетки сосудистой стенки, фибриноген, альбумин, *in vitro* реакция, тонкое углеродное покрытие, легирование кремнием, физико-химические свойства

**DOI:** 10.31857/S0041377121030093

Сердечнососудистые заболевания (ССЗ) широко распространены во всем мире и являются одной из ведущих причин смертности населения (Чазова и др., 2015). Несмотря на то, что общее число сердечнососудистых операций и манипуляций, проведенных в США, снизилось на 6% в сравнении с 2004 г., в 2014 г. кардиохирургическим манипуляциям были

подвергнуты 8 миллионов пациентов (Benjamin et al., 2019). А согласно прогнозам American Heart Association, к 2030 г. 40.5% жителей США будут страдать одной из форм ССЗ (болезни коронарных сосудов, сердечная недостаточность, заболевания клапанов, кардиомиопатия, гипертензия и инсульт) (Roger et al., 2012). В Российской Федерации в 2016 году смертность от ССЗ более чем в 1.5–9 раз превышала соответствующие показатели в США и европейских странах (Benjamin et al., 2019).

Ведущими инвазивными методами лечения ССЗ остаются стентирование, замена клапанов сердца, ангиопластика, шунтирование сосудов и трансплан-

**Принятые сокращения:** АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время; ГМК – гладкомышечные клетки; КОЕ-Ф – колониеобразующие единицы фибробластов; МСК – мезенхимные стволовые клетки; ССЗ – сердечнососудистые заболевания; DLC – алмазоподобные углеродные (diamond like carbon) покрытия; MCP-1 – моноцитарный хемотаксический протеин 1; PDGF – тромбоцитарный фактор роста.

тация сердца. Для этого применяются кардиоваскулярные имплантаты (стенды, катетеры, клапаны, протезы сосудов) и компоненты экстракорпорального кровообращения (трубки, мембраны, насосы) активно контактирующие с кровью (Hedayati et al., 2019). А одним из основных классов современных материалов и покрытий в приложении к биологии и медицине, включая кардиологию, является углерод (Ratner et al., 2004). Существует не менее 9 известных аллотропных модификаций углерода в интервале аморфных, графитоподобных, алмазоподобных и полностью кристаллических форм, содержащих атомы углерода в нескольких состояниях гибридизации атомных орбиталей углерода: в  $sp^1$  (линейно-цепочечный карбин),  $sp^2$  (слоевой графит) и  $sp^3$  (алмаз), а также в смешанных и промежуточных состояниях  $sp^n$  (Беленков, Грешняков, 2013). Такое структурное разнообразие углерода обуславливает многообразие его физико-химических свойств и соответствующих биомедицинских приложений (Ratner et al., 2004).

Углеродсодержащие покрытия в начале XXI в. рассматривались как перспективные решения в сердечнососудистой хирургии, ортопедии и дентальной имплантологии, а также для модификации контактных линз (Roy, Lee, 2007). К 2019 году добавились такие направления, как системы доставки лекарств, тканевая инженерия и регенеративная медицина (Owonubi et al., 2019). Во многом благодаря графену ( $sp^2$  пленка толщиной в один атом углерода), как новой перспективной форме карбоновых наноматериалов и покрытий, к ним прибавились и разработки в области молекулярных биосенсоров, биологической визуализации, фототермической и генной терапии (Yang et al., 2013; Ansari et al., 2019), покрытий на стентах (Podila et al., 2013) и искусственных сердечных клапанов (Lancelotti et al., 2016).

Растущий интерес к биоматериалам на основе углерода показывает анализ публикаций в базе Pubmed Национального института здоровья США (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>). Согласно запросу по ключевому словосочетанию “carbon coatings” обнаружено 13920 работ, начиная с 1961 г. Публикационная активность постепенно нарастала до 100 статей в год к 1997 г., затем составляла более 100 публикаций в год и в 2015 г. превысила ежегодный предел в 1000 статей. Максимальная активность отмечена в 2019 г. — 1380 публикаций по теме запроса. В XXI в. резко возрос интерес к покрытиям, выполненным из графена и его оксидов, выражающийся ростом соответствующих публикаций: с 9 статей в 2000 г. до 642 публикаций в 2020 г. Однако покрытие из графена для кардиохирургического применения встречается лишь в единичных публикациях (например: Lancelotti et al., 2016).

Своеобразной оказалась ситуация с открытыми источниками, касающимися так называемых алмазоподобных углеродных (diamond like carbon, DLC) покрытий. Подобные аморфные углеродные пленки являются твердыми, гладкими и в высшей степени биоинертными; до 50% их физических и механических свойств, особенно твердость, определяются  $sp^3$  типом гибридизации при возможном наличии в составе высоких концентраций кислорода, водорода и азота (Nistor, May, 2017). По мнению некоторых авторов,  $sp^3/sp^2$ -гибридизация атомов углерода сочетается с хорошей гемосовместимостью (Kwok et al., 2005; Sheeja et al., 2005). По конфигурации углеродных связей и содержанию водорода DLC-пленки классифицируют как: 1) тетрагональный аморфный углерод (*ta-C*) с высокой долей (более 70%)  $sp^3$ -гибридизации электронных орбиталей и малой концентрацией водорода; 2) аморфный углерод (*a-C*) с  $sp^3/sp^2$  соотношением в диапазоне 0.4–0.7; 3) гидрогенизированный аморфный углерод (*a-C : H*) с высоким содержанием водорода (Santos et al., 2015).

Поиск в базе Pubmed по словосочетанию diamond like carbon (DLC) coatings обнаружил 394 ссылки в приложении к различным направлениям биомедицины (ортопедические и дентальные имплантаты, антимикробные свойства, кардиохирургия). Единичные публикации в первые 15 лет (1981–1996 гг.) впоследствии сменились постепенным нарастанием числа выходящих статей до 32 в год к 2017 г. Тем не менее, по запросу diamond like coatings for cardiovascular surgery/implants выявлено всего 8–12 публикаций, рассматривающих, начиная с 1999 г., вопросы гемо- и биосовместимости подобного типа покрытий для стентов, искусственных клапанов сердца и частей насосов для искусственного кровообращения. Проведенный поиск по ключевым словам не отражает степень интереса кардиохирургов к данным покрытиям за последние 20 лет, поскольку уже проведены клинические испытания DLC-покрытий на стентах, как с позитивными (Salahas et al., 2007; Wöhrle et al., 2009), так и неудовлетворительными результатами (Airoldi et al., 2004; Meireles et al., 2007).

В связи с этим, в настоящем обзоре анализируются публикации, вышедшие, в основном, в XXI в. и посвященные клеточным и молекулярным аспектам *in vitro* гемо- и биосовместимости DLC-покрытий, а также их форм, модифицированных кремнием, с акцентом на связь биомедицинских и физико-химических параметров.

## МЕТОДЫ ФОРМИРОВАНИЯ И ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К АМОРФНЫМ УГЛЕРОДНЫМ ПОКРЫТИЯМ ДЛЯ СЕРДЕЧНОСУДИСТЫХ ИМПЛАНТАТОВ

Тонкие аморфные углеродные пленки, состоящие из углерода в состоянии  $sp^3$ - и  $sp^2$ -гибридизации (соотношение варьирует в пределах  $\sim 10$ – $90\%$ ), называемые поэтому алмазоподобными (DLC), включающие до 40–50% водорода, известны с 1971 г. (Aisenberg, Chabot, 1971; Ohtake et al., 2021) и рассматриваются в последние 20 лет как многообещающие покрытия для защиты подложки имплантатов от коррозии, разрушения, выхода токсичных элементов и частиц износа, улучшения гемо- и биосовместимости материалов (Santos et al., 2015).

Технические подробности нанесения DLC-пленок ( $ta$ -C;  $a$ -C;  $a$ -C : H) с различными физико-химическими характеристиками представлены в специализированных обзорных статьях (см., например: Santos et al., 2015; Wen et al., 2017; Ohtake et al., 2021). Для получения DLC-пленок используют множество разновидностей физического (physical vapor deposition, PVD) и химического газофазного осаждения (chemical vapor deposition, CVD): магнетронное распыление (magnetron sputtering deposition, MSD); импульсное лазерное напыление (pulsed laser deposition, PLD); вакуумно-дуговое осаждение с фильтрацией (filtered cathodic vacuum arc, FCVA); ассистированное плазмой газофазное осаждение (plasma-assisted vapor deposition, PAVD); ассистированное плазмой химическое газофазное осаждение (plasma-assisted chemical vapor deposition, PACVD); стимулированное высокочастотной плазмой химическое газофазное осаждение (radio frequency plasma enhanced chemical vapor deposition, r.f.-PECVD); плазменно-иммерсионную ионную имплантацию и осаждение (plasma immersion ion implantation and deposition, PIID); комбинированное физическое и химическое газофазное осаждение (hybrid physical-chemical vapor deposition, HPCVD) и другие технологические подходы (Roy, Lee, 2007; Wen et al., 2017; Ohtake et al., 2021).

В публикациях по проблеме представлено широкое разнообразие физико-химических (толщина, шероховатость, соотношение  $sp^3/sp^2$ , содержание водорода и легирующих добавок, смачиваемость, свободная поверхностная энергия и др.), механических и трибологических свойств (твердость, адгезионная прочность, коэффициент трения, скорость износа и др.) аморфных DLC-ленок. Свойства не всегда полностью контролируются, что обусловлено использованием разнообразных типов подложек и особенностями методов нанесения. Как следствие, к настоящему времени классифицировано не менее 74 типов аморфных DLC-пленок (Ohtake et al., 2021).

Воспалительные реакции вокруг кардиоваскулярного имплантата являются основным звеном в развитии осложнений, приводящих к его неукладке (Ratner et al., 2004). Повреждение эндотелиальных клеток и раздражение, вызываемое инородным телом, является причиной тромбоза и рестеноза (повторного сужения) просвета артерий в области стентирования (Newby, Zaltsman, 2000).

В 25–30% случаев в ранние сроки после установки на поверхности внутрисосудистого имплантата (стен-та) фиксируются фибриноген и тромбоциты крови, что приводит к образованию тромба (Virmani et al., 2004). Причина этих состояний, как правило, связана с низкой гемосовместимостью искусственного материала.

Отдаленным последствием установки внутрисосудистых имплантатов является развитие повторного сужения просвета сосуда, требующим повторного оперативного вмешательства. После установки голуметаллических стентов рестеноз развивается в течение 2 лет в 14–46% случаев (Schillinger et al., 2007; Ando et al., 2017).

В основе тканевого ремоделирования в ответ на атрофию от давления и недостаточную биосовместимость имплантата лежит миграция гладкомышечных клеток (ГМК) из стенки кровеносного сосуда в очаг посттравматического воспаления, их пролиферация, приводящие к увеличению толщины внутренней части сосудистой стенки (формированию неоинтимы) и сужению просвета артерии (Qiu et al., 2014). Покрытия для кардиоваскулярных имплантатов в идеале должны сочетать тромборезистентность, способность стимулировать миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток, подавлять воспалительные процессы, прикрепление и избыточный рост ГМК (Santos et al., 2015).

Многогранность проблемы привела к тому, что нашлось не так много работ, в которых аккуратно и относительно подробно были представлены физические, химические, биологические данные в сочетании с адекватной статистической обработкой результатов. Сведения, полученные разными группами исследователей, в сжатом виде отражены в табл. 1 и обсуждаются ниже в соответствующих разделах.

## КЛЕТОЧНО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ГЕМОСОВМЕСТИМОСТИ АМОРФНЫХ УГЛЕРОДНЫХ ПОКРЫТИЙ *IN VITRO*

В данном разделе рассмотрены результаты экспериментального *in vitro* моделирования поведения DLC-пленок на межфазной границе кровь/покрытие без акцента на гемолиз эритроцитов, который подробно изучен в конце XX в., а его отсутствие подтверждено недавно (Subramanian et al., 2018).

**Таблица 1.** Вариации клеточно-молекулярных реакций *in vitro* на аморфные алмазоподобные углеродные покрытия

Тип покрытия	Толщина покрытия, нм	Способ формирования покрытия	Материал подложки	Изученный субстрат	Клеточно-молекулярная реакция на покрытие	Источник литературы
<b>I декада XXI в.</b>						
<b>Улучшение гемо- и биосовместимости <i>in vitro</i></b>						
<i>a</i> -C : H	60	IBD или IBAD	Полиметил-метакрилатовые диски	Суспензия нейтрофилов или тромбоцитов человека	Снижение в 1.45–3 раза числа адгезировавших клеток	Li et al., 1999
<i>a</i> -C : H	Не указана	PECVD	Углеродные пластины	ГМК аорты крысы	1.5–2-кратное улучшение адгезии в 1-е сут; 2–3-кратный прирост клеточности за 4 сут	Bacáková et al., 2001
<i>a</i> -C : H	70	PACVD	Стекло	Моноциты крови человека	Повышение адгезии, но снижение степени расплывания	Linder et al., 2002
<i>ta</i> -C	48–75	FCVA	Медицинская сталь	Макрофаги линии J774	2.5-кратное снижение продукции H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Maguire et al., 2005
Не указан	Не указана	MSD	Медицинская сталь 316L	Мононуклеарные лейкоциты крови	Стимуляция секреции фактора роста тромбоцитов	Santin et al., 2004a
<i>a</i> -C : H	70–310	PHPD	Кремниевые пластины	Плазма крови человека	Уменьшение адгезии тромбоцитов, пролонгация АЧТВ	Yang, Kwok et al., 2003a
<i>a</i> -C : H	Не указана	r.f.-PECVD	Не указан	Эндотелиальные клетки человека	2-кратное усиление 6-ч адгезии	Okpalugo et al., 2006
<i>a</i> -C : H	40–50	r.f.-PECVD	Поликарбонат	Бычий сывороточный альбумин, фибриноген плазмы крови быка; тромбоциты человека	Снижение адсорбции белков и увеличение отношения альбумин/фибриноген; 2.5-кратное падение адгезии тромбоцитов	Hasebe et al., 2007
<b>Ухудшение гемосовместимости <i>in vitro</i></b>						
<i>a</i> -C	Не указана	PAVD с использованием неустойчивого MSD	Медицинская сталь 316L, диски	Плазма крови человека	Активация адсорбции фибриногена и альбумина, адгезии тромбоцитов	Mikhalovska et al., 2004
<i>a</i> -C : H	Не указана	PHPD	Кремниевые пластины	Плазма крови человека, обогащенная тромбоцитами	1.3-кратное усиление адгезии тромбоцитов в сравнении с изотропным углеродом	Kwok et al., 2005
<i>a</i> -C : H	70–310	PHPD	Пиролитический углерод	Плазма крови человека, обогащенная тромбоцитами	Морфологическая активация (распластывание) тромбоцитов	Yang et al., 2003b

Таблица 1. Окончание

Тип покрытия	Толщина покрытия, нм	Способ формирования покрытия	Материал подложки	Исученный субстрат	Клеточно-молекулярная реакция на покрытие	Источник литературы
<b>II декада XXI века</b>						
<b>Улучшение гемо- и биосовместимости <i>in vitro</i></b>						
<i>a</i> -C	Не указана	Не указан	Пористый титан	Клетки костного мозга кроликов	Рост жизнеспособности миелокариоцитов; увеличение числа КОЕ-Ф	Макарова и др., 2011
<i>a</i> -C : H	Не указана	r.f.-PECVD	Полистирол	Миобласты мыши линии C2C12	Падение на 20% (в сравнении с подложкой) степени 24-ч клеточной адгезии	Stoica et al., 2015
<i>ta</i> -C <i>a</i> -C : H	34.1 37.5	FCVA r.f.-PECVD	Кремниевые диски	Плазма крови человека, обогащенная тромбоцитами; фибриноген	2.5-кратный рост 1-ч адсорбции фибриногена ( <i>a</i> -C : H); падение в 1.6 раза 1-ч адгезии тромбоцитов	Nandakumar et al., 2016
<i>a</i> -C : H	Не указана	Импульсное плазменное CVD	TiNb; Ti	Плазма крови человека, обогащенная тромбоцитами	Модулирование 15-мин адгезии тромбоцитов: 2-кратное снижение площади клеток в сравнении с TiNb; 1.5-кратный рост в сравнении с Ti	Liza et al., 2017
Не указан	2000–4000	MSD	TiNi	Моноциты человека  Фибробласты человека	Снижение активности дегидрогеназы в митохондриях и секреция IL-1b  Снижение активности дегидрогеназы в митохондриях и экспрессия гена IL-8	Markhoff et al., 2017
<i>a</i> -C : H	75	r.f.-PECVD	Кремниевые пластины	Остеосаркома человека, линия Saos-2	Не влияет на активность щелочной фосфатазы и кальцификацию межклеточной среды	Subramanian et al., 2018
<i>a</i> -C	250	MSD	Сплав Ti6Al7Nb	Эндотелиальные клетки человека	Рост клеточности и жизнеспособности	Bociaga et al., 2019
По-видимому, <i>a</i> -C	220	MSD	Ti пластины	Лимфоидные эндотелиальные клетки SVEC  Цельная кровь и плазма крови кроликов	Усиление роста в 3-сут, но не 5-сут культуре  Не влияет на гемолиз, 2-кратно снижает адгезию тромбоцитов	Bhaskar et al., 2020

**Примечание.** Публикации представлены в хронологическом порядке; *a*-C : H – гидрогенизированный аморфный углерод; *a*-C – негидрогенизированный аморфный углерод; *ta*-C – тетрагональный негидрогенизированный аморфный углерод; FCVA – вакуумно-дуговое осаждение с фильтрацией; IBD – ионно-лучевое осаждение углеводородов на подложку; IBAD – распыление графитовой мишени с одновременной бомбардировкой углеводородами (ассистирование ионным пучком) растущей DLC-пленки; MSD – магнетронное распыление; PAVD – ассистированное плазмой газозафазное осаждение; PИИД – плазменно-иммерсионная ионная имплантация и осаждение; r.f.-PECVD – стимулированное высокочастотной плазмой химическое газозафазное осаждение.

Считается, что адсорбция белков из крови и тканевой жидкости является определяющей для гемосовместимости медицинских изделий. При этом фибриноген и гамма-глобулины способствуют, а альбумин препятствует клеточной адгезии. В связи с этим, соотношение адсорбирующихся альбумина и фибриногена рассматривается как прогностический фактор атромбогенности (тромборезистентности) покрытий (Hauert, 2003). В то же время, адсорбция альбумина к DLC-пленкам одновременно способствует прикреплению грамположительных и грамотрицательных бактерий (Liu et al., 2016).

Адсорбция фибриногена имеет принципиальное значение для прикрепления тромбоцитов к искусственным поверхностям в статических условиях (в сравнении с фибронектином, витронектином и фактором фон Виллебранда) и в потоке жидкости (Horbett, 2018). Кроме того, белок способствует также адгезии нейтрофильных лейкоцитов, моноцитов (макрофагов) и некоторых субпопуляций лимфоцитов посредством интегринов на клеточной поверхности (Ugarova, Yakubenko, 2001).

*In vitro* адсорбция белков на DLC-пленку (толщиной 40–50 нм), нанесенную в атмосфере ацетилена на поликарбонатную подложку методом r.f.-PECVD, изучена в работе (Hasebe et al., 2007). Покрытие  $a\text{-C} : \text{H}$  в 2.5 раза снижало 60-минутную адгезию тромбоцитов из плазмы крови человека в сравнении с подложкой, что могло быть обусловлено, по мнению авторов, преимущественным снижением осаждения фибриногена по отношению к альбумину (использовали белки крови быка). Как следствие, соотношение альбумин/фибриноген росло в сравнении с подложкой. Полученные выводы во многом повторили более ранние многочисленные результаты, представленные в обзорной статье (Hauert, 2003).

В работе Ли и коллег (Li et al., 1999) DLC-пленки (толщиной 60 нм) были нанесены на диски из полиметилметакрилата с помощью ионно-лучевого осаждения (ion beam deposition, IBD) углеводородов на подложку или распыления графитовой мишени в атмосфере аргона с одновременной бомбардировкой углеводородами (ассистированием ионным пучком) растущей DLC-пленки (ion beam-assisted deposition, IBAD). В двухчасовом *in vitro* тесте DLC-пленки, полученные методом IBD, и, в большей степени, DLC-покрытия, полученные методом IBAD, однозначно уменьшали количество адгезированных тромбоцитов (примерно в 3 раза) или нейтрофилов (до 69%) по сравнению с контролем (полимерной подложкой). По мнению авторов, обусловленный IBAD технологией рост  $\text{sp}^3/\text{sp}^2$  соотношения в DLC-покрытии улучшает его атромбогенные и противовоспалительные свойства.

Янг с коллегами (Yang et al., 2003) синтезировали вариации пленки  $a\text{-C} : \text{H}$  (толщиной 70–310 нм) на кремниевых пластинах с помощью метода PIPD в атмосфере ацетилена и аргона и изучали *in vitro* реакцию компонентов коагуляционного и тромбоцитарно-сосудистого гемостаза. Результаты показали, что в процессе двукратного увеличения  $\text{sp}^2/(\text{sp}^3 + \text{C}-\text{H})$  соотношения (сдвига аллотропного состояния углерода в сторону графита) падала толщина покрытия. В сравнении с контролем (медицинская сталь) пленки  $a\text{-C} : \text{H}$  в целом уменьшали долю адгезированных тромбоцитов при 15-минутном контакте с плазмой крови и пролонгировали (до 10 с) активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). Авторы сделали вывод, что покрытия в состоянии  $(\text{sp}^3 + \text{C}-\text{H})$  обладают более высоким гемосовместимым потенциалом.

Однако в сравнении с подложкой из пиролитического углерода, пленки  $a\text{-C} : \text{H}$  с прогрессивным уменьшением поверхностной плотности распределения молекул углерода и толщины покрытия от 310 до 70 нм способствовали (от 0 до 15%) морфологической активации (распластыванию) тромбоцитов плазмы крови человека в 15-минутном тесте (Yang et al., 2003). В то же время отсутствие в этой публикации статистической обработки результатов затрудняет восприятие заключений авторского коллектива. Кроме того, авторы (Yang et al., 2003) не учитывают тот факт, что толщина углеродного покрытия значительно влияет на физико-химические и механические свойства его поверхности.

В частности, амплитуда отрицательного электростатического потенциала растет пропорционально увеличению толщины пленки  $a\text{-C} : \text{H} : \text{SiO}_x$  (Гренадёр и др., 2021). Отрицательный знак заряда искусственной поверхности имеет известное значение для реакций клеток крови, несущих негативный дзета-потенциал (Stoltz, 1983; Lima et al., 2020), и стромальных клеток (Khlusov et al., 2018) сосудистой стенки.

Для гидрофильных пленок  $a\text{-C} : \text{H}$  (краевой угол смачивания водой  $68.4^\circ$ ;  $74.9^\circ$  для изотропного углерода), изготовленных на кремниевых пластинах с помощью PIPD технологии в атмосфере ацетилена показано усиление 2-часовой адгезии тромбоцитов из плазмы крови человека (в 1.3 раза в сравнении с низкотемпературным изотропным углеродом) (Kwok et al., 2005).

В другой работе (Fedel et al., 2008) подтверждено, что коммерческие DLC-покрытия на различных субстратах (поливинилизобутиловый эфир; CoCr-сплав; Si-сколы) в 2–3 раза снижают адгезию активированных (распластанных) тромбоцитов в (5–25)-минутных тестах с плазмой человека. Число адгезировавших кровя-

ных пластинок росло линейно с увеличением соотношения фибриногена и альбумина, адсорбированных на поверхностях. Тромборезистентность DLC-покрытий обусловлена преимущественным осаждением молекул альбумина.

Противоположные результаты были получены *in vitro* другим коллективом авторов (Mikhalovska et al., 2004). Алмазоподобное (преобладание в структуре  $sp^3$ -типа гибридизации) или графитоподобное (преобладание в структуре  $sp^2$ -типа гибридизации)  $a-C$  покрытия (99.9% углерода) на медицинской стали марки 316L повышали (примерно на  $10^\circ$ ) гидрофобность поверхности экспериментальных образцов, резко стимулировали адсорбцию фибриногена (в 5–6 раз) и альбумина (до 900%) из плазмы крови человека. В обогащенной тромбоцитами плазме в интервале времени 30–60 мин значительно росла адгезия кровяных пластинок к покрытию в сравнении со сталью и стеклом (Mikhalovska et al., 2004).

Таким образом, в первую декаду XXI в. наиболее изученной оказалась модификация покрытия  $a-C : H$ . Большинство исследований подчеркивало их хорошую гемосовместимость. Однако не был достигнут консенсус о биологическом значении  $sp^3$ -типа гибридизации, смачиваемости (свободной поверхностной энергии), поверхностного натяжения на границе кровь/покрытие, переноса заряда с белков крови на искусственную поверхность или структурировании покрытия. Тем не менее, важным для дальнейших исследований оказалось заключение, что толстые (более 1 мкм) DLC-пленки испытывают серьезные внутренние напряжения и неустойчивы к внешней нагрузке (Alakoski et al., 2008).

Кроме того, вариации даже одной технологии нанесения (в частности, магнетронного напыления) вызывали значительные изменения гемосовместимости DLC-пленок ( $a-C : H$ ) (Lousinian et al., 2007), а также соотношения биологических и физических свойств поверхности. Так, увеличение потока аргона в рабочей камере при магнетронном распылении влияет на адгезию тромбоцитов и ухудшает твердость и износостойкость DLC-покрытия (Wen et al., 2017). В свою очередь, различные стандартные способы стерилизации (дезинфекции) способны менять морфологию DLC-пленок. Например, автоклавирование и погружение изделий в этанол не подходят для таких покрытий на пластиковой подложке (Rohrbeck et al., 2014).

Во второй декаде XXI в. результаты *in vitro* тестирования гемосовместимости DLC-покрытий оказались в целом более позитивными и комплексными (табл. 1), с некоторой детализацией для разных видов подложек и смещением акцента исследований в сторону вопросов клеточной биосовместимости. От-

меченное авторами улучшение гемо- и биосовместимости *in vitro* может быть связано с решением некоторых технических проблем, например, возможного загрязнения пленок нежелательными микропримесями во время напыления.

Ограничение 1-часовой адгезии и активации тромбоцитов на DLC-покрытиях отмечено в недавних работах. При этом наноструктурированные тонкие пленки обладали более выраженным атромбогенным эффектом в сравнении с гладким слоем (Nandakumar et al., 2016).

Однако получены неоднозначные результаты тромборезистентности ( $a-C : H$ )-пленок, сформированных импульсным плазменным химическим газофазным осаждением в атмосфере ацетилена на подложки из сплава TiNb (23 ат. % Nb) и титана (Ti) grade 2 (JIS H 4600). DLC-покрытие значительно уменьшало шероховатость металлических поверхностей, повышало их гидрофобность (рост контактного угла смачивания водой от  $50^\circ$ – $52^\circ$  до  $65^\circ$ ), модулировало в 15-минутном тесте реакцию тромбоцитов, активированных хлоридом кальция (Liza et al., 2017). Авторами отмечено 2-кратное снижение площади адгезии клеток в сравнении с TiNb и, напротив, 1.5-кратный рост в сравнении с Ti.

DLC-пленка толщиной 220 нм, нанесенная методом высокочастотного MSD в атмосфере аргона (повидимому,  $a-C$  модификация) на пластины из коммерчески чистого титана, оказывала следующее действие: повышала твердость поверхности; придавала ей гидрофильность (угол смачивания водой снижался от  $73^\circ$  до  $34^\circ$ ) и высокую (в 1.6 раза больше, чем для Ti) свободную поверхностную энергию за счет роста дисперсионной и полярной компонент; достоверно увеличивала *in vitro* число лимфоидных эндотелиальных клеток SVEC в 3-суточных, но не 5-суточных культурах; не влияла на степень 1-часового гемолиза цельной крови кроликов; более чем в 2 раза снижала прикрепление тромбоцитов из плазмы крови кролика в 60-минутном тесте (Bhaskar et al., 2020).

#### КЛЕТОЧНО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВОПРОСЫ БИОСОВМЕСТИМОСТИ АМОРФНЫХ УГЛЕРОДНЫХ ПОКРЫТИЙ *IN VITRO*

Согласно работам (Farb et al., 1999; Santin et al., 2005), сужение просвета коронарных сосудов у человека в первые 11 сут после имплантации голометаллических стентов обусловлено отложением фибрина, накоплением нейтрофилов и макрофагов; к 30-м сут в неоинтима присутствуют, преимущественно, макрофаги и ГМК (появляются через 12 сут наблюдения).

Изучение *in vitro* ответа клеток, которые могут обуславливать развитие рестеноза сосудистой стен-

ки в ответ на DLC (*a*-C : H)-покрытия, полученные ионно-пучковыми, PAVD или PACVD методами, было массовым в 90-х годах XX в. В различных исследованиях, представленных в одной из глав монографии (Thull, Grant, 2001), DLC-пленки либо не проявляли цитотоксичности, либо даже стимулировали адгезию и пролиферацию фибробластов и макрофагов без явных маркеров активной воспалительной реакции.

Макрофаги (Roy, Lee, 2007), фибробласты и мезенхимные стволовые клетки (МСК) активно участвуют в воспалительных реакциях во всех видах тканей (Slany et al., 2014). Гидрогенизированное (*a*-C : H) DLC-покрытие (толщиной 70 нм) на стекле, полученное методом PACVD (в атмосфере метана/гелия в соотношении 1.5 об. %/98.5 об. %), на 10% усиливало адгезию моноцитов крови человека в 6-суточной культуре клеток, но не влияло на их поляризацию (удлинение) и снижало (~ на 12%) распластывание на подложке и образование филоподий (Linder et al., 2002). Макрофаги линии J774 уменьшали продукцию перекиси водорода в ответ на *in vitro* контакт с *ta*-C (доля  $sp^3$ -гибридизации >80%) вариантом DLC-пленки (толщиной 48–75 нм), сформированной на медицинской стали FCVA-способом (Maguire et al., 2005).

В свою очередь, в другом исследовании DLC-пленка, нанесенная на диски из стали марки AISI 316L методом магнетронного распыления, не влияла на секрецию провоспалительных цитокинов (IL-1, TNF $\alpha$ ) мононуклеарными лейкоцитами крови при 3-часовом культивировании. В то же время, активация секреции фактора роста из тромбоцитов (PDGF), одного из стимуляторов пролиферации ГМК, позволила авторам предположить потенциальную неэффективность DLC-покрытий для предупреждения рестеноза артерий при их стентировании (Santin et al., 2004a).

Пленки *a*-C : H, сформированные методом r.f.-PECVD (подложка и толщина пленки не указаны), содержащие 85–90 ат. % углерода и 10–15 ат. % кислорода, двукратно повышали 6-часовую адгезию эндотелиальных клеток человека *in vitro* (Okpalugo et al., 2006; Ogwu et al., 2007). Однако показатели МТТ-теста падали ниже значений в контроле (подложка без покрытия) (Ogwu et al., 2007).

В 2011 г. группа российских авторов (Макарова и др., 2011) показала, что DLC-покрытие (*a*-C модификация) на пористом титане не влияет *in vitro* на адгезию миелокариоцитов кроликов, но снижает их гибель при 4-часовом контакте с тестируемыми изделиями. В 1.4–1.5 раз выросли (в сравнении с подложкой без напыления): число колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕ-Ф) через 7 сут, а также площадь

культуры и количество фибробластоподобных клеток в лунках через 18–32 сут.

По мнению других авторов (Liao et al., 2016) низкое соотношение  $sp^2/sp^3$  (сдвиг в сторону алмазоподобности) для гидрофобных (контактный угол смачивания 80.4°–92.3°) DLC-пленок, полученных методом FCVA, существенно усиливает (в сравнении с дисками CoCrMo) 2-часовую адсорбцию бычьего сывороточного альбумина, что способствует росту (24–72)-часовой жизнеспособности фибробластов мыши линии 3T3, снижению секреции провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF- $\alpha$ ) и повышению концентрации противовоспалительного IL-10 в (12–24)-часовых культурах макрофагов мыши линии RAW 264.7. В то же время, лучшая адгезия и пролиферация фибробластов с ростом  $sp^3$ -фазы алмаза в покрытии (Wen et al., 2017) может провоцировать, на наш взгляд, процессы рестеноза.

Комплексный анализ физико-химического состояния DLC-покрытий и его влияния на поведение клеток *in vitro* проведен в немногочисленных работах. Например, показано, что число эндотелиальных клеток человека линии ECV304, адгезирующих к DLC-пленке (состава *a*-C : H) на кремниевой подложке, нанесенной способом r.f.-PECVD, снижается в 3 раза в 72-часовой культуре с увеличением индекса шероховатости образцов *Ra* с 10 до 25 нм. При этом гидрофобность покрытия, его низкая свободная поверхностная энергия, малое содержание водорода и высокое остаточное напряжение в пленке также негативны для роста эндотелиальных клеток (Wei et al., 2013). В то же время, не совсем понятны однозначные выводы авторов этой работы, поскольку клетки контактировали с покрытием не напрямую, а опосредовано, через слой предварительно нанесенного коллагена крысы.

Покрытие DLC (*a*-C : H), полученное на Ti6Al7Nb-сплаве в атмосфере аргона и метана способом r.f.-PACVD, в сравнении с металлической подложкой повышало контактный угол смачивания водой (примерно с 65° до 90°) и дисперсную компоненту свободной поверхностной энергии, способствовало росту и жизнеспособности эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 в 48-часовой культуре (Swiatek et al., 2016).

В одном исследовании (Hang et al., 2012) DLC-покрытие (80 ат. % C, 16 ат. % O, 2 ат. % N, 2 ат. % Ar) на пластинах никелида титана, сформированное в атмосфере аргона MSD-методом с электродуговым усилением, напротив, повышало гидрофильность поверхности (контактный угол смачивания водой снизился с 63° до 55°) и величину свободной поверхностной энергии (на ~7 мДж/см<sup>2</sup>). Среди биологических эффектов покрытия следует отметить резкое

ограничение выхода Ni с подложки на протяжении 10 сут, статистически значимое уменьшение 30–120 мин адгезии бычьего сывороточного альбумина. Однако эндотелиальные клетки линии CRL-2922 увеличивали свою адгезию к покрытию, измеренную в течение 30–120 мин. Кроме того, покрытие усиливало жизнеспособность клеток на протяжении всего эксперимента (1–6 сут). В то же время, в эндотелиальных клетках на DLC-пленке в 1.5–2.5 раза повышалась относительная экспрессия генов, кодирующих факторы свертывания крови: ингибитора активатора плазминогена 1 (на 3-е и 7-е сут), тканевого тромбoplastина, тромбомодулина и фактора фон Виллебранда (в течение всего периода наблюдений – 7 сут).

DLC-пленка (89.48 ат. % C, 9.84 ат. % O, 0.68 ат. % N; состояние *a*-C), полученная методом MSD на Ti<sub>6</sub>Al<sub>7</sub>Nb-сплаве, имеющая соотношение  $sp^2/sp^3$ , равное 3.3 при толщине примерно 250 нм, повышает дисперсионную компоненту свободной поверхностной энергии, статистически значимо увеличивает клеточность и жизнеспособность 48-часовой культуры эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 (Vociaga et al., 2019).

В другой работе (Markhoff et al., 2017) изучена клеточная биосовместимость достаточно толстой DLC-пленки (толщина 2–4 мкм, индекс шероховатости  $R_a = 0.15$  мкм), нанесенной на подложку из никелида титана (TiNi) MSD-способом на постоянном токе. Авторы использовали 72–96-часовые культуры клеток человека (первичные остеобласты, опухолевые остеобласты линии MG-63, фибробласты кожи, а также моноциты (макрофаги) крови) и тестировали различные показатели: активность дегидрогеназы митохондрий, экспрессию генов матриксной металлопротеиназы 1 типа (MMP-1), IL-6, IL-8, моноцитарного хемотаксического протеина 1 (MCP-1), провоспалительных цитокинов (хемокинов) IL-1b, IL-6, IL-8, MCP-1, фактора роста эндотелия сосудов VEGF), а также синтез проколлагена I типа остеобластами или фибробластами. В сравнении с металлической подложкой, покрытие выборочно ингибировало ферментативную активность (фибробласты, моноциты), экспрессию гена IL-8 в фибробластах, секрецию моноцитами IL-1. Полученные авторами результаты можно считать позитивными в плане определенного противовоспалительного потенциала DLC-покрытия и отсутствия его *in vitro* влияния на остеобласты, которые могут формироваться из МСК в условиях постимплантационного воспаления сосудистой стенки.

Согласно данным из литературы (Subramanian et al., 2018), DLC-пленка (*a*-C : H; толщиной ~75 нм), сформированная способом r.f.-PECVD в атмосфере

ацетилена (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) на кремниевых пластинах, несмотря на изменение контактного угла смачивания водой (74° с DLC-пленкой, 65° для исходной подложки) и свободной поверхностной энергии (19.7 мДж/м<sup>2</sup> с DLC-пленкой, 30.65 мДж/м<sup>2</sup> для Si-подложки), также не обладала способностью индуцировать остеогенную дифференцировку (по показателям активности щелочной фосфатазы и концентрации кальция) клеток остеосаркомы человека линии Saos-2 в 28-суточной культуре в присутствии остеогенных добавок (бета-глицерофосфата, дексаметазона и аскорбиновой кислоты).

В литературе удивительно мало публикаций на протяжении последних 20 лет, посвященных *in vitro* реакции ГМК на DLC-покрытия. Известно, что повреждение эндотелия кровеносных сосудов при установке стентов вызывает избыточную миграцию и пролиферацию ГМК, вызывающую гиперплазию неоинтимы и повторное сужение (рестеноз) просвета сосудов (Kornowski et al., 1998).

Бакакова с соавторами (Bacáková L. et al., 2001) изучали углеродный матрикс, усиленный углеволокном, с нанесенным двухслойным PECVD-покрытием из титана (внутренний слой толщиной 1 мкм) и углерода *a*-C : H (наружный слой толщиной 2.3 мкм). На образцы засеивали ГМК аорты крысы (после 9-го пассажа). Через 1 сут клетки в 1.5–2 раза лучше прикреплялись к покрытию; через 4 сут культивирования количество ГМК на покрытии в 2–3 раза превышало таковое на углеродной подложке. Уменьшение шероховатости подложки (снижение индекса  $R_a$  от 1.39–3.24 до 0.5–0.86 мкм) с помощью предварительного шлифования усиливало пролиферативную реакцию клеток.

ГМК склонны *in vitro* к выраженной пролиферации и секреции цитокинов в ответ на фактор роста из тромбоцитов (PDGF) в присутствии медицинской стали (Santin et al., 2004b). Поэтому ограничение адгезии тромбоцитов к искусственным поверхностям, включая DLC-пленки, способно снижать риск рестеноза (Santin et al., 2005).

Миобласты мыши линии C2C12, способные активно пролиферировать и дифференцироваться в клетки скелетной мускулатуры и кардиомиоциты, снижали на 20% (в сравнении с подложкой) степень своей 24-часовой адгезии к гидрофобному (контактный угол смачивания водой 71°–81°) *a*-C : H покрытию (62% C, 31% H, 2% O, 5% N), полученному способом r.f.-PECVD в атмосфере метана на полистироловой подложке культуральных планшетов. Напротив, 6-месячное “старение” покрытий в ambientных условиях (на воздухе при комнатной температуре) вызывало увеличение концентрации кислорода в ущерб углероду и водороду; 1-суточный прирост числа при-

крепившихся миобластов при этом достигал 10–30% только в течение 2–7 нед. после изготовления покрытия. Введение  $\text{SiO}_x$  в DLC-пленку (14–20%) nivelировало клеточную реакцию (Stoica et al., 2015). Авторы рассуждают о клеточной пролиферации, что сомнительно, исходя из времени культивирования (24 ч) и обычного подсчета клеточности с помощью проточного цитометра после открепления миобластов от подложки.

### ВЛИЯНИЕ КРЕМНИЯ И ЕГО ОКСИДОВ НА ГЕМО- И БИОСОВМЕСТИМОСТЬ АМОРФНЫХ УГЛЕРОДНЫХ ПОКРЫТИЙ *IN VITRO*

Аморфная природа DLC-покрытий позволяет внедрить в них различные химические элементы (Asakawa et al., 2011); начиная с 2000-х гг. модификация DLC-пленок легированием различными химическими элементами стала устойчивой тенденцией.

Одним из перспективных направлений является силиконирование DLC-покрытий, благодаря возможности с помощью введения Si и его оксидов модифицировать механические (твердость, коэффициент трения, устойчивость к износу) и биомедицинские свойства тонких пленок (Bociaga et al., 2017).

Физико-химические свойства  $\text{SiO}_x$ -DLC-пленок представлены в специализированном обзоре (Meškiniš, Tamulevičiene, 2011), согласно которому в них падает остаточное напряжение, что позволяет формировать пленки толщиной до 10 мкм; ударопрочность выше, чем в DLC-покрытии; контактный угол смачивания водой может варьироваться в пределах  $56^\circ$ – $100^\circ$ .

Группа авторов (Maguire et al., 2005) с помощью метода r.f.-PECVD в атмосфере аргона и ацетилена с добавлением тетраметилсилана получила на стальной подложке  $a\text{-C} : \text{H}$  и  $a\text{-C} : \text{H} : \text{Si}$  пленки толщиной 100–400 нм с содержанием Si до 10%. Ими было показано, что введение Si в состав покрытия  $a\text{-C} : \text{H}$  повышало его гидрофобность (контактный угол смачивания водой возрастал на  $17^\circ$  с ростом содержания Si до 7%), усиливало в 4 раза 6-часовую адгезию эндотелиальных клеток человека и тормозило 30-минутную адгезию тромбоцитов. Максимальный эффект проявлялся при концентрации Si в покрытии порядка 7–8%.

Похожие данные для пленок  $a\text{-C} : \text{H} : \text{Si}$  (5–10% Si), полученных r.f.-PECVD-технологией на кремниевой подложке в атмосфере аргона и ацетилена с добавлением тетраметилсилана, представлены в другой работе (Okpalugo et al., 2004). В сравнении с DLC-покрытием в состоянии  $a\text{-C} : \text{H}$ , рост концентрации Si до 5% приводил, как минимум, к 3-кратному усилению 6-часовой адгезии микрососудистых

эндотелиальных клеток человека с последующим выходом на плато. При этом поверхностная энергия слоев  $a\text{-C} : \text{H} : \text{Si}$  значительно уменьшалась по отношению к значению для  $a\text{-C} : \text{H}$ . В концентрации 7.6% Si авторы отметили двукратное падение числа агрегатов тромбоцитов человека в 15-минутном тесте (Okpalugo et al., 2004).

В еще одной работе (Ong et al., 2007) приведены результаты исследования DLC-пленок ( $a\text{-C}$ ), содержащих кремний в диапазоне 0–37 ат. %, наносимых методом магнетронного распыления графитового и кремниевого катода на кремниевую подложку. Рост содержания Si вызывал снижение уровня  $\text{sp}^2$  в пользу  $\text{sp}^3$ -гибридизированных атомов углерода и прогрессивное 2-кратное уменьшение адгезии кровяных пластинок из плазмы крови, обогащенной тромбоцитами. Изменение структуры углерода и повышение полярной компоненты свободной поверхностной энергии рассмотрены как механизмы улучшения гемосовместимости искусственной поверхности.

Другим механизмом атромбогенных свойств Si-DLC-покрытий (толщиной 182–239 нм), нанесенных методом r.f.-PECVD в атмосфере тетраметилсилана, считается повышение *in vitro* адгезии альбумина с ростом содержания Si в покрытии (4.5–17 ат. %). Как описано выше, это снижает адсорбцию фибриногена и адгезию тромбоцитов. Прогрессивно увеличивается и шероховатость поверхности Si-DLC (Ahmed et al., 2015), что может иметь, на наш взгляд, негативные последствия для контакта с кровью *in vivo*.

Пленки  $a\text{-C} : \text{H} : \text{Si}$ , сформированные методом r.f.-PECVD (подложка и толщина пленки не указаны), содержащие (10–15)–(18–20) ат. % кремния, 13–24 ат. % кислорода и 62–69 ат. % углерода, линейно повышают 6-часовую адгезию эндотелиальных клеток человека в сравнении с покрытием  $a\text{-C} : \text{H}$  (Okpalugo et al., 2006). Авторы заключили, что усиление гидрофобности поверхности (рост на  $12^\circ$ – $15^\circ$  контактного угла смачивания водой) улучшает в 5–6 раз *in vitro* взаимодействие с эндотелиальным слоем кровеносных сосудов. В похожей работе установлено, что при 5–11 ат. % Si в DLC-покрытии формируются положительно заряженные диполи, что также способствует *in vitro* адгезии негативно заряженных эндотелиальных клеток без снижения их жизнеспособности (Ogwu et al., 2007).

В то же время существует предел содержания фаз кремния и его оксидов ( $\text{Si-C/SiO}_x\text{C}_y$ ) в DLC-пленке, оказывающий *in vitro* положительный эффект на рост и поведение клеток. Напыление пленок одинаковой толщины (~250 нм) на сплав  $\text{Ti}_6\text{Al}_7\text{Nb}$  авторы проводили в одинаковых условиях в атмосфере аргона и воздуха в гибридной магнетронной распылительной системе, высокочастотной и на постоянном

токе. С ростом концентрации Si (0–22 ат. %) и кислорода (10–29 ат. %) соотношение  $sp^2/sp^3$  в DLC-покрытии варьировало в пределах 3.14–5.3; росла гидрофильность (угол смачивания водой прогрессивно падал от  $70^\circ$  до  $25^\circ$ ). Si-DLC-пленки линейно повышали (в сравнении с титановым сплавом и DLC-слоем) число и жизнеспособность эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 в 48-часовой культуре только до концентрации Si 14 ат. %. При максимальном силиконировании покрытия (22 ат. %) показатели не отличались от таковых для металлического сплава без покрытия (Bociaga et al., 2019). При этом ранее авторский коллектив показал однозначное подавление адгезии и активации тромбоцитов (в сравнении со сталью 316L) на DLC-покрытии при увеличении в нем концентрации Si в пределах 4–16 ат. % (Bociaga et al., 2016).

Снижение степени прикрепления и агрегации тромбоцитов в течение 24 ч, отсутствие токсического влияния на мононуклеарные лейкоциты крови человека обнаружено *in vitro* для пленок  $a-C:H:SiO_x$  толщиной 400 нм, приготовленных на полипропиленовых пластинах методом PACVD в атмосфере аргона и полифенилметилсилоксана (Grenadyorov et al., 2020). Негативный (по знаку заряда) поверхностный потенциал пленки DLC-SiO<sub>x</sub> рассматривается как механизм их биомедицинского эффекта (Grenadyorov et al., 2021).

В то же время, пленка Si-DLC (83.5 ат. % C, 2 ат. % N, 11 ат. % O, 3.3 ат. % Si) толщиной 30 нм, полученная ионно-ассистированным напылением, ингибировала активность калликреин-кининовой системы плазмы крови человека (в 4 раза по отношению к стальной подложке SUS316L; время тестирования 1 ч), но 1-часовая адгезия тромбоцитов повышалась в 2.5–3 раза в сравнении с контрольными подложками (полиэтилентерефталат; SUS 316L), несмотря на отрицательный заряд поверхности покрытия (Mochizuki et al., 2011).

Существуютстораживающие в плане потенциальной минерализации покрытий Si-DLC в кровеносных сосудах в условиях постимплантационного воспаления данные (Subramanian et al., 2018). Гидрофобное (угол смачивания водой  $84.4^\circ$ ; свободная поверхностная энергия  $7.1$  мДж/м<sup>2</sup>) покрытие  $a-C:H:Si$  (толщиной  $\sim 75$  нм), сформированное на кремниевых пластинах способом r.f.-PECVD в атмосфере тетраметилсилана, при близком коэффициенте шероховатости  $R_a$  (0.416–0.652 нм) способствовало, в отличие от чистой пленки  $a-C:H$  (угол смачивания водой  $74.3^\circ$ ; свободная поверхностная энергия  $19.7$  мДж/м<sup>2</sup>), остеогенной дифференцировке клеток остеосаркомы человека линии Saos-2 (28-суточная культура) в присутствии остеогенных добавок

(бета-глицерофосфата, дексаметазона, аскорбиновой кислоты). При этом достоверно возрастала активность щелочной фосфатазы (на 25%) и концентрация кальция в межклеточной среде (более чем на 1000%).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкие вариации физико-химических, механических и трибологических свойств аморфных DLC-пленок (толщины, шероховатости, соотношения  $sp^3/sp^2$ , смачиваемости, твердости, адгезионной прочности, коэффициента трения, скорости износа и др.), не всегда полностью контролируемых и обусловленных, в том числе, разнообразными подложками и методами нанесения (Ohtake et al., 2021), а также разброс методов биомедицинского тестирования *in vitro* (Wen et al., 2017) и неоднозначные клинические данные (Meireles et al., 2007; Salahas et al., 2007) не позволяют пока выделить наиболее подходящие покрытия по их гемо- (био-) совместимости для стентов, сердечных клапанов или перфузионных насосов.

В последние годы предприняты попытки связать физико-химические свойства DLC-пленок различных типов ( $ta-C$ ,  $a-C$ ,  $a-C:H$ ) между собой и с технологией их формирования, в том числе, в виде международного стандарта ISO 20523:2017 (Carbon based films – classification and designations. The international organization for standardization. Vernier: Geneva, Switzerland, 2017). Например, установлено линейное убывание  $sp^3$ -фазы алмаза и нанотвердости покрытий с ростом в них содержания водорода, сделано предположение о наибольшей пригодности слоев  $a-C:H$  для биомедицинских изделий (Ohtake et al., 2021).

Было проведено ранжирование клеточной реакции *in vitro* на 43 вида покрытия  $a-C:H$ , произведенного в Японии различными компаниями и университетами методами CVD или PVD и стерилизованного ультрафиолетом (Ohgoe et al., 2012). Изучали только адгезию эмбриональных фибробластов мыши линии NIH-3T3 в 4-суточной культуре; результаты классифицировали по количеству прикрепившихся клеток по 5-бальной шкале от низкой (1 балл) до очень высокой (5 баллов). В процессе тестирования 12 покрытий отслоились от кремниевой подложки. В оставшихся образцах удалось установить интервал концентрации водорода (0–40 ат. %) и плотности покрытия ( $1.5$ – $2.5$  г/см<sup>3</sup>), в пределах которых широко (1–5 баллов) варьировала клеточная реакция. В этом диапазоне клетки активнее (3–5 баллов) адгезировали к пленкам, полученным методами CVD (7 из 16 тестируемых образцов), чем к покрытиям, изготовленным методами PVD (2 из 9 образцов). Для соотношения  $sp^2/sp^3$  типов гибридизации явные за-

висимости не обнаружены (Ohgoe et al., 2012). Кроме того, авторы не учитывали шероховатость поверхности и многие другие показатели (устойчивость к износу и коррозии, электросопротивление, химическую инертность, ширину запрещенной зоны).

Наиболее сложными представляются медико-технические решения для формирования DLC-покрытий на стентах, поскольку ажурная конструкция внутрисосудистых имплантатов и наличие трех межфазных границ (кровь/покрытие, покрытие/подложка, покрытие/стенка артерии) требуют одновременного решения технологических вопросов, проблем тромборезистентности, ограничения воспалительных реакций и фиброза, рекрутирования и пролиферации эндотелиальных клеток, ингибиции миграции и избыточного роста ГМК (Santos et al., 2015).

В настоящее время требуется, по-видимому, смещение акцента с разрозненных фундаментальных исследований DLC-пленок к прикладным разработкам и изучению поведения конкретных покрытий для каждого вида медицинских изделий, контактирующих с кровью, исходя из комплекса конструкторских, (био)механических, физико-химических и биомедицинских требований.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-19-00186), а также государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации НШ-2495.2020.7 (Балтийский федеральный университет им. И. Канта).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беленков Е.А., Грешняков В.А. 2013. Классификация структурных разновидностей углерода. Физика твердого тела. Т. 55. № 8. С. 1640. (Belenkov E.A., Greshniakov V.A. 2013. Klassifikatsiya strukturnykh raznovidnostei ugleroda. Fizika Tverdogo Tela. V. 55. № 8. P. 1640.)
- Гренадёр А.С., Соловьёв А.А., Оскомов К.В. 2021. Влияние толщины гидрогенизированных углеродных пленок, легированных кремнием и кислородом, на свойства их поверхности. Журнал технической физики. Т. 91. № 1. С. 145. (Grenadyorov A.S., Soloviev A.A., Oskomov K.V. 2021. Vliyaniye tolschiny hidrogenizirovannykh uglerodnykh plenok, legirovannykh kremniem i kislorodom, na svoystva ih poverhnosti. Zhurnal tekhnicheskoy fiziki. T. 91. № 1. P. 145.)
- Ohgoe et al., 2012. Characteristic of silicon doped diamond like carbon thin films on surface properties and human serum albumin adsorption. Diam. Relat. Mater. V. 55. P. 108. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2015.03.016>
- Макарова Э.Б., Захаров Ю.М., Рубштейн А.П., Исайкин А.И. 2011. Интеграция костной ткани в пористые титановые импланты с алмазоподобными нанопокрывтиями. Гений ортопедии. Т. 4. С. 111. (Makarova E.B., Zakharov Yu.M., Rubshtein A.P., Isaikin A.I. 2011. Integration of bone tissue to porous titanium implants with diamond-like nanocoatings. Genij Ortopedii. V. 4. P. 111.)
- Чазова И.Е., Ощепкова Е.В. 2015. Борьба с сердечно-сосудистыми заболеваниями: проблемы и пути их решения на современном этапе. Вестник Росздравнадзора. Т. 5. С. 7. (Chazova I.E., Oshepkova E.V. Bor'ba s serdechno-sosudistymi zabolevaniyami: problemy i puti ih reshenia na sovremenom etape. Vestnik Roszdravnadzora. V. 5. P. 7.)
- Ahmed M.H., Byrne J.A., Ahmed W. 2015. Characteristic of silicon doped diamond like carbon thin films on surface properties and human serum albumin adsorption. Diam. Relat. Mater. V. 55. P. 108. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2015.03.016>
- Airoidi F., Colombo A., Tavano D., Stankovic G., Klugmann S., Paolillo V., Bonizzoni E., Briguori C., Carlino M., Montorfano M., Liistro F., Castelli A., Ferrari A., Sgura F., Di Mario C. 2004. Comparison of diamond like carbon coated stents versus uncoated stainless steel stent in coronary artery disease. Am. J. Cradiol. V. 93. P. 474. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2003.10.048>
- Alakoski E., Tiainen V.M., Soininen A., Konttinen Y.T. 2008. Load-bearing biomedical applications of diamond-like carbon coatings – current status. Open Orthop. J. V. 2. P. 43. <https://doi.org/10.2174/1874325000802010043>
- Aisenberg S., Chabot R. 1971. Ion-beam deposition of thin films of diamondlike carbon. J. Appl. Phys. V. 42. P. 2953.
- Ando K., Ishii K., Tada E., Kataoka K., Hirohata A., Goto K., Kobayashi K., Tsutsui H., Nakahama M., Nakashima H., Uchikawa S., Kanda J., Yasuda S., Yajima J., Kitabayashi H., Sakurai S., Nakanishi K., Inoue N., Noike H., Hasebe T., Sato T., Yamasaki M., Kimura T. 2017. Prospective multicenter registry to evaluate efficacy and safety of the newly developed diamond-like carbon-coated cobalt-chromium coronary stent system. Cardiovasc. Interv. Ther. V. 32. P. 225. <https://doi.org/10.1007/s12928-016-0407-z>
- Ansari M.O., Gauthaman K., Essa A., Bencherif S.A., Memic A. 2019. Graphene and Graphene-Based Materials in Biomedical Applications. Curr. Med. Chem. V. 26. P. 6834. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190705155854>
- Asakawa R., Nagashima S., Nakamura Y., Hasebe T., Suzuki T., Hotta A. 2011. Combining polymers with diamond-like carbon (DLC) for highly functionalized materials. Surf. Coat. Technol. V. 206. P. 676. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2011.02.064>
- Bacáková L., Starý V., Kofronová O., Lisá V. 2001. Polishing and coating carbon fiber-reinforced carbon composites with a carbon-titanium layer enhances adhesion and growth of osteoblast-like MG63 cells and vascular smooth muscle cells in vitro. J. Biomed. Mater Res. V. 54. P. 567.

- [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20010315\)54:4<567::AID-JBM140>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20010315)54:4<567::AID-JBM140>3.0.CO;2-Y)
- Benjamin E.J., Muntner P., Alonso A., Bittencourt M.S., Callaway C.W., Carson A.P., Chamberlain A.M., Chang A.R., Cheng S., Das S.R., Delling F.N., Djousse L., Elkind M.S.V., Ferguson J.F., Fornage M. et al. American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. 2019. Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. V. 139. P. e56. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000659>
- Bhaskar N., Sulyaeva V., Gatapova E., Kaichev V.V., Rogilo D., Khomyakov M., Rosinova M.L., Basu B. 2020. SiC<sub>x</sub>NyO<sub>z</sub> coatings enhance endothelialisation, bactericidal and reduce blood cell activation. *ACS Biomater. Sci. Eng.* V. 6. P. 5571. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.0c00472>
- Bociaga D., Kaminska M., Sobczyk-Guzenda A., Jastrzebski K., Swiatek L., Olejnik A. 2016. Surface properties and biological behaviour of Si-DLC coatings fabricated by a multi-target DC-RF magnetron sputtering method for medical applications. *Diam. Relat. Mater.* V. 67. P. 41. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2016.01.025>
- Bociaga D., Sobczyk-Guzenda A., Komorowski P., Balcerzak J., Jastrzebski K., Przybyszewska K., Kaczmarek A. 2019. Surface Characteristics and Biological Evaluation of Si-DLC Coatings Fabricated Using Magnetron Sputtering Method on Ti6Al7Nb Substrate. *Nanomater.* V. 9. P. 812. <https://doi.org/10.3390/nano9060812>
- Bociaga D., Sobczyk-Guzenda A., Szymanski W., Jedrzejczak A., Jastrzebska A., Olejnik A., Jastrzebski K. 2017. Mechanical properties, chemical analysis and evaluation of antimicrobial response of Si-DLC coatings fabricated on AISI 316 LVM substrate by a multi-target DC-RF magnetron sputtering method for potential biomedical applications. *Appl. Surf. Sci.* V. 417. P. 23. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.03.223>
- Farb A., Sangiorgi G., Carter A.J., Walley V.M., Edwards W.D., Schwartz R.S., Virmani R. 1999. Pathology of Acute and Chronic Coronary Stenting in Humans. *Circulation*. V. 99. P. 52. <https://doi.org/10.1161/01.cir.99.1.44>
- Fedel M., Motta A., Maniglio D., Migliaresi C. 2008. Surface properties and blood compatibility of commercially available diamond-like carbon coatings for cardiovascular devices. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* V. 90B. P. 338. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31291>
- Grenadyorov A.S., Oskirko V.O., Solovyev A.A., Oskomov K.V., Khlusov I.A. 2021. Wear and Corrosion Resistance of a-C:H:SiO<sub>x</sub> Coating on Medical 316L Stainless Steel. *J. Mater. Eng. Perform.* <https://doi.org/10.1007/s11665-020-05362-z>
- Grenadyorov A.S., Solovyev A.A., Ivanova N.M., Zhulkov M.O., Chernyavskiy A.M., Malashchenko V.V., Khlusov I.A. 2020. Enhancement of the adhesive strength of antithrombogenic and hemocompatible a-C:H:SiO<sub>x</sub> films to polypropylene. *Surf. Coat. Technol.* V. 399. P. 126132. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2020.126132>
- Hang R., Zhang M., Ma S., Chu P.K. 2012. Biological response of endothelial cells to diamond-like carbon-coated NiTi alloy. *J. Biomed. Mater. Res. A*. V. 100. P. 496. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33295>
- Hasebe T., Yohena S., Kamijo A., Okazaki Y., Hotta A., Takahashi K., Suzuki T. 2007. Fluorine doping into diamond-like carbon coatings inhibits protein adsorption and platelet activation. *J. Biomed. Mater. Res. A*. V. 83. P. 1192. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31340>
- Hauert R. 2003. A review of modified DLC coatings for biological applications. *Diamond Relat. Mater.* V. 12. P. 583. [https://doi.org/10.1016/S0925-9635\(03\)00081-5](https://doi.org/10.1016/S0925-9635(03)00081-5)
- Hedayati M., Neufeld M.J., Reynolds M.M., Kipper M.J. 2019. The quest for blood-compatible materials: Recent advances and future technologies. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* V. 138. P. 118. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2019.06.002>
- Horbett T.A. 2018. Fibrinogen adsorption to biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res. A*. V. 106. P. 2777. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36460>
- Khlusov I.A., Dekhtyar Y., Sharkeev Y.P., Pichugin V.F., Khlusova M.Y., Polyaka N., Tjulkins F., Vendinya V., Legostaeva E.V., Litvinova L.S., Shupletsova V.V., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Prosolov K.A. 2018. Nanoscale electrical potential and roughness of a calcium phosphate surface promotes the osteogenic phenotype of stromal cells. *Materials*. V. 11. P. 978. <https://doi.org/10.3390/ma11060978>
- Kornowski R., Hong M.K., Tio F.O., Bramwell O., Wu H., Leon M.B. 1998. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J. Am. Coll. Cardiol.* V. 31. P. 224. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(97\)00450-6](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(97)00450-6)
- Kwok S.C.H., Wang J., Chu P.K. 2005. Surface energy, wettability, and blood compatibility phosphorus doped diamond-like carbon films. *Diam. Relat. Mater.* V. 14. P. 78. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2004.07.019>
- Lancelotti P., Oury C., Jerome C., Pierard L.A. 2016. Graphene coating onto mechanical heart valve prosthesis ad resistance to flow dynamics. *Acta Cardiol.* V. 71. P. 253. <https://doi.org/10.1080/AC.71.3.3152084>
- Li D.J., Cui F.Z., Gu H.Q. 1999. Diamond-like carbon coating on poly(methylmethacrylate) prepared by ion beam deposition and ion beam-assisted deposition and its effect on cell adhesion. *J. Adhes. Sci. Technol.* V. 13. P. 169. <https://doi.org/10.1163/156856199x00370>
- Liao T.T., Zhang T.F., Li S.S., Deng Q.Y., Wu B.J., Zhang Y.Z., Zhou Y.J., Guo Y.B., Leng Y.X., Huang N. 2016. Biological responses of diamond-like carbon (DLC) films with different structures in biomedical application. *Mater. Sci. Eng. C*. V. 69. P. 751. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.064>
- Lima C.N., Moura D.S., Silva Y.S.S., Souza T.H., Crisafuli F.A.P., Silva D.C.N., Peres J.C., Cesar C.L., de Araujo R.E., Fontes A. 2020. Evaluating viscoelastic properties and membrane electrical charges of red blood cells with optical tweezers and cationic quantum dots – applications to β-thalassemia intermedia hemoglobinopathy.

- Colloids Surf. B. V. 186. P. 110671.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110671>
- Linder S., Pinkowski W., Aepfelbacher M. 2002. Adhesion, cytoskeletal architecture and activation status of primary human macrophages on a diamond-like carbon coated surface. *Biomater.* V. 23. P. 767.  
[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00182-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00182-X)
- Liza S., Hieda J., Akasaka H., Ohtake N., Tsutsumi Y., Nagai A., Hanawa T. 2017. Deposition of boron doped DLC films on TiNb and characterization of their mechanical properties and blood compatibility. *Sci. Technol. Adv. Mater.* V. 18. P. 76.  
<https://doi.org/10.1080/14686996.2016.1262196>
- Liu Y., Guo P., He X., Li L., Wang A., Li H. 2016. Developing transparent copper-doped diamond-like carbon films for marine antifouling applications. *Diam. Relat. Mater.* V. 69. P. 144.  
<https://doi.org/10.1016/j.diamond.2016.08.012>
- Lousinian S., Logothetidis S., Laskarakis A., Gioti M. 2007. Haemocompatibility of amorphous hydrogenated carbon thin films, optical properties and adsorption mechanisms of blood plasma proteins. *Biomol. Eng.* V. 24. P. 107.  
<https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.05.014>
- Maguire P.D., McLaughlin J.A., Okpalugo T.I.T., Lemoine P., Papakonstantinou P., McAdams E.T., Needham M., Ogwu A.A., Ball M., Abbas G.A. 2005. Mechanical stability, corrosion performance and bioresponse of amorphous diamond-like carbon for medical stents and guidewires. *Diamond Relat. Mater.* V. 14. P. 1277.  
<https://doi.org/10.1016/j.diamond.2004.12.023>
- Markhoff J., Krogull M., Schulze C., Rotsch C., Hunger S., Bader R. 2017. Biocompatibility and Inflammatory Potential of Titanium Alloys Cultivated with Human Osteoblasts, Fibroblasts and Macrophages. *Mater.* V. 10. P. 52.  
<https://doi.org/10.3390/ma10010052>
- Meireles G.C., de Abreu L.M., Forte A.A., Sumita M.K., Sumita J.H., Aliaga Jdel C. 2007. Randomized comparative study of diamond-like carbon coated stainless steel stent versus uncoated stent implantation in patients with coronary artery disease. *Arq. Bras. Cardiol.* V. 88. P. 390.  
<https://doi.org/10.1590/S0066-782X2007000400004>
- Meškinis Š., Tamulevičiene A. 2011. Structure, Properties and Applications of Diamond Like Nanocomposite (SiO<sub>x</sub> Containing DLC) Films: A Rev. *Mater. Sci.* V. 17. P. 358.  
<https://doi.org/10.5755/j01.ms.17.4.770>
- Mikhailovska L.I., Santin M., Denyer S.P., Lloyd A.W., Teer D.G., Field S., Mikhailovsky S.V. 2004. Fibrinogen adsorption and platelet adhesion to metal and carbon coatings. *Thromb Haemost.* V. 92. P. 1032. <https://doi.org/10.1160/TH04-03-0171>
- Mochizuki A., Ogawa T., Okamoto K., Nakatani T., Nitta Y. 2011. Blood compatibility of gas plasma-treated diamond-like carbon surface—Effect of physicochemical properties of DLC surface on blood compatibility. *Mater. Sci. Eng. C.* V. 31. P. 567.  
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2010.11.019>
- Nandakumar D., Bendavid A., Martin P.J., Harris K.D., Ruys A.J., Lord M.S. 2016. Fabrication of Semioordered Nanopatterned Diamond-like Carbon and Titania Films for Blood Contacting Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* V. 8. P. 6802.  
<https://doi.org/10.1021/acsami.5b11614>
- Newby A.C., Zaltsman A.B. 2000. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J. Pathol.* V. 190. P. 300.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(200002\)190:3<300::AID-PATH596>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<300::AID-PATH596>3.0.CO;2-I)
- Nistor P.A., May P.W. 2017. Diamond thin films: giving biomedical applications a new shine. *J. R. Soc. Interface.* V. 14. P. 20170382.  
<https://doi.org/10.1098/rsif.2017.0382>
- Ogwu A.A., Okpalugo T.I.T., Ali N., Maguire P.D., McLaughlin J.A.D. 2007. Endothelial cell growth on silicon modified hydrogenated amorphous carbon thin films. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* V. 85 B. P. 105.  
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.30922>
- Ohgoe Y., Hirakuri K.K., Saitoh H., Nakahigashi T., Ohtake N., Hirata A., Kanda K., Hiratsuka M., Fukui Y. 2012. Classification of DLC films in terms of biological response. *Surf. Coat. Technol.* V. 207. P. 350.  
<https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2012.07.018>
- Ohtake N., Hiratsuka M., Kanda K., Akasaka H., Tsujioka M., Hirakuri K., Hirata A., Ohana T., Inaba H., Kano M., Saitoh H. 2021. Properties and Classification of Diamond-Like Carbon Films. *Mater.* V. 14. P. E315.  
<https://doi.org/10.3390/ma14020315>
- Okpalugo T.I., Murphy H., Ogwu A.A., Abbas G., Ray S.C., Maguire P.D., McLaughlin J., McCullough R.W. 2006. Human microvascular endothelial cellular interaction with atomic N-doped DLC compared with Si-doped DLC thin films. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* V. 78. P. 222.  
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.30459>
- Okpalugo T.I.T., Ogwu A.A., Maguire P.D., McLaughlin J.A.D., Hirst D.G. 2004. In-vitro blood compatibility of a-C:H:Si and a-C:H thin films. *Diam. Relat. Mater.* V. 13. P. 1088.  
<https://doi.org/10.1016/j.diamond.2003.10.064>
- Ong S.E., Zhang S., Du H., Too H.C., Aung K.N. 2007. Influence of silicon concentration on the haemocompatibility of amorphous carbon. *Biomaterials.* V. 28. P. 4033.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.05.031>
- Owonubi S.J., Liganiso L.Z., Motaung T.E., Songca S.P., Revaprasadu N. 2019. Polymer and Carbon-Based Coatings for Biomedical Applications. In: *Photoenergy and Thin Film Materials*. Beverly, Scrivener Publishing LLC. P. 499.  
<https://doi.org/10.1002/9781119580546.ch12>
- Podila R., Moore T., Alexis F., Rao A. 2013. Graphene Coatings for Biomedical Implants. *J. Vis. Exp.* V. 73. P. e50276.  
<https://doi.org/10.3791/50276>
- Qiu J., Zheng Y., Hu J., Liao D., Gregersen H., Deng X., Fan Y., Wang G. 2014. Biomechanical regulation of vascular smooth muscle cell functions: from in vitro to in vivo understanding. *J. R. Soc. Interface* V. 11. P. 20130852.  
<https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0852>
- Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E. 2004. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 2nd ed.; San Diego, Elsevier Science Publishing Co., 864 p.

- Roger V.L., Go A.S., Lloyd-Jones D.M., Benjamin E.J., Berry J.D., Borden W.B., Bravata D.M., Dai S., Ford E.S., Fox C.S., Fullerton H.J., Gillespie C., Hailpern S.M., Heit J.A., Howard V.J., Kissela B.M. et al. 2012. Heart Disease and Stroke Statistics – 2012 Update: A Report from the American Heart Association. *Circulation*. V. 125. P. e2. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e31823ac046>
- Rohrbeck M., Fischer C.B., Wehner S., Meier J., Manz W. 2014. DLC-coated pure bioplastic foil. Effect of various sterilization methods on the surface morphology. *Vak. Forschung Prax.* V. 26. P. 42. <https://doi.org/10.1002/vipr.201400549>
- Roy R.K., Lee K.-R. 2007. Biomedical Applications of Diamond-Like Carbon Coatings: A Review. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* V. 83 B. P. 72. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30768>
- Salahas A., Vrahatis A., Karabinos I., Antonellis I., Ifantis G., Gavaliatsis I., Anthopoulos P., Tavernarakis A. 2007. Success, safety, and efficacy of implantation of diamond-like carbon-coated stents. *Angiology*. V. 58. P. 203. <https://doi.org/10.1177/0003319707300360>
- Santin M., Colombo P., Bruschi G. 2005. Interfacial biology of in-stent restenosis. *Expert Rev. Med. Devices*, V. 2. P. 429. <https://doi.org/10.1586/17434440.2.4.429>
- Santin M., Mikhalovska L., Lloyd A.W., Mikhalovsky S., Sigfrid L., Denyer S.P., Field S., Teer D. 2004a. In vitro host response assessment of biomaterials for cardiovascular stent manufacture. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* V. 15. P. 473. <https://doi.org/10.1023/B:JMSM.0000021123.51752.11>
- Santin M., Morris C., Harrison M., Mikhalovska L., Lloyd A.W., Mikhalovsky S. 2004b. Factors inducing in-stent restenosis: an in vitro model. *Med. J. Malaysia*. V. 59 B. P. 93.
- Santos M., Bilek M.M.M., Wise S.G. 2015. Plasma-synthesized carbon-based coatings for cardiovascular applications. *Biosurf. Biotribol.* V. 1. P. 146. <https://doi.org/10.1016/j.bsbt.2015.08.001>
- Schillinger M., Sabeti S., Dick P., Amighi J., Mlekusch W., Schlager O., Loewe C., Cejna M., Lammer J., Minar E. 2007. Sustained benefit at 2 years of primary femoropopliteal stenting compared with balloon angioplasty with optional stenting. *Circulation*. V. 115. P. 2745. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.688341>
- Sheeja D., Tay B.K., Nung L.N. 2005. Tribological characterization of surface modified UHMWPE against DLC-coated Co–Cr–Mo. *Surf. Coat. Technol.* V. 190. P. 231. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2004.02.051>
- Slany A., Meshcheryakova A., Beer A., Ankersmit H.J., Paulitschke V., Gerner C. 2014. Plasticity of fibroblasts demonstrated by tissue-specific and function-related proteome profiling. *Clin. Proteom.* V. 11. P. 41. <https://doi.org/10.1186/1559-0275-11-41>
- Stoica A., Manakhov A., Polčák J., Ondračka P., Buršíková V., Zajíčková R., Medalová J., Zajíčková L. 2015. Cell proliferation on modified DLC thin films prepared by plasma enhanced chemical vapor deposition. *Biointerphases*. V. 10. P. 029520. <https://doi.org/10.1116/1.4920978>
- Stoltz J.F. 1983. Vascular potential and thrombosis. *Thromb. Res.* V. 5. P. 73.
- Subramanian B., Thanka Rajan S., Martin P.J., Vaithilingam V., Bean P.A., Evans M.D.M., Bendavid A. 2018. Biomineralization of osteoblasts on DLC coated surfaces for bone implants. *Biointerphases*. V. 13. P. 041002. <https://doi.org/10.1116/1.5007805>
- Swiatek L., Olejnik A., Grabarczyk J., Jedrzejczak A., Sobczyk-Guzenda A., Kaminska M., Jakubowski W., Szymanski W., Bociaga D. 2016. Multi-doped diamond like-carbon coatings (DLC-Si/Ag) for biomedical applications fabricated using the modified chemical vapour deposition method. *Diam. Relat. Mater.* V. 67. P. 54. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2016.03.005>
- Thull R., Grant D. 2001. Physical and Chemical Vapor Deposition and Plasma-assisted Techniques for Coating Titanium. In: *Titanium in Medicine. Engineering Materials*. Berlin, Heidelberg, Springer. P. 283. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-56486-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-642-56486-4_10)
- Ugarova T.P., Yakubenko V.P. 2001. Recognition of fibrinogen by leukocyte integrins. *Ann N-Y Acad. Sci.* V. 936. P. 368. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03523.x>
- Virmani R., Guagliumi G., Farb A., Musumeci G., Grieco N., Motta T., Mihalec L., Tespili M., Valsecchi O., Kolodgie F.D. 2004. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious. *Circulation*. V. 109. P. 701. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000116202.41966.d4>
- Wei C., Pan W.-J., Hung M.-S. 2013. The effects of substrate roughness and associated surface properties on the biocompatibility of diamond-like carbon films. *Surf. Coat. Technol.* V. 224. P. 8. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2013.02.038>
- Wen F., Liu J., Xue J. 2017. The Studies of Diamond-Like Carbon Films as Biomaterials: *Rev. Colloids Surf. Sci.* V. 2. P. 81. <https://doi.org/10.11648/j.css.20170203.11>
- Wöhrle J., Nusser T., Langenwalder S., Heombach V., Kochs M. 2009. Carbon-coated stents in patients with acute coronary syndromes. *Clin. Cardiol.* V. 32. P. E1. <https://doi.org/10.1002/clc.20295>
- Yang Y., Asiri A.M., Tang Z., Du D., Lin Y. 2013. Graphene based materials for biomedical applications. *Mater. Today*. V. 16. P. 365. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.09.004>
- Yang P., Huang N., Leng Y.X., Chen J.Y., Fu R.K.Y., Kwok S.C.H., Leng Y., Chu P. 2003. Activation of platelets adhered on amorphous hydrogenated carbon (a-C:H) films synthesized by plasma immersion ion implantation-deposition (PIII-D). *Biomater.* V. 24. P. 2821. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00091-7](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00091-7)

## Cellular and Molecular Problems of Hemo- and Biocompatibility of Diamond-Like Carbon Films: A Brief Critical Review

A. E. Polukhina<sup>a, b</sup>, V. V. Malaschenko<sup>a, c</sup>, A. S. Grenadyorov<sup>a</sup>, K. A. Yurova<sup>c</sup>, A. A. Solovyev<sup>a</sup>,  
L. S. Litvinova<sup>c, \*</sup>, and I. A. Khlusov<sup>c, d, e</sup>

<sup>a</sup>*The Institute of High Current Electronics, SB Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634055 Russia*

<sup>b</sup>*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia*

<sup>c</sup>*Center for Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236041 Russia*

<sup>d</sup>*Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia*

<sup>e</sup>*Research School of Chemistry & Applied Biomedical Sciences at Tomsk Polytechnic University, Tomsk, 634050 Russia*

\**e-mail: larisalitinova@yandex.ru*

Thin amorphous films consisting of sp<sup>3</sup> (diamond) and sp<sup>2</sup> (graphite) hybridization of carbon atomic orbits and named therefore diamond-like carbon (DLC) have been reviewed according to the publications in the past two decades. A connection of biomedical and physical-chemical features of analyzed coatings was focused, mainly. The methods of coating depositions and general criteria to DLC films for cardiovascular implants, in vitro reaction of blood proteins, thrombocytes, leukocytes, fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells, and cellular and molecular aspects of hemo- and biocompatibility influenced by DLC films doped with silicon and its oxides have been provided. Wide variation of physical-chemical, mechanical and tribological properties of DLC films, a scatter of methods of their in vitro biomedical testing make it impossible to determine the most relevant coatings for specific applications in the field of stents, cardiac valves, and blood pumps. A necessity of shift of emphasis from discrete fundamental investigations of DLC films to applied elaborations as well an observation of certain coating behavior based on the engineering, biomechanical, physical-chemical, and biomedical specifications for each type of devices contacted with blood has been concluded.

**Keywords:** blood cells, blood vessel cells, fibrinogen, albumin, in vitro reaction, thin carbon coating, silicon doping, physical-chemical features

УДК 577.2

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ В ОПУХОЛИ И ЕЕ МИКРООКРУЖЕНИИ ПРИ Фолликулярной Лимфоме

© 2021 г. А. В. Горбунова<sup>1</sup> \*, Ю. А. Криволапов<sup>1</sup>, Е. С. Божокина<sup>2</sup>, И. В. Евсюков<sup>3</sup>,  
М. М. Фирулева<sup>3</sup>, П. В. Харченко<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова,  
Санкт-Петербург, 191015 Россия

<sup>2</sup>Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики,  
Санкт-Петербург, 197101 Россия

<sup>4</sup>Кафедра биомедицинской информатики Гарвардской медицинской школы, Бостон, Массачусетс, 02115 США

\*E-mail: anna.gorbunova@szgmu.ru

Поступила в редакцию 22.12.2020 г.

После доработки 19.01.2021 г.

Принята к публикации 19.01.2021 г.

По частоте встречаемости фолликулярная лимфома (ФЛ) занимает второе место среди неходжкинских лимфом. В настоящей работе проведен сравнительный анализ транскриптомов образцов опухолевой ткани пациентов с ФЛ в сравнении с контрольными образцами лимфоузлов с реактивной фолликулярной гиперплазией с целью поиска внутриклеточных сигнальных путей иммунного ответа, функционирование которых изменено в опухоли и ее микроокружении. Было обнаружено 997 генов, экспрессия которых различается в опухолевых и контрольных образцах. Из них 430 генов имеют повышенную экспрессию при ФЛ, а 567 генов демонстрируют пониженную экспрессию. Активированы сигнальные пути регуляции клеточного цикла, ответа клетки на стресс и повреждение ДНК, организации хромосом и процессинга РНК. Среди генов с пониженной экспрессией преобладают гены, ассоциированные с сигнальными путями, контролирующими иммунный ответ. Один из наиболее подавленных при ФЛ сигнальных путей контролирует активацию Т-лимфоцитов. Из 29 генов, участвующих в активации Т-клеток, экспрессия которых подавлена при ФЛ, три гена (*CD28*, *LAT*, *ZAP70*) вовлечены в передачу сигнала при анти-PD-1 терапии. Таким образом, уровень экспрессии этих генов у пациента потенциально может быть одним из биомаркеров, имеющим прогностическое значение при анти-PD-1 терапии при ФЛ.

**Ключевые слова:** фолликулярная лимфома, опухолевое микроокружение, контрольные иммунные точки, рецептор PD-1

**DOI:** 10.31857/S0041377121030032

Постулируемым неопухолевым аналогом клеток фолликулярной лимфомы (ФЛ) считаются В-лимфоциты центров размножения лимфоидных фолликулов. На первых этапах терапии ФЛ хорошо отвечает (как правило) на лечение, но в дальнейшем опухоль прогрессирует и теряет чувствительности к терапии. Для лечения В-клеточных лимфом применяется химиотерапия и таргетная терапия моноклональными антителами, обладающими специфичностью к CD20 антигену, обнаруживаемому на поверхности нормальных и малигнизированных В-лимфоцитов. Тем не менее, актуальна потребность в разработке методов лечения резистентных к терапии ФЛ.

Наиболее перспективным подходом считается применение ингибиторов иммунных контрольных точек, а именно антител против рецептора программируемой клеточной гибели (анти-PD-1), таких как ниволумаб и пембролизумаб, и антител против цитотоксических Т-лимфоцит-ассоциированных антигенов (анти-CTLA-4), таких как ипилимумаб. Механизм работы этих антител состоит в ингибировании молекул, блокирующих противоопухолевое действие иммунной системы организма (Pardoll, 2012). Клинические испытания ингибитора контрольных иммунных точек ниволумаба продемонстрировали низкую эффективность анти-PD-1 терапии у пациентов с ФЛ по сравнению с классической лимфомой Ходжкина. Общий показатель объективного ответа в случаях ФЛ был почти в два раза ниже, чем при классической лимфоме Ходжкина (40% против 87%). Было выдвинуто предположение о том,

**Принятые сокращения:** ФЛ – фолликулярная лимфома; BAM – бинарный файл для хранения нуклеотидных последовательностей после выравнивания на референсный геном (binary alignment map); FDR – частота ложноположительных результатов (false discovery rate).

что устойчивость опухоли к ингибиторам контрольных иммунных точек и химиотерапии может быть связана с сигнальными путями, ассоциированными с клетками микроокружения опухоли (Klemm, Joyce, 2015).

Таким образом, для разработки новых методов терапии ФЛ перспективным является изучение механизмов подавления противоопухолевого иммунного ответа. Для этого необходимо найти и исследовать сигнальные пути, связанные с иммунным ответом, функционирование которых изменено в опухоли и ее микроокружении, а также выявить потенциальные биомаркеры эффективности терапии ингибиторами иммунных контрольных точек при ФЛ.

Для решения этой задачи в настоящей работе проведен сравнительный полнотранскриптомный анализ образцов опухолевой ткани пациентов с ФЛ контрольных образцов лимфоузлов с неопухолевой реактивной фолликулярной гиперплазией.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Материал.** В работу включено 39 биопсийных образцов лимфатических узлов с ФЛ (цитологических подтипов 1–2 и 3а) и 9 контрольных биопсийных образцов лимфоузлов с реактивной фолликулярной гиперплазией. От всех пациентов было получено информированное согласие на хранение образцов и использование их для молекулярно-биологических исследований. Для установления морфологического диагноза использовали стандартные гистологические и иммуногистохимические исследования согласно классификации опухолей кроветворной и лимфоидной тканей (ВОЗ, 2017). Образцы опухолевой ткани криоконсервировали в жидком азоте не позднее, чем через 2 ч после проведения биопсии.

**Получение суспензии одиночных клеток.** Предварительно измельченные ткани помещали в среду DMEM (Gibco, США), содержащую 10% FBS (Hyclone, США), 2 мг/мл коллагеназы (Sigma, США) и 50 мкг/мл ДНКазы I (Roche, Германия) при 37°C на 30 мин. Суспензию клеток пропускали через фильтр с размером пор 70 мкм (BD Falcon, США), центрифугировали при 300 g 15 мин и осадок растворяли в буферном растворе PBS без ионов Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> (PBS–/–; Sigma, США). Жизнеспособность клеток проверяли визуально под микроскопом по окрашиванию трипановым синим (BioRad, США).

**Подготовка библиотек РНК и секвенирование.** Для полнотранскриптомного анализа РНК выделяли из криоконсервированных образцов лимфоузлов реактивом TRIzol™ (Invitrogen, США). Библиотеки готовили согласно рекомендациям производителя с помощью набора TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit for Illumina (with Ribo-Zero Human/Mouse/Rat) (Illumina, США). Секвенирование проводили на секвенаторе HiSeq 2500 (Illumina, США). Подготовку

библиотек и секвенирование проводили в ресурсном центре “Центр Биобанк”, СПбГУ.

**Контроль качества прочтений и выравнивание.** Контроль качества полученных данных осуществляли с помощью программы FastQC. Прочтения низкого качества отфильтровывали и удаляли инструментом Trimmomatic (Bolger et al., 2014). Прошедшие контроль качества прочтения выравнивали на референсный геном человека (версия GRCh38.p12) с использованием программы STAR (Spliced Transcripts Alignment to a Reference) (Dobin et al., 2013).

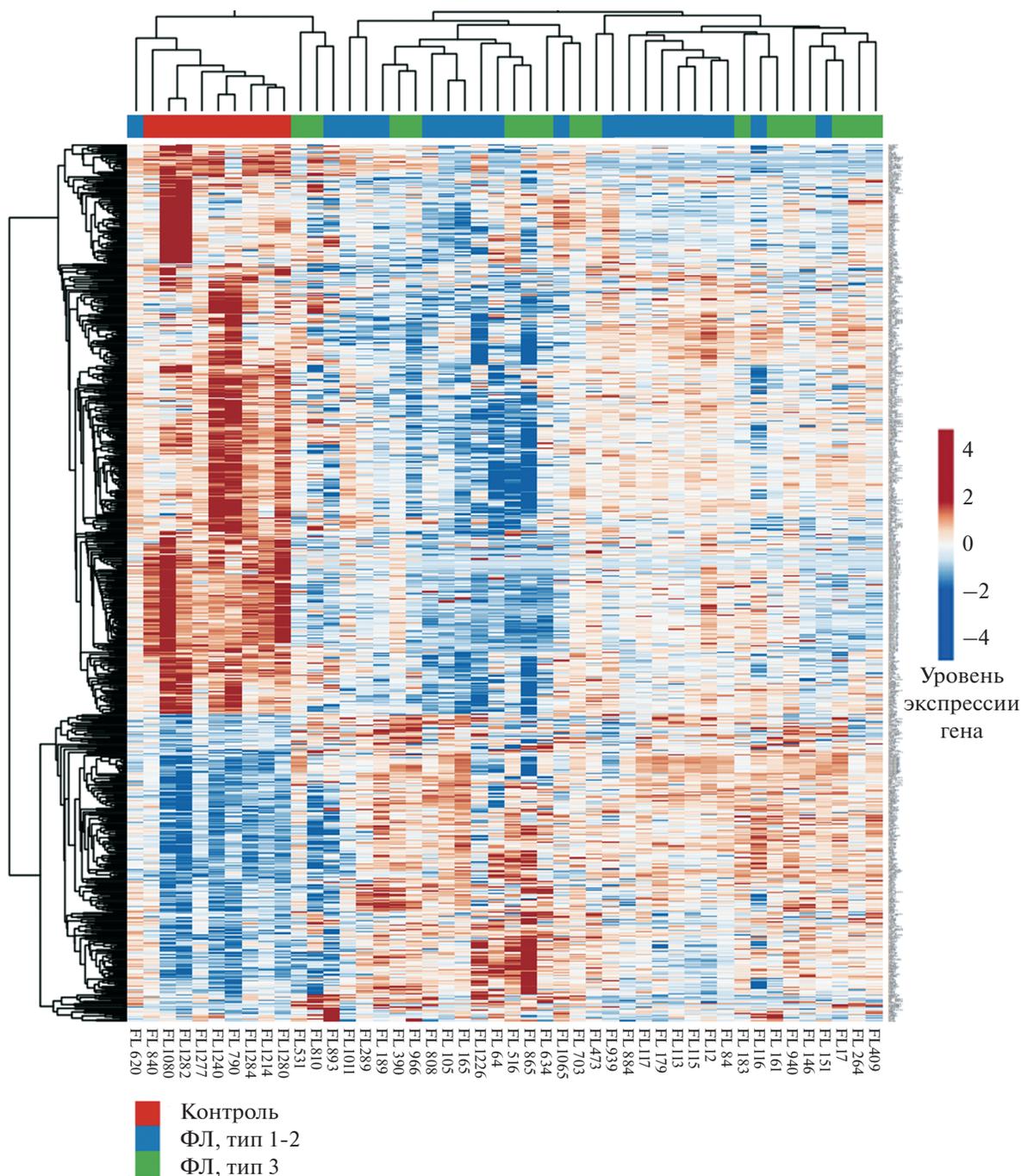
**Анализ экспрессии генов.** Количественный анализ данных на файлах формата BAM, полученных в результате выравнивания для каждого образца, проводили программой HTSeq-count. Для статистического анализа использовали пакет edgeR (Robinson et al., 2010), при помощи функции glmFit строили итоговую модель и выбрали для дальнейшего анализа данных гены с FDR < 0.05. Анализ представленности функциональных групп генов проводили на базе программы gprofiler (Raudvere et al., 2019).

**Приготовление библиотек и секвенирование одиночных клеток.** Подготовка библиотек и секвенирование одиночных клеток проводили с использованием оборудования 10x Genomics согласно инструкциям производителя (10x Genomics, Inc., США).

**Анализ данных секвенирования одиночных клеток.** Данные, полученные при секвенировании библиотек, демультиплексировали с использованием программного обеспечения 10x Cell Ranger и выравнивали на референсный геном человека (версия hg38). Для последующего анализа использовали клетку, содержащую не менее 1000 молекул. Клетки низкого качества дополнительно отфильтровывали с помощью функции gene.vs.molecule.cell.filter из пакета pagoda2 (<https://github.com/kharchenkolab/pagoda2>). Затем образцы визуализировали с использованием алгоритма машинного обучения, клеточные субпопуляции были определены с использованием алгоритма Лейдена ( $r = 1.8$ ). Аннотации проводили вручную с помощью браузера pagoda2 на основе дифференциально экспрессируемых генов и известных литературных маркеров.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полнотранскриптомный анализ позволяет количественно оценить уровень экспрессии каждого из более чем 20000 генов. Для исследования профиля экспрессии генов в экспериментальной (ФЛ) и контрольной группах анализировали дифференциальную экспрессию генов. Было обнаружено 997 генов, экспрессия которых статистически достоверно (FDR < 0.05) различается в опухолевых и контрольных образцах (рис. 1). Из них 430 генов имеют повышенную экспрессию при ФЛ (в том числе известные ранее гены *BCL2*, *BCL6*, *BCL7A*, *BLK*, *BTK*, *CD79A*,



**Рис. 1.** Экспрессия генов в образцах фолликулярной лимфомы (ФЛ, синие и зеленые столбцы) и неопухолевых образцах (контроль, красные столбцы). Цитологический тип ФЛ: 1–2 (синие столбцы) и 3 (зеленые столбцы). Степень их близости по профилю экспрессии отображена в виде дендрограммы. Уровень экспрессии каждого из генов (строки) обозначен цветом: красный – высокая, синий – низкая.

*CD79B, PAX5*) и 567 генов демонстрируют пониженную экспрессию.

Анализ обогащенности функциональных групп генов, представленных в каталоге GeneOntology, показал, что при ФЛ активированы такие группы генов, молекулярные функции которых относятся к

регуляции клеточного цикла, ответу клетки на стресс и повреждение ДНК, организации хромосом и процессинга РНК. Активация этих процессов и связанных с ними сигнальных путей и функциональных групп генов характерна для всех типов злокачественных опухолей, включая В-клеточные лим-

**Таблица 1.** Список генов, относящихся к функциональной группе активации Т-лимфоцитов, уровень экспрессии которых статистически значимо (FDR < 0.05) понижен при фолликулярной лимфоме

Обозначение гена	Полное название гена
<i>BCL11B</i>	BAF chromatin remodeling complex subunit BCL11B
<i>CAMK4</i>	Calcium/calmodulin dependent protein kinase IV
<i>CCR2</i>	C-C motif chemokine receptor 2
<i>CCR7</i>	C-C motif chemokine receptor 7
<i>CD28</i>	CD28 molecule
<i>CLEC7A</i>	C-type lectin domain containing 7A
<i>DPP4</i>	Dipeptidyl peptidase 4
<i>FCER1G</i>	Fc fragment of IgE receptor Ig
<i>GATA3</i>	GATA binding protein 3
<i>GRAP2</i>	GRB2 related adaptor protein 2
<i>IDO1</i>	Indoleamine 2,3-dioxygenase 1
<i>IL15</i>	Interleukin 15
<i>IL23R</i>	Interleukin 23 receptor
<i>IL6R</i>	Interleukin 6 receptor
<i>IL7R</i>	Interleukin 7 receptor
<i>IRF1</i>	Interferon regulatory factor 1
<i>ITK</i>	IL2 inducible T cell kinase
<i>LAT</i>	Linker for activation of T cells
<i>LEF1</i>	Lymphoid enhancer binding factor 1
<i>PRKCC</i>	protein kinase C theta
<i>RUNX2</i>	Runt related transcription factor 2
<i>SPN</i>	Sialophorin
<i>TCF7</i>	Transcription factor 7
<i>THEMIS</i>	Thymocyte selection associated
<i>TMIGD2</i>	Transmembrane and immunoglobulin domain containing 2
<i>TNFSF13B</i>	TNF superfamily member 13b
<i>VSIR</i>	V-set immunoregulatory receptor
<i>XBP1</i>	X-box binding protein 1
<i>ZAP70</i>	Zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70

фомы. В ФЛ по сравнению с солидными опухолями закономерно активирован сигнальный путь В-клеточного рецептора.

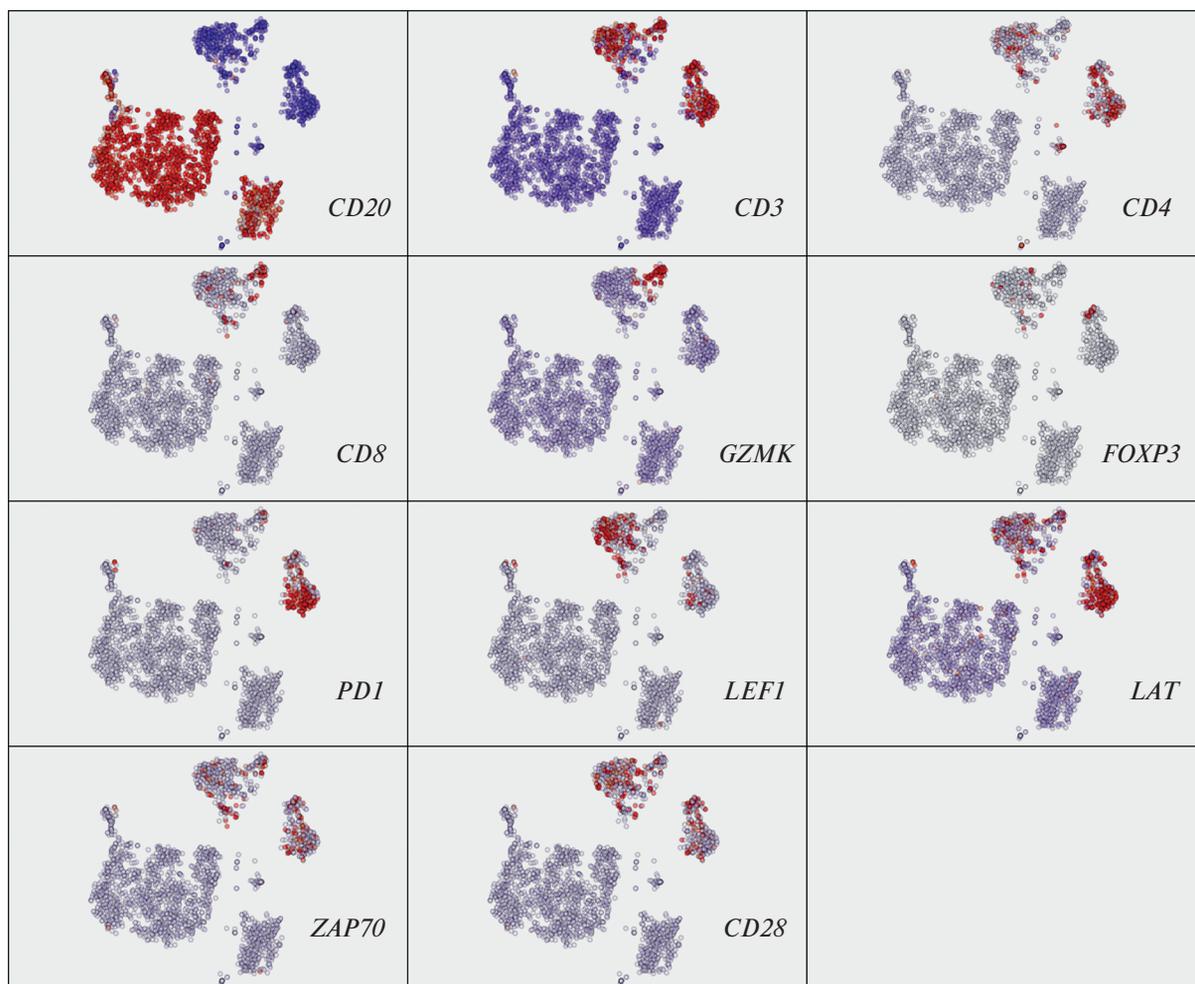
Среди генов с пониженной экспрессией преобладали гены, ассоциированные с сигнальными путями, контролирующими иммунный ответ. Один из наиболее подавленных при ФЛ сигнальных путей контролирует активацию Т-лимфоцитов.

Экспрессия 29 генов из этой функциональной группы понижена при ФЛ (табл. 1). Некоторые из них (*LAT* и *BCL11B*) ассоциированы с синдромом приобретенного иммунодефицита. Из 29 генов, участвующих в активации Т-клеток, экспрессия которых подавлена при ФЛ, три гена (*CD28*, *LAT*, *ZAP70*) вовлечены в передачу сигнала при анти-PD-1 терапии. Уровень экспрессии этих генов в опухоли потенциально может быть биомаркером, имеющим предиктивное значение для анти-PD-1 терапии ФЛ.

Маркерный белок CD28 играет ключевую роль в активации наивных Т-клеток, которая возможна только при костимуляции за счет связывания Т-клеточного рецептора (TCR) с главным комплексом гистосовместимости (МНС) на поверхности антиген-презентирующей клетки и одновременного связывания рецептора CD28 с его лигандом B7. Ассоциация Т-клеточного рецептора наивной Т-клетки с комплексом МНС без костимуляции взаимодействием CD28 и B7 приводит к анергии Т-лимфоцита. Показана (Hui et al., 2017) ключевая роль CD28 в эффективности анти-PD-1 терапии, поскольку CD28 непосредственно участвует в сигнальном пути PD-1. Белок CD28 необходим при анти-PD-1 терапии для обеспечения эффективной элиминации опухолевых клеток (Kamphorst et al., 2017). Было обнаружено прогностическое значение уровня экспрессии CD28 при аденокарциноме легкого (Zheng et al., 2018) и диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфоме (Wang et al., 2019).

Ген *LAT* (Linker for Activation of T-cells) кодирует трансмембранный белок, необходимый для внутриклеточной передачи сигнала с Т-клеточного рецептора (TCR) в Т-лимфоцитах на всех стадиях их развития. Белок *LAT* служит субстратом для белка *ZAP70* и необходим для активации Т-клеток (Zhang et al., 1998). Известно, что мутации в этом гене, приводящие к потере функции белка и утрате Т-клетками способности к нормальному функционированию, сопровождаются развитием тяжелого иммунодефицита (Keller et al., 2016).

Белок *ZAP70* (zeta chain of T Cell receptor associated protein kinase 70) является частью Т-клеточного рецептора и выполняет критическую роль в передаче сигналов Т-клеток. Анализ экспрессии генов в одиночных клетках опухолевой ткани показал неоднородность уровня экспрессии генов, контролирующей активацию Т-клеток, в различных субпопуляциях лимфоцитов (рис. 2).



**Рис. 2.** Экспрессия генов в популяциях клеток опухоли и микроокружения по данным анализа одиночных клеток методом главных компонент. Каждая точка представляет собой отдельную клетку. Клетки объединены в кластеры на основе сходства профиля экспрессии генов. *Красным цветом* обозначен высокий уровень экспрессии гена, синим — *низкий*. Кластер клеток, маркированный высокой экспрессией гена *CD20*, объединяет опухолевые клетки. Кластер клеток с высокой экспрессией гена *CD3* — Т-лимфоциты микроокружения опухоли.

Экспрессия гена *CD20* (рис. 2: красный — высокий уровень экспрессии, синий — низкий) маркирует В-клетки, присутствующие в образце. В-клетки образуют единый кластер, состоящий из опухолевых клеток, которые относительно однородны по характеру экспрессии генов.

Все остальные клеточные субпопуляции представляют собой микроокружение опухоли, состоящее из неопухолевых клеток. Как можно отметить на рис. 2, большая часть микроокружения образована Т-лимфоцитами (эти клетки маркирует экспрессия гена *CD3*). Помимо Т-лимфоцитов можно отметить еще два хорошо заметных (хотя и немногочисленных) кластера НК-клеток и макрофагов. Количество макрофагов в данных секвенирования одиночных клеток очень невелико по сравнению с их количеством в соответствующем гистологическом препарате, что, вероятно, объясняется большими размерами этих клеток, так как крупные клетки гораздо легче

разрушаются при замораживании тканей и в процессе приготовления библиотек для секвенирования. Количество НК-клеток также невелико по сравнению с популяциями Т-клеток.

Т-лимфоциты, присутствующие в микроокружении ФЛ, представляют собой неоднородную группу, состоящую из отдельных субпопуляционных кластеров. Несколько таких кластеров маркированы экспрессией гена *CD4*, в то время как другие кластеры экспрессируют ген *CD8*.

Один из кластеров  $CD4^+$  представляет собой популяцию Т-регуляторных лимфоцитов  $FOXP3^+$ , которые способны регулировать иммунный ответ путем подавления активности цитотоксических  $CD8^+$ -клеток. Второй  $CD4^+$ -кластер характеризуется очень высокой экспрессией гена *PD-1*, которая отмечается во всех популяциях Т-клеток, однако на значительно более низком уровне. Экспрессия гена *LEF1* (лим-

phoid enhancer binding factor 1) маркирует кластеры наивных Т-лимфоцитов, не имевших контакта с антигеном.

Наиболее важная с точки зрения противоопухолевого ответа популяция цитотоксических Т-лимфоцитов CD8<sup>+</sup> маркирована экспрессией гена *GZMK*, который кодирует основной компонент цитотоксических гранул. Видно, что количество цитотоксических клеток в микроокружении сопоставимо с количеством клеток самой опухоли. Эти клетки экспрессируют костимулирующие молекулы CD28 и ZAP70 на том же уровне, что и другие субпопуляции Т-клеток. В то же время, гены *LAT* и *LEFI*, также участвующие в активации Т-лимфоцитов, экспрессируются в цитотоксических Т-клетках на заметно более низком уровне, чем в других субпопуляциях.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что вероятной причиной низкой эффективности применения ингибиторов контрольных точек иммунитета при ФЛ является низкий уровень экспрессии генов, участвующих в передаче сигнала при анти-PD-1 терапии, прежде всего, *CD28*. Уровень экспрессии этих ключевых генов потенциально может быть одним из биомаркеров, имеющих предиктивное значение в отношении эффективности терапии ингибиторами иммунных контрольных точек.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-54-33051).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с участием людей соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике СЗГМУ им. И.И. Мечникова и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям, или сопоставимым нормам этики. От каждого из пациентов получено информированное добровольное согласие на хранение образцов и использование их для молекулярно-биологических исследований.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

*Bolger A.M., Lohse M., Usadel B.* 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, V. 30. P. 2114. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

*Dobin A., Davis C., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.* 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. V. 29. P. 15. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>

*Hui E., Cheung J., Zhu J., Su X., Taylor M., Wallweber H., Sasmal D., Huang J., Kim J., Mellman I., Vale R.* 2017. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science*. V. 355. P. 1428. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1292>

*Kamphorst A.O., Wieland A., Nasti T., Yang S., Zhang R., Barber D., Konieczny B.T., Daugherty C.Z., Koenig L., Yu K., Sica G.L., Sharpe A.H., Freeman G.J., Blazar B.R., Turka L.A. et al.* 2017. Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science*. V. 355. P. 1423. <https://doi.org/10.1126/science.aaf0683>

*Keller B., Zaidman I., Yousefi O.S., Hershkovitz D., Stein J., Unger S., Schachtrup K., Sigvardsson M., Kuperman A.A., Shaag A., Schamel W.W., Elpeleg O., Warnatz K., Stepensky P.* 2016. Early onset combined immunodeficiency and autoimmunity in patients with loss-of-function mutation in *LAT*. *J. Exp. Med.* V. 213. P. 1185. <https://doi.org/10.1084/jem.20151110>

*Klemm F., Joyce J.A.* 2015. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. *Trends Cell Biol.* V. 25. P. 198. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.11.006>

*Pardoll D.M.* 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer*. V. 12. P. 252. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>

*Raudvere U., Kolberg L., Kuzmin I., Arak T., Adler P., Peterson H., Vilo J.* 2019. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res.* V. 47. P. 191. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz369>

*Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K.* 2010. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. V. 26. P. 139. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>

*Wang G., Fu X., Chang Y., Xin Li, Wu X., Li L., Zhang L., Sun Z., Zhang X., Zhang M.* 2019. B7-CD28 gene family expression is associated with prognostic and immunological characteristics of diffuse large B-cell lymphoma. *Aging (Albany NY)*. V. 11. P. 3939. <http://doi.org/> <https://doi.org/10.18632/aging.10202>

*Zhang W., Sloan-Lancaster J., Kitchen J., Tribble R.P., Samelson L.E.* 1998. *LAT*: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell*. V. 92. P. 83. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80901-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80901-0)

*Zheng S., Luo X., Dong C., Zheng D., Xie J., Zhuge L., Sun Y., Chen H.* 2018. A B7-CD28 family based signature demonstrates significantly different prognoses and tumor immune landscapes in lung adenocarcinoma. *Int. J. Cancer*. V. 143. P. 2592. <https://doi.org/10.1002/ijc.31764>

## Tumor and Its Microenvironments Gene Expression in Follicular Lymphoma

A. V. Gorbunova<sup>a, \*</sup>, Yu. A. Krivolapov<sup>a</sup>, E. S. Bozhokina<sup>b</sup>, I. V. Evsyukov<sup>c</sup>,  
M. M. Firuleva<sup>c</sup>, and P. V. Kharchenk<sup>d</sup>

<sup>a</sup>*Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, 191015 Russia*

<sup>b</sup>*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*

<sup>c</sup>*ITMO University, St. Petersburg, 197101 Russia*

<sup>d</sup>*Department of Biomedical Informatics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, 02115 USA*

\**e-mail: anna.gorbunova@szgmu.ru*

Follicular lymphoma (FL) is the second most common non-Hodgkin lymphoma. For searching the signaling pathways associated with the immune response, the functioning of which is altered in the tumor and its microenvironment, a comparative analysis of transcriptomes of tumor tissue samples from patients with FL was carried out in comparison with control samples of lymph nodes without tumor growth. We identified a total of 997 differentially expressed genes, including 430 upregulated and 567 downregulated genes in tumor samples. Upregulated genes were enriched in the canonical pathway gene sets associated with cell cycle, cellular response to stress, DNA repair, chromosome organization and RNA processing. Downregulated genes were enriched in gene sets related to the immune response. One of the most suppressed signaling pathways in FL controls the activation of T-lymphocytes. Out of the 29 genes involved in the activation of T cells, the expression of which is suppressed in FL, three (*CD28*, *LAT*, *ZAP70*) are involved in signal transduction in anti-PD-1 therapy. Thus, the level of expression of these genes in a patient can potentially be one of the biomarkers that have predictive value in anti-PD-1 therapy in FL.

**Keywords:** follicular lymphoma, tumor microenvironment, immune checkpoints, PD-1 recepto

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЦИТОСТАТИКОВ В 3D-УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В СРАВНЕНИИ С МОНОСЛОЙНОЙ КУЛЬТУРОЙ

© 2021 г. Е. В. Кудан<sup>1, \*</sup>, С. П. Кудан<sup>2</sup>, С. Ш. Каршиева<sup>1, 3</sup>, Ю. Д. Хесуани<sup>1</sup>,  
В. А. Миронов<sup>1, 4</sup>, Е. А. Буланова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория биотехнологических исследований “3Д Биопринтинг Солюшенс”, Москва, 115409 Россия

<sup>2</sup>Школа №1568 им. Пабло Неруды, Москва, 127221 Россия

<sup>3</sup>Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, 115478 Россия

<sup>4</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва 119991 Россия

\*E-mail: koudan1980@gmail.com

Поступила в редакцию 28.12.2020 г.

После доработки 19.01.2021 г.

Принята к публикации 21.01.2021 г.

Селективный скрининг лекарственных средств с использованием моделей *in vitro* на основе монослойных 2D-культур широко используется в фармакологии, однако впоследствии полученные данные не всегда хорошо коррелируют с результатами клинических исследований. В связи с этим все большее распространение получают 3D-модели, отражающие все виды межклеточных взаимодействий и взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом, позволяющие адекватнее моделировать специфическую архитектуру ткани. Одной из таких моделей являются трехмерные сфероиды. В настоящей работе проведена оценка антипролиферативной и цитотоксической активности препаратов цисплатина, доксорубицина, фторурацила и этопозида на клеточных линиях Vero CCL-81 и HEK293 в условиях 2D- (монослойная культура) и 3D-культивирования (сфероиды). Сравнительный анализ антипролиферативной (IC<sub>50</sub>) и цитотоксической (CC<sub>50</sub>) активности цитостатиков для этих двух методов культивирования показал, что антипролиферативная активность была выше в условиях 2D-, в то время как цитотоксичность эффективнее выявлялась в условиях 3D-культивирования. Пониженная антипролиферативная активность препаратов в 3D-условиях может быть объяснена большей устойчивостью клеток к действию агентов благодаря физиологическим условиям культивирования. При этом более выраженное проявление цитотоксических эффектов в условиях 3D по сравнению с 2D позволяет предположить, что использование сфероидов будет способствовать выявлению ранней токсичности на стадии доклинических исследований *in vitro*. Наши данные показали, что при тестировании лекарственных средств необходимо учитывать тип клеток, скорость их пролиферации, а в случае сфероидов дополнительно подбирать их оптимальный диаметр для клеток каждого типа.

**Ключевые слова:** сфероиды, монослой, лекарственные препараты, антипролиферативная активность, цитотоксичность

**DOI:** 10.31857/S0041377121030068

Многие перспективные кандидаты на лекарственные средства отсеиваются на стадии клинических исследований из-за несовершенства существующих тест-систем доклинического скрининга *in vitro*, использующих исключительно монослойные культуры (Brajša et al., 2016a; Fang, Eglén, 2017). При культивировании в 2D-условиях клетки вынуждены адаптироваться к плоской поверхности, при-

обретая уплощенную распластанную форму, нехарактерную для клеток в живом организме. Кроме того, в монослойной культуре отсутствует большая часть видов межклеточных контактов и контактов клеток с внеклеточным матриксом. Это приводит к нарушению клеточного метаболизма, кинетики клеточного цикла и влияет на функциональность клеток. Например, гепатоциты, культивируемые в монослое, теряют признаки биохимической специализации за один цикл репликации, при этом в составе сфероидов остаются в дифференцированном состоянии длительное время (Thomas et al., 2005; Jasmund et al., 2007). В настоящее время появляется все больше

**Принятые сокращения:** CC<sub>50</sub> – концентрация препарата, при которой наблюдается гибель 50% клеток (cytotoxic concentration); IC<sub>50</sub> – концентрация препарата, которая вызывает снижение количества живых метаболически активных клеток на 50% (inhibitory concentration).

исследований, посвященных созданию трехмерных моделей, более точно отражающих архитектуру тканей и органов (Pampaloni et al., 2007; Baker, Chen, 2012; Bissell, 2017).

Среди 3D-структур можно выделить два основных типа: 1) трехмерные структуры на основе каркасов из биополимеров (коллагена, матригеля, фибрина и т.п.), содержащие внутри клетки; 2) сфероиды, представляющие собой шарообразные агрегаты, сформированные одним или несколькими типами клеток (Langhans, 2018). В последнее время стремительно развиваются методики получения органоидов, представляющих собой микроструктуры, спонтанно образуемые при культивировании в слое гидрогеля кусочков тканей, эмбриональных стволовых клеток или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (Lancaster, Knoblich, 2014; Fatehullah et al., 2016).

Обсуждая возможность использования 3D-структур в качестве моделей для доклинического скрининга, следует помнить о ряде требований, предъявляемых к *in vitro* моделям. Они должны быть относительно недорогими, простыми, хорошо воспроизводимыми, т.е. стандартизованными; их создание не должно занимать много времени. С этой точки зрения очевидно, что сфероиды являются наиболее перспективными 3D-структурами для создания *in vitro* моделей. Использование трехмерных каркасов из биополимеров не позволяет унифицировать и масштабировать процесс производства 3D-структур, а также не подразумевает автоматическую количественную оценку образцов.

Формирование органоидов является очень длительным и дорогостоящим процессом и не может быть использовано на начальных стадиях доклинического скрининга. В противоположность этому формирование сфероидов в большинстве случаев занимает 24 ч и происходит в многоруночных культуральных планшетах, совместимых с любыми автоматическими системами дозирования, визуализации и анализа (Monjaret et al., 2016; Eke et al., 2016). Варьирование первоначального количества клеток в сфероиде позволяет влиять на диаметр сфероида и скорость пролиферации клеток внутри сфероида (Koudan et al., 2020). Известно, что расстояние, на которое возможно проникновение кислорода и питательных веществ, составляет 100–150 мкм (Kinney et al., 2014). Это означает, что для эффективного проникновения лекарственных препаратов и красителей в сфероид, а также отсутствия некроза в центре сфероида, его диаметр не должен превышать 200–250 мкм. Также не менее важным параметром является скорость пролиферации клеток в сфероиде. Особенно это важно при тестировании цитостатиков, действие которых основано на подавлении пролиферации клеток.

Известно, что не все типы клеток пролиферируют внутри сфероидов (Koudan et al., 2020). Для настоящей работы были выбраны клеточные линии Vero CCL-81 и HEK293, сохраняющие способность к пролиферации в условиях 3D-культивирования. В работе исследована антипролиферативная и цитотоксическая активность цисплатина, доксорубицина, фторурацила и этопозида на монослойной культуре и в сфероидах, сформированных из клеточных линий Vero CCL-81 и HEK293. Сравнительный анализ активности цитостатиков в условиях 2D и 3D показал, что сфероиды оптимального диаметра, состоящие из пролиферирующих клеток, могут являться отличным дополнением к существующим 2D-моделям для тестирования лекарственных средств *in vitro*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Формирование сфероидов.** В работе использовали клетки линий HEK293 и Vero CCL-81 (из коллекции АТСС). Клетки культивировали в среде DMEM (Gibco, США), содержащей 2 mM L-глутамин (Панэко, Россия) и 1-кратный раствор антибиотика-антимикотика (Gibco, США) с добавлением 10% (v/v) фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Для снятия клеток с подложки использовали раствор Версена (Панэко, Россия) и 0.25% раствор трипсина–ЭДТА (Gibco, США).

Сфероиды получали с помощью агарозных форм и с помощью 96-луночных планшетов с низкоадгезивным покрытием. Оба метода используют один и тот же принцип формирования сфероидов, а именно: в условиях неадгезивной поверхности клетки не прикрепляются и не распластаются на субстрате, а взаимодействуют друг с другом, устанавливая межклеточные контакты и образуя сфероиды.

**Формирование сфероидов с помощью агарозных форм** проводили с использованием микро-молдов для создания агарозных форм (Microtissues, США) согласно протоколу производителя. Готовили 2%-ный раствор агарозы (Хеликон, Россия) в фосфатно-солевом буферном растворе (Gibco, США). Вносили в микро-молды для создания агарозных форм по 450 мкл расплавленной агарозы. После застывания агарозы (~4 мин) переворачивали микро-молды и извлекали образовавшиеся агарозные формы. Готовили суспензию клеток в культуральной среде с концентрацией 337000 кл./мл. В каждую агарозную форму, содержащую 256 ячеек, вносили по 190 мкл суспензии. Таким образом, итоговая концентрация составляла 250 клеток на ячейку или 250 клеток на сфероид. Агарозные формы с клетками помещали в ячейки 12-луночных планшетов, содержащие культуральную среду, и инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч для формирования сфероидов.

Для формирования сфероидов с помощью 96-луночных планшетов с низкоадгезивным покрытием использовали планшеты фирмы Corning (США). Готовили суспензию клеток в культуральной среде с концентрацией 2500 кл./мл. В каждую ячейку планшета вносили по 100 мкл суспензии. Для формирования сфероидов планшеты инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч.

**Изучение кинетики роста сфероидов.** Для формирования сфероидов нами был использован метод их получения при помощи агарозных форм, так как он позволяет получить большее количество статистических данных для анализа по сравнению с методом формирования в планшетах. Сфероиды получали с помощью агарозных форм согласно процедуре, описанной выше. Для формирования сфероидов использовали следующие концентрации клеток: 2000, 1000, 500 и 250 клеток на сфероид. Для изучения кинетики роста тканевых сфероидов проводили оценку их диаметров на протяжении 7 сут. Для этого фотографировали сфероиды во временных точках 1, 2, 3, 4 и 7 сут с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-S (Nikon, Япония).

**Оценка жизнеспособности клеток с помощью тест-системы CellTiter-Glo 3D и путем измерения диаметров сфероидов.** С помощью 96-луночных планшетов с низкоадгезивным покрытием сформировали сфероиды с первоначальной концентрацией 250 клеток на 1 сфероид. Для формирования монослоя с такой же концентрацией клеток в каждую ячейку 96-луночных культуральных планшетов с плоским дном посадили по 250 клеток. Через 24 ч к клеткам в монослое и к сфероидам добавили препараты в тестируемых концентрациях (10<sup>-3</sup>–10<sup>-8</sup> М для цисплатина, доксорубина и этопозиды (Эбеве Фарма, Австрия) и 10<sup>-2</sup>–10<sup>-7</sup> М для фторурацила (Тева, Нидерланды), шаг разбавления 3.16) и культивировали в течение 72 ч. Через 72 ч фотографировали сфероиды с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-S (Nikon, Япония) для последующего расчета диаметров сфероидов, после чего в каждую лунку планшетов добавляли CellTiter-Glo 3D (Promega, США) в соотношении 1 : 1 по объему и инкубировали на протяжении 30 мин (для клеток) или 90 мин (для сфероидов).

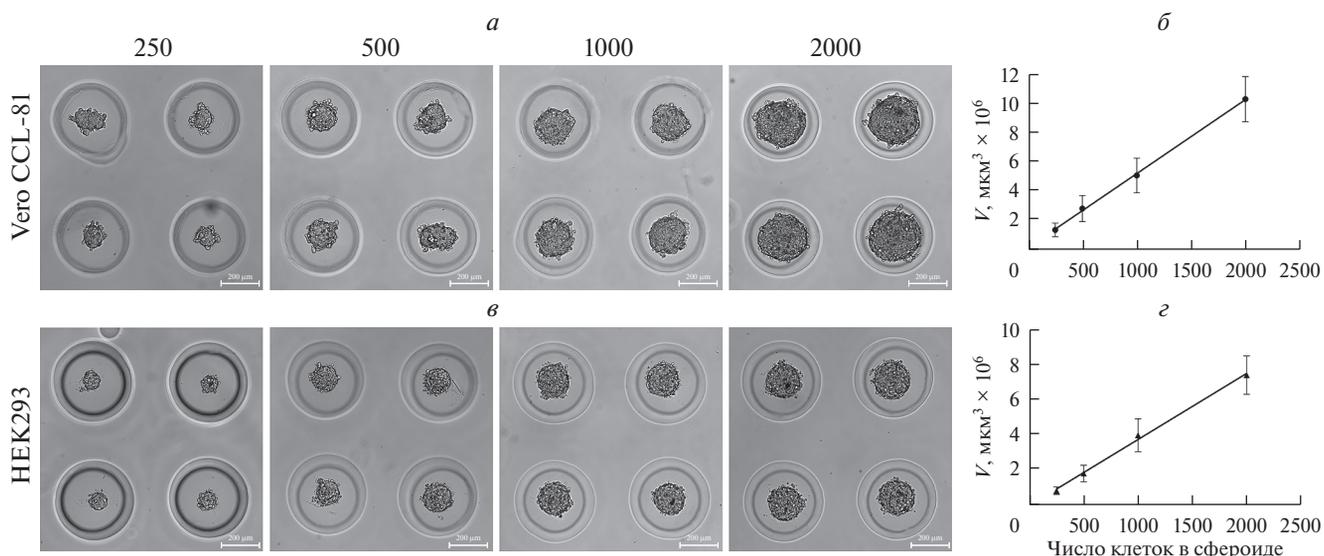
Тест-система CellTiter-Glo 3D включает в себя белок-люциферазу, его субстрат люциферин и лизирующий буфер. В присутствии клеточного АТФ люцифераза катализирует окисление люциферина в возбужденный оксилуциферин. Переход оксилуциферина из возбужденного состояния в основное сопровождается испусканием люминесценции, интенсивность которой прямо пропорциональна количеству молекул клеточного АТФ в растворе, то есть количеству

живых метаболически активных клеток. Люминесценцию оксилуциферина измеряли с помощью мультифункционального ридера Victor X3 (Perkin Elmer, США), далее абсолютные значения люминесценции нормализовали следующим образом: сигнал люминесценции клеток или сфероидов, необработанных цитостатиками, принимали за 100% жизнеспособности. Относительную жизнеспособность рассчитывали как процентное отношение сигналов люминесценции обработанных и необработанных цитостатиками клеток или сфероидов. Для каждого цитостатика рассчитывали IC<sub>50</sub> – концентрацию, при которой относительная жизнеспособность равна 50%.

Объем сфероидов пропорционален количеству живых клеток в сфероиде и может служить показателем жизнеспособности сфероидов. Расчет диаметров сфероидов проводили в программе ImageJ 1.48v software (NIH, Bethesda, MD). Объем сфероидов (V, мкм<sup>3</sup>) рассчитывали по формуле:  $V = 1/6\pi d^3$ , где  $d$  – диаметр сфероидов. При нормализации за 100% принимали объем сфероидов, необработанных цитостатиками. Относительный объем сфероидов рассчитывали как процентное отношение объемов обработанных и необработанных цитостатиками сфероидов. Для каждого цитостатика рассчитывали IC<sub>50</sub> – концентрацию, при которой относительный объем сфероидов равен 50%.

**Оценка жизнеспособности клеток с помощью резазурина.** С помощью агарозных форм, содержащих 256 углублений и помещенных в ячейки 12-луночных планшетов (по 1 форме в каждую ячейку), формировали сфероиды с первоначальной концентрацией 250 клеток на 1 сфероид. Для формирования монослоя с такой же концентрацией клеток в каждую ячейку 12-луночных планшетов рассеивали по 64000 клеток (256 × 250 клеток). Через 24 ч к клеткам в монослое и к сфероидам добавляли препараты в тестируемых концентрациях и культивировали в течение 72 ч.

Для оценки жизнеспособности клеток использовали натриевую соль резазурина (Sigma, США). Резазурин представляет собой нетоксичный краситель, который восстанавливается за счет аэробного дыхания метаболически активных клеток до флуоресцирующего резорфина, интенсивность флуоресценции которого прямо пропорциональна количеству живых клеток. Во все лунки добавляли 0.02%-ный раствор натриевой соли резазурина в питательной среде в соотношении 1:10 по объему и инкубировали на протяжении 6 ч (для клеток) или 18 ч (для сфероидов). Интенсивность флуоресценции резорфина измеряли с помощью мультифункционального ридера Victor X3 (Perkin Elmer, США), длина волны возбуждения составляла 555 нм, длина волны испускания составляла 580 нм, далее абсолютные значения флуоресценции



**Рис. 1.** Фазово-контрастные изображения сфероидов из клеток Vero CCL-81 (а) и HEK293 (в) и зависимость их объема  $V$  (б, г) от концентрации клеток через 1 сут после внесения клеточной суспензии в агарозные формы. Показаны средние значения и их стандартные отклонения ( $n = 512$ ).

нормализовали следующим образом: сигнал флуоресценции клеток или сфероидов, необработанных цитостатиками, принимали за 100% жизнеспособности. Относительную жизнеспособность рассчитывали как процентное отношение сигналов флуоресценции обработанных и необработанных цитостатиками клеток или сфероидов. Для каждого цитостатика рассчитывали значение  $IC_{50}$ .

#### Оценка цитотоксичности тестируемых препаратов.

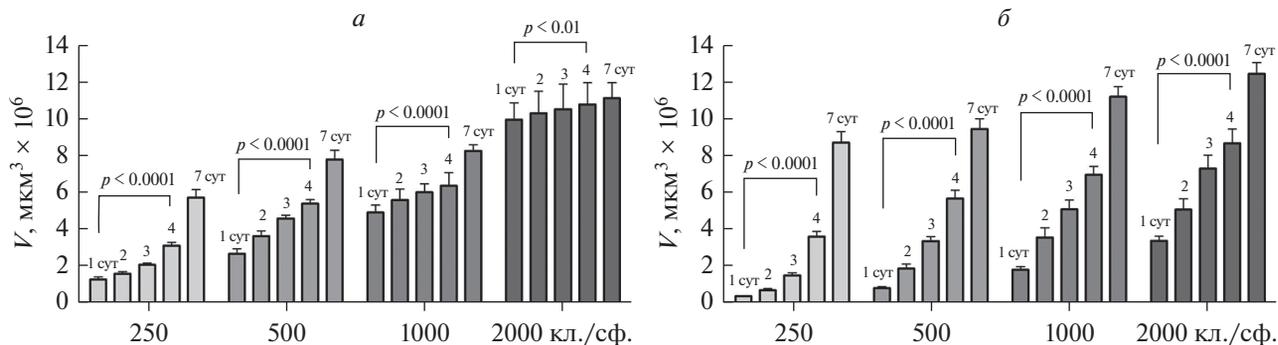
С помощью 96-луночных планшетов с низкоадгезивным покрытием формировали сфероиды с первоначальной концентрацией 250 клеток на сфероид. Для формирования монослоя с такой же концентрацией клеток в каждую ячейку 96-луночных культуральных планшетов с плоским дном рассеивали по 250 клеток. При формировании сфероидов и монослоя в клеточные суспензии добавляли реагент CellTox Green (Promega, США) в соотношении 1 : 500 по объему. CellTox Green содержит краситель, который проникает в мертвые клетки через поврежденную мембрану и связывается с ДНК, что вызывает разгорание флуоресценции, интенсивность которой пропорциональна количеству мертвых клеток. Через 24 ч к клеткам в монослое и к сфероидам, содержащим реагент CellTox Green, добавляли один из препаратов в тестируемой концентрации (см. выше) и культивировали в течение 72 ч. Через 72 ч фотографировали сфероиды с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti-S (Nikon, Япония). Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью мультифункционального ридера Victor X3 (Perkin Elmer, США), длина волны

возбуждения составляла 485 нм, длина волны испускания составляла 535 нм. Для цитостатиков рассчитывали  $CC_{50}$  — концентрацию, при которой выполнялось равенство:  $(F_t - F_{\min}) / (F_{\max} - F_{\min}) \times 100\% = 50\%$ , где  $F_t$  — сигнал флуоресценции для тестируемой концентрации,  $F_{\min}$  — минимальный сигнал флуоресценции, соответствующий сигналу для клеток или сфероидов, необработанных цитостатиками,  $F_{\max}$  — максимальный сигнал флуоресценции, соответствующий сигналу для клеток или сфероидов, обработанных лизирующим буфером, вызывающим 100%-ную гибель клеток или сфероидов.

**Анализ данных.** Обработку экспериментальных данных и статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). Все исследуемые концентрации препаратов тестировали в квадруплетах. Рассчитывали значения концентраций  $IC_{50}$  и  $CC_{50}$  методом нелинейной регрессии с использованием трехпараметрической модели доза—эффект. Все эксперименты проводили в четырех независимых повторах. В качестве описательных статистик в работе приведены среднее арифметическое и стандартное отклонение (SD). Для сравнения количественных признаков в группах применяли критерий Манна—Уитни. Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ( $p < 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Кинетика роста сфероидов.** С помощью агарозных форм были сформированы сфероиды из клеточных линий HEK293 и Vero CCL-81, используя различные



**Рис. 2.** Кинетика роста объема сфероидов ( $V$ ), сформированных из Vero CCL-81 (а) и HEK293 (б). По горизонтали показано число клеток в 1 сфероиде (клет./сф.), показаны средние значения и стандартные отклонения ( $n = 512$ ). Для сравнения величин  $V$  в группах (1-е и 4-е сут) применяли критерий Манна–Уитни.

первоначальные концентрации клеток: 250, 500, 1000 и 2000 клеток на 1 сфероид. Через 24 ч для обеих линий для всех концентраций клеток наблюдали образование сфероидов округлой формы с четкими краями и едиными размерами в пределах одной концентрации. В течение первых суток зависимость объема сфероидов (значения которого оценивали, измеряя его диаметр) от первоначальной концентрации клеток была линейной (рис. 1).

Конечной целью действия всех цитостатиков является ингибирование пролиферации клеток. В связи с этим, для использования сфероидов в качестве адекватной 3D-модели *in vitro* важно подобрать концентрацию клеток, при которой будет наблюдаться пролиферация клеток в сфероидах. С этой целью мы изучили кинетику роста сфероидов, сформированных из клеточных линий HEK293 и Vero CCL-81, в зависимости от первоначальных концентраций клеток. Полученные результаты представлены на рис. 2. Для обеих клеточных линий наблюдается обратная зависимость скорости роста объема сфероида от первоначальной концентрации клеток. Максимальная скорость роста наблюдается для наименьшей концентрации, составляющей 250 клеток на 1 сфероид. Проведено сравнение объемов сфероидов на 4-е и 1-е сут культивирования, поскольку цитостатики добавляли к 1-суточным сфероидам и культивировали в течение 72 ч. Показано, что различия между значениями объемов являются статистически достоверными для всех концентраций обеих клеточных линий. На основе полученных данных для дальнейших экспериментов была выбрана первоначальная концентрация 250 клеток на сфероид.

#### Влияние цитостатиков на пролиферацию клеток.

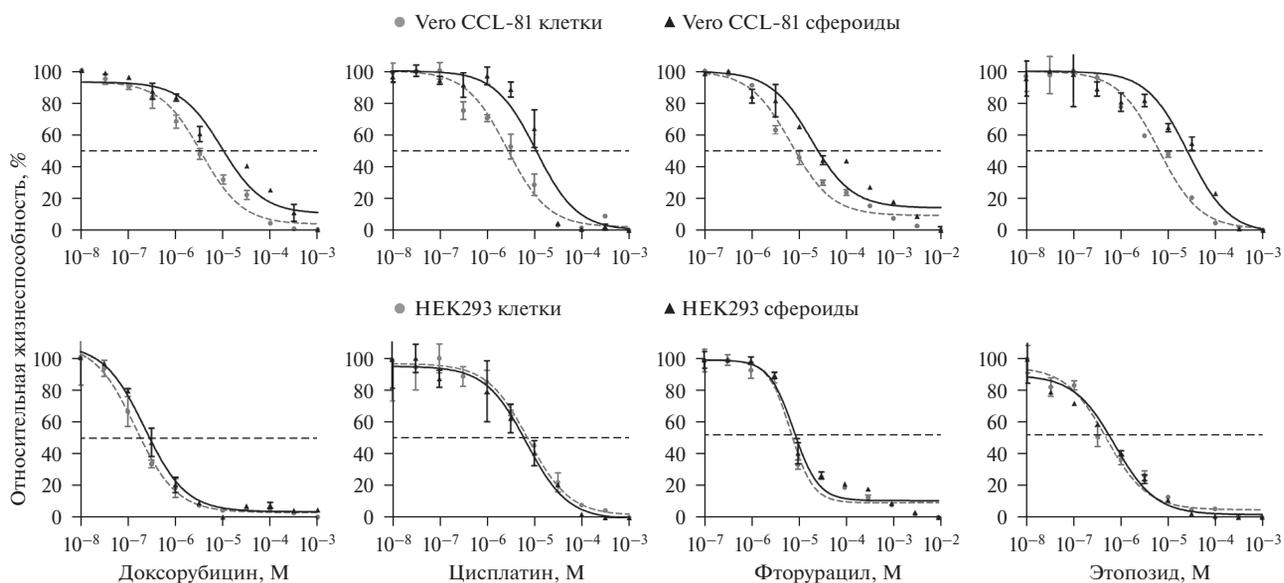
Существует большое количество реагентов, позволяющих оценить жизнеспособность клеток или сфероидов. Однако ни один из них не является идеаль-

ным. Поэтому для оценки влияния цитостатиков на пролиферацию клеток мы использовали три разных метода: с помощью тест-системы CellTiter-Glo 3D, с помощью натриевой соли резазурина, а также на основе измерения диаметров сфероидов.

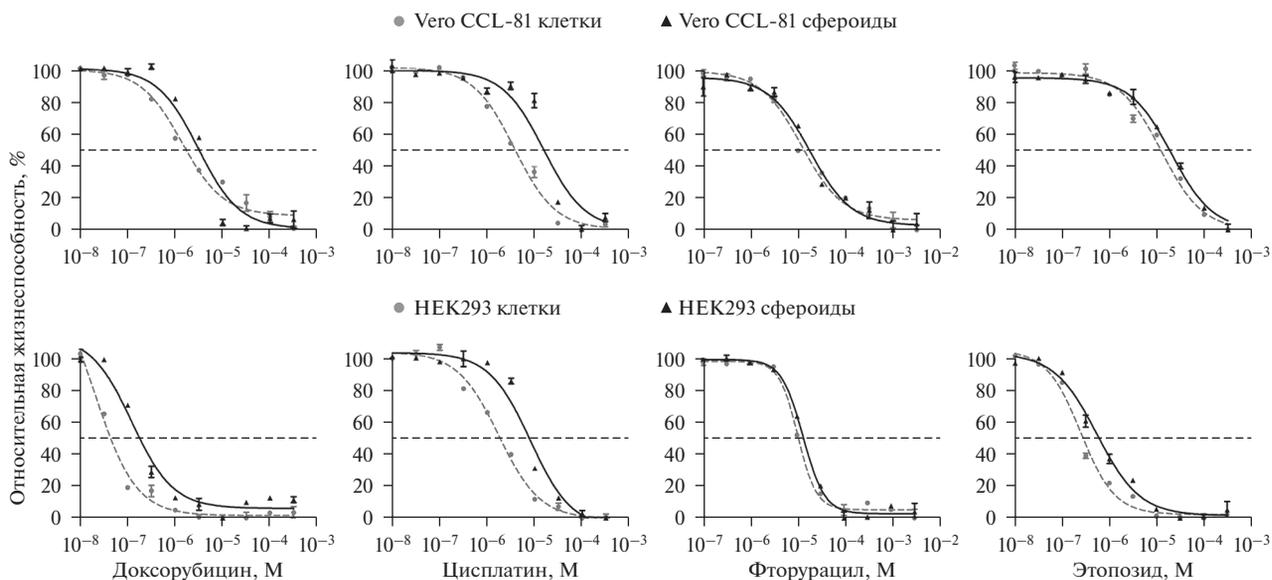
Тест-система CellTiter-Glo 3D основана на измерении количества молекул клеточного АТФ в АТФ-зависимой люциферазной реакции. Окисление люциферина люциферазой в присутствии клеточного АТФ приводит к образованию оксилуциферина. Реакция сопровождается люминесценцией, сигнал которой пропорционален количеству живых метаболически активных клеток. Кривые зависимости относительной жизнеспособности клеток от концентрации тестируемых препаратов представлены на рис. 3. Рассчитанные из кривых значения  $IC_{50}$  приведены в таб. 1.

Сравнение полученных значений  $IC_{50}$  показало, что в случае Vero CCL-81 антипролиферативная активность препаратов для монослоя клеток выше, чем для сфероидов. В случае HEK293 доксорубин и этопозид демонстрируют незначительное снижение активности при тестировании на сфероидах, в то время как для цисплатина и фторурацила не наблюдается заметной разницы в активности между 2D- и 3D-вариантами.

Резазурин — кислотно-основной индикатор синего цвета, который в присутствии метаболически активных клеток необратимо восстанавливается до розового флуоресцирующего резорурфина. Наблюдаемый флуоресцентный сигнал прямо пропорционален количеству живых клеток. Кривые зависимости относительной жизнеспособности клеток от концентрации тестируемых препаратов представлены на рис. 4. Рассчитанные из кривых значения  $IC_{50}$  приведены в таб. 1.



**Рис. 3.** Кривые зависимости относительной жизнеспособности Ver0 CCL-81 (верхний ряд) и HEK293 (нижний ряд) от концентрации цитостатиков, полученные с помощью тест-системы CellTiter-Glo 3D. Штриховая кривая (кружки) – клетки, сплошная (треугольники) – сфероиды. Показаны средние значения и их стандартные отклонения ( $n = 4$ ). Для всех случаев, кроме цисплатина и фторурацила для HEK293, различия между значениями  $IC_{50}$  для клеток и сфероидов достоверны ( $p < 0.05$ , критерий Манна–Уитни).



**Рис. 4.** Кривые зависимости относительной жизнеспособности Ver0 CCL-81 (верхний ряд) и HEK293 (нижний ряд) от концентрации цитостатиков, полученные с помощью резазурина. Штриховая кривая (кружки) – клетки, сплошная (треугольники) – сфероиды. Показаны средние значения и их стандартные отклонения,  $n = 4$ . Для всех случаев различия между значениями  $IC_{50}$  для клеток и сфероидов достоверны ( $p < 0.05$ , критерий Манна–Уитни).

При оценке антипролиферативной активности с помощью резазурина для обеих клеточных линий наблюдается снижение активности всех препаратов в условиях 3D-культивирования по сравнению с 2D.

При этом наиболее заметные различия значений  $IC_{50}$  получены для цисплатина.

Анализ сфероидов по многим параметрам является технически более сложной задачей, чем анализ

**Таблица 1.** Антипролиферативная активность препаратов ( $IC_{50}$ ) для клеток Vero CCL-81 и HEK293 в монослое и в составе сфероидов. Оценка с помощью трех тестов

Оценка с помощью тест-системы CellTiter-Glo 3D; $IC_{50}$ , мкМ ( $M \pm SD$ )				
Соединение	Vero CCL-81		HEK293	
	клетки	сфероиды	клетки	сфероиды
Доксорубин	$3.5 \pm 0.3$	$9.3 \pm 1.9$	$0.15 \pm 0.02$	$0.23 \pm 0.03$
Цисплатин	$2.7 \pm 0.3$	$11.0 \pm 0.8$	$7.5 \pm 1.8$	$6.9 \pm 2.2$
Фторурацил	$6.7 \pm 0.9$	$18.0 \pm 4.0$	$7.0 \pm 0.7$	$8.1 \pm 0.8$
Этопозид	$6.4 \pm 0.5$	$26.1 \pm 3.5$	$0.49 \pm 0.1$	$0.73 \pm 0.08$

Оценка с помощью резазурина; $IC_{50}$ , мкМ ( $M \pm SD$ )				
Соединение	Vero CCL-81		HEK293	
	клетки	сфероиды	клетки	сфероиды
Доксорубин	$1.4 \pm 0.3$	$3.1 \pm 0.2$	$0.02 \pm 0.01$	$0.12 \pm 0.02$
Цисплатин	$3.8 \pm 0.3$	$15.9 \pm 1.3$	$1.7 \pm 0.2$	$8.1 \pm 0.3$
Фторурацил	$11.9 \pm 1.5$	$17.9 \pm 1.9$	$10.4 \pm 0.4$	$13.5 \pm 0.5$
Этопозид	$12.5 \pm 1.0$	$20.4 \pm 1.3$	$0.24 \pm 0.03$	$0.55 \pm 0.05$

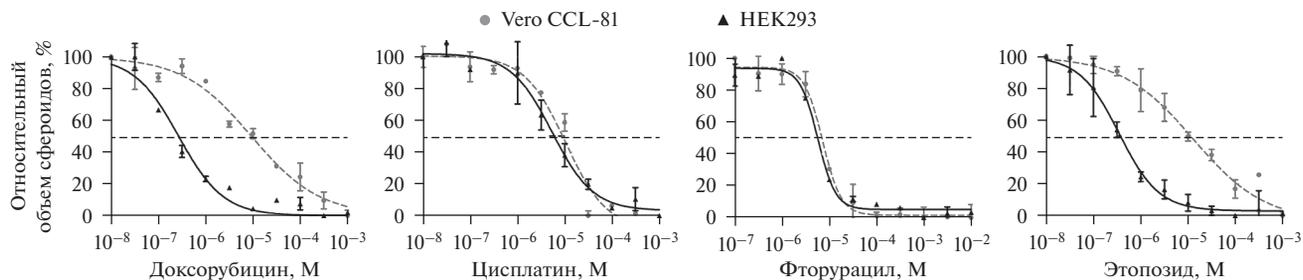
Оценка путем измерения диаметров сфероидов; $IC_{50}$ , мкМ ( $M \pm SD$ )				
Соединение	Vero CCL-81		HEK293	
	клетки	сфероиды	клетки	сфероиды
Доксорубин	—	$9.3 \pm 1.4$	—	$0.27 \pm 0.04$
Цисплатин	—	$10.4 \pm 1.5$	—	$5.5 \pm 1.3$
Фторурацил	—	$7.3 \pm 0.8$	—	$5.8 \pm 0.4$
Этопозид	—	$12.9 \pm 4.5$	—	$0.35 \pm 0.06$

монослоя клеток. Однако некоторые виды исследований для сфероидов могут быть проведены даже проще, чем для монослоя клеток, благодаря их форме. Так, оценить пролиферацию клеток в сфероидах можно и без использования каких-либо реагентов и красителей. Для этого достаточно измерить диаметры сфероидов при разных концентрациях тестируемых препаратов. На основе диаметров можно рассчитать объемы сфероидов, которые прямо пропорциональны количеству живых клеток в сфероиде. Кривые зависимости относительного объема сфероидов от концентрации тестируемых препаратов

представлены на рис. 5. Рассчитанные из кривых значения  $IC_{50}$  приведены в табл. 1.

Сравнение полученных значений  $IC_{50}$  показало, что фторурацил демонстрирует одинаковую антипролиферативную активность на обеих клеточных линиях, цисплатин чуть более активен в отношении клеток HEK293, а доксорубин и этопозид гораздо более активны в отношении HEK293, чем Vero CCL-81.

**Цитотоксичность цитостатиков.** Для оценки цитотоксичности цитостатиков использовали реагент CellTox Green, действие которого основано на изменении целостности мембраны клеток вследствие клеточной смерти. CellTox Green содержит краси-



**Рис. 5.** Кривые зависимости относительного объема сфероидов из Vero CCL-81 и HEK293 от концентрации цитостатика. Штриховая кривая (кружки) – Vero CCL-81, сплошная (треугольники) – HEK293. Показаны средние значения и их стандартные отклонения ( $n = 4$ ). Для всех случаев, кроме фторурацила, различия между значениями  $IC_{50}$  для сфероидов из Vero CCL-81 и HEK293 достоверны ( $p < 0.05$ , критерий Манна–Уитни).

тель, не способный проникнуть в живые клетки, но свободно проникающий в мертвые клетки через поврежденную мембрану. При связывании красителя с ДНК мертвой клетки наблюдается разгорание флуоресценции. Наблюдаемый флуоресцентный сигнал прямо пропорционален количеству мертвых клеток. Полученные результаты представлены в табл. 2 и на рис. 6.

Как видно из табл. 2, фторурацил не токсичен на обеих клеточных линиях как в 2D, так и в 3D. Цисплатин нетоксичен на HEK293 и клетках Vero CCL-81 и слаботоксичен на сфероиде из Vero CCL-81. Этопозид проявляет незначительную токсичность при высоких концентрациях. Доксорубин проявляет заметную токсичность, причем значение  $CC_{50}$  (~20 мкМ) приблизительно одинаково для обеих клеточных линий и обоих способов культивирования. На рис. 6 приведены изображения сфероидов, обработанных препаратами в концентрациях, близ-

ких к  $CC_{50}$ , мертвые клетки окрашены с помощью CellToxGreen.

### ОБСУЖДЕНИЕ

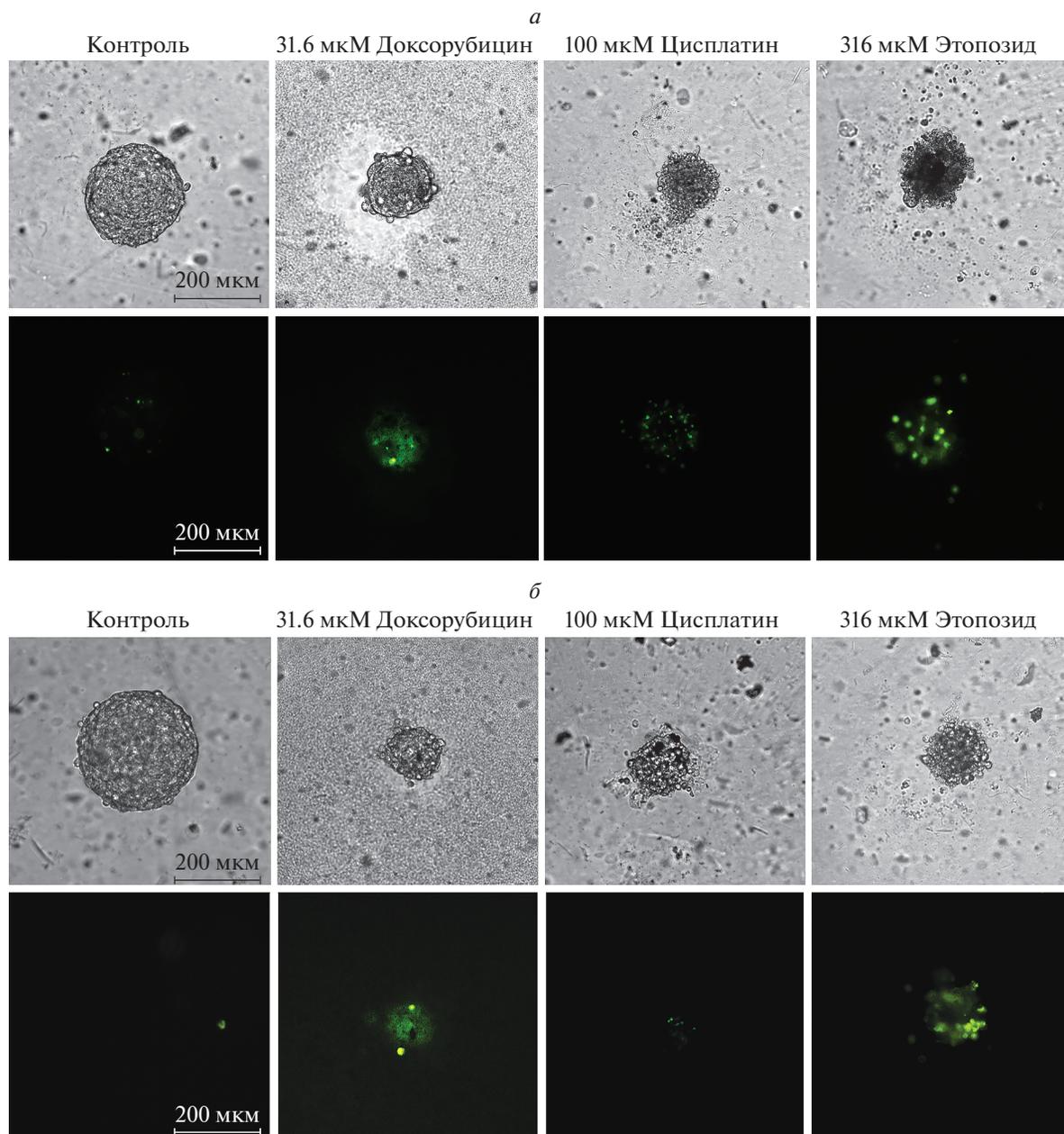
Сфероиды привлекают широкое внимание исследователей в качестве моделей *in vitro* для скрининга лекарственных препаратов. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в области биофабрикации, визуализации и анализа трехмерных структур, работа со сфероидом все еще вызывает определенные сложности по сравнению с работой на монослойной культуре клеток.

В настоящей статье описана процедура формирования и последующего анализа сфероидов с помощью двух различных методов. Показано, что наряду с использованием достаточно дорогих 96-луночных планшетов с низкоадгезивным покрытием и коммерческого реагента CellTiter-Glo, возможно удешевление процесса за счет формирования сфероидов с помощью агарозных форм и их анализа посредством натриевой соли резазурина. Полученные значения  $IC_{50}$  для цитостатиков близки по значениям, что свидетельствует о сравнимой предиктивности обоих методов.

Для скрининга большого количества химических соединений мы рекомендуем формировать сфероиды с помощью коммерческих 96-луночных или 384-луночных планшетов с низкоадгезивным покрытием, так как планшеты хорошо совместимы с роботическим оборудованием, обеспечивают образование сфероидов единого стандартного диаметра, позволяют оперировать маленькими объемами реагентов и красителей. Единственным минусом метода является высокая стоимость планшетов. Формирование сфероидов с помощью агарозных форм целесообразно проводить в тех случаях, когда последующий анализ предполагает использование низко чувствительных реагентов или требуется большое количество статистических данных. Одна агарозная форма поз-

**Таблица 2.** Цитотоксическая активность препаратов ( $CC_{50}$ ) для клеток Vero CCL-81 и HEK293 в монослое и в составе сфероидов

Соединение	$CC_{50}$ , мкМ ( $M \pm SD$ )			
	Vero CCL-81		HEK293	
	клетки	сфероиды	клетки	сфероиды
Доксорубин	18 ± 4	17 ± 3	24 ± 7	25 ± 6
Цисплатин	>100	60 ± 8	>100	>100
Фторурацил	>1000	>1000	>1000	>1000
Этопозид	620 ± 70	300 ± 60	>1000	97 ± 15



**Рис. 6.** Фазово-контрастные и флуоресцентные изображения клеточных сфероидов из Vero CCL-81 (*a*) и HEK293 (*б*), обработанных цитостатиками и окрашенных с помощью CellTox Green.

воляет сформировать 256 сфероидов, поэтому тестирование каждой концентрации препарата на одной агарозной форме в 256 раз увеличивает порог чувствительности анализа. Дополнительным преимуществом данного метода является его низкая стоимость. Однако метод не совместим с роботическими системами дозирования.

При формировании сфероидов особое внимание следует уделять первоначальному числу клеток в сфероиде, т.к. оно задает скорость пролиферации

клеток и, соответственно, финальный диаметр и объем сфероидов. В сфероиде большого диаметра (больше 250 мкм) развивается некроз, поскольку кислород и питательные вещества не достигают центра сфероиде. Соответственно при тестировании цитотоксической активности лекарственных препаратов невозможно отделить гибель клеток вследствие некроза. Кроме того, сами лекарственные вещества и красители также могут не доходить до центра сферо-

ида, что неизбежно повлияет на результаты эксперимента. Учитывая вышесказанное, очевидно, что использование сфероидов маленького диаметра более предпочтительно. В настоящей работе проведена оценка кинетики роста сфероидов в зависимости от первоначальной концентрации клеток и подобрана оптимальная концентрация, обеспечивающая формирование на 4-е сут сфероидов с диаметром, не превышающим 250 мкм ( $V \leq 8.2 \times 10^6$  мкм<sup>3</sup>).

Сравнение значений  $IC_{50}$  и  $CC_{50}$ , полученных для Vero CCL-81 и НЕК293, независимо от методов культивирования, демонстрирует различную активность цитостатиков на этих двух клеточных линиях (табл. 1, 2). Доксорубин и этопозид значительно более эффективно тормозят пролиферацию НЕК293, чем Vero CCL-81, при этом цитотоксический эффект на обеих клеточных линиях одинаков для всех препаратов. Учитывая, что обе клеточные линии представляют собой почечный эпителий, такой результат может объясняться тем, что антипролиферативная активность препаратов напрямую зависит от скорости пролиферации клеток, которая в случае НЕК293 в 4 раза выше, чем в случае Vero CCL-81. Полученные нами данные хорошо согласуются с результатами работы, в которой установлено, что один и тот же препарат может проявлять разную активность в зависимости от выбранной для теста клеточной линии (Brajša et al., 2016b), что еще раз подтверждает необходимость обращать внимание на тип клеток при тестировании препаратов.

Сравнительный анализ активности препаратов на монослое клеток и на сфероидах показал, что в большинстве случаев антипролиферативный эффект цитостатиков более выражен в 2D-условиях (табл. 1), при этом их цитотоксическая активность ярче проявляется в 3D (табл. 2). Наши данные по антипролиферативной активности цитостатиков в монослое клеток хорошо согласуются с результатами работ, в которых оценивали активность тех же препаратов в 2D-условиях на тех же клеточных линиях (Quispe-Mauricio et al., 2009; Hall et al., 2011; Li et al., 2011; Sangmalee et al., 2016; Gupta et al., 2019; Valsalam et al., 2019; Wu et al., 2020). Более высокая активность цитостатиков в условиях 2D по сравнению с 3D может быть связана с более высокой доступностью клеток в монослое для тестируемых веществ.

Таким образом, нами проведена оценка антипролиферативной и цитотоксической активности четырех цитостатиков на клетках Vero CCL-81 и НЕК293 в условиях 2D- и 3D-культивирования. Согласно нашим данным, цитостатики проявляли в 3D-условиях такую же или меньшую антипролиферативную активность по сравнению с 2D-условиями, но были более токсичны. Можно предположить, что исполь-

зование 3D-культур при разработке новых лекарственных средств позволит выявить потенциальную токсичность препарата на ранних стадиях доклинических исследований. Полученные нами данные показывают, что сфероиды могут быть использованы для оценки эффективности лекарственных препаратов *in vitro*, как более точно отражающие архитектуру ткани и обеспечивающие более физиологичное окружение для клеток. Нами предложены два возможных алгоритма формирования и анализа сфероидов, один из которых является дорогим, чувствительным, быстрым и совместимым с роботическим оборудованием на всех стадиях процесса, другой – более дешевый, позволяющий получить большое количество статистических данных, но менее чувствительный, не роботизируемый и более медленный на стадии анализа. Для получения адекватных данных об активности химических соединений всегда следует учитывать восприимчивость клеточной культуры, скорость пролиферации клеток, а в случае сфероидов дополнительно подбирать оптимальный диаметр для каждой используемой клеточной линии, чтобы гарантировать отсутствие некроза и полное проникновение тестируемых веществ. Развитие методов формирования и анализа сфероидов в совокупности с развитием персонализированного подхода может вывести доклинические исследования, а также подбор эффективных доз препарата при клиническом применении на качественно новый уровень. При выборе таргетной терапии для конкретного пациента наилучшую предиктивную способность будут иметь сфероиды, сформированные из аутологичных клеток.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена за счет средств частного учреждения Лаборатория биотехнологических исследований “3D Биопринтинг Солюшенс”.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа была выполнена без использования животных или участия людей в качестве объектов исследования.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Baker B.M., Chen C.S. 2012. Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J. Cell Sci.* V. 125. P. 3015.
- Bissell M.J. 2017. Goodbye flat biology – time for the 3rd and the 4th dimensions. *J. Cell Sci.* V. 130. P. 3.

- Brajša K., Trzun M., Zlatar I., Jelić D. 2016a. Three-dimensional cell cultures as a new tool in drug discovery. *Period. boil.* V. 118. P. 59.
- Brajša K., Vujanović I., Jelić D., Trzun M., Zlatar I., Karminski-Zamola G., Hranjec M. 2016b. Antitumor activity of amidino-substituted benzimidazole and benzimidazo[1,2-a]quinoline derivatives tested in 2D and 3D cell culture systems. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* V. 31. P. 1139–45.
- Eke I., Hehlhans S., Sandfort V., Cordes N. 2016. 3D matrix-based cell cultures: Automated analysis of tumor cell survival and proliferation. *Int J Oncol.* V. 48. P. 313–321.
- Fang Y., Eglan R.M. 2017. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discovery.* V. 22. P. 456.
- Fatehullah A., Tan S.H., Barker N. 2016. Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nat. Cell Biol.* V. 18. P. 246.
- Gupta G., You Y., Hadiputra R., Jung J., Kang D.K., Lee C.Y. 2019. Heterometallic BODIPY-based molecular squares obtained by self-assembly: Synthesis and biological activities. *ACS Omega.* V. 4. P. 13200.
- Hall M.D., Brimacombe K.R., Varonka M.S., Pluchino K.M., Monda J.K., Li J., Walsh M.J., Boxer M.B., Warren T.H., Fales H.M., Gottesman M.M. 2011. Synthesis and structure-activity evaluation of isatin- $\beta$ -thiosemicarbazones with improved selective activity toward multidrug-resistant cells expressing P-glycoprotein. *J. Med Chem.* V. 54. P. 5878.
- Jasmund I., Schwientek S., Acikgöz A., Langsch A., Machens H.G., Bader A. 2007. The influence of medium composition and matrix on long-term cultivation of primary porcine and human hepatocytes. *Biomol. Eng.* V. 24. P. 59.
- Kinney M.A., Hookway T.A., Wang Y., McDevitt T.C. 2014. Engineering three-dimensional stem cell morphogenesis for the development of tissue models and scalable regenerative therapeutics. *Ann. Biomed. Eng.* V. 42. P. 352.
- Koudan E.V., Gryadunova A.A., Karalkin P.A., Korneva J.V., Meteleva N.Y., Babichenko I.I., Volkov A.V., Rodionov S.A., Parfenov V.A., Pereira F.D.A.S., Khesuani Y.D., Mironov V.A., Bulanova E.A. 2020. Multiparametric analysis of tissue spheroids fabricated from different types of cells. *Biotechnol. J.* V. 15. P. e1900217.
- Lancaster M. A., Knoblich J. A. 2014. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science.* V. 345. P. 1247125.
- Langhans S.A. 2018. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Front. Pharmacol.* V. 9. P. 6.
- Li Y., Revalde J.L., Reid G., Paxton J.W. 2011. Modulatory effects of curcumin on multi-drug resistance-associated protein 5 in pancreatic cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* V. 68. P. 603.
- Monjaret F., Fernandes M., Duchemin-Pelletier E., Argento A., Degot S., Young J. 2016. Fully automated one-step production of functional 3d tumor spheroids for high-content screening. *J. Lab. Autom.* V. 21. P. 268.
- Pampaloni F., Reynaud E.G., Stelzer E.H. 2007. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 8. P. 839.
- Quispe-Mauricio A., Callacondo D., Rojas J., Zavala D., Posso M., Vaisberg A. 2009. Actividad citotóxica de physalis peruviana (aguaymanto) en cultivos celulares de adenocarcinoma colorectal, próstata y leucemia mieloide crónica (Cytotoxic effect of physalis peruviana in cell culture of colorectal and prostate cancer and chronic myeloid leukemia). *Rev. Gastroenterol. Peru.* V. 29 P. 239.
- Sangmalee S., Laorpaksa A., Sritularak B., Sukrong S. 2016. Bioassay-guided isolation of two flavonoids from *derris scandens* with topoisomerase ii poison activity. *Biol. Pharm. Bull.* V. 39. P. 631.
- Thomas R.J., Bhandari R., Barrett D.A., Bennett A.J., Fry J.R., Powe D., Thomson B.J., Shakesheff K.M. 2005. The effect of three-dimensional co-culture of hepatocytes and hepatic stellate cells on key hepatocyte functions in vitro. *Cells Tissues Organs.* V. 181. P. 67.
- Valsalam S., Agastian P., Arasu M.V., Al-Dhabi N.A., Ghilan A.M., Kaviyarasu K., Ravindran B., Chang S.W., Arokiyaraj S. 2019. Rapid biosynthesis and characterization of silver nanoparticles from the leaf extract of *Tropaeolum majus* L. and its enhanced in vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and anticancer properties. *J. Photochem. Photobiol. B.* V. 191. P. 65.
- Wu C.P., Lusvarghi S., Tseng P.J., Hsiao S.H., Huang Y.H., Hung T.H., Ambudkar S.V. 2020. MY-5445, a phosphodiesterase type 5 inhibitor, resensitizes ABCG2-overexpressing multidrug-resistant cancer cells to cytotoxic anticancer drugs. *Am. J. Cancer Res.* V. 10. P. 164.

## The Determination of Cytostatic Activity on a 3D Spheroids-Based Model in Comparison with Conventional Monolayer Culture

E. V. Koudan<sup>a,\*</sup>, S. P. Kudan<sup>b</sup>, S. Sh. Karshieva<sup>a,c</sup>, Yu. D. Khesuani<sup>a</sup>, V. A. Mironov<sup>a,d</sup>, and E. A. Bulanova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory for Biotechnological Research 3D Bioprinting Solutions, Moscow, 115409 Russia

<sup>b</sup>Pablo Neruda School № 1568, Moscow, 127221 Russia

<sup>c</sup>Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, 115478 Russia

<sup>d</sup>Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: koudan1980@gmail.com

It is becoming approved that screening of compounds on a platform applying two-dimensionally (2D)-cultured cell lines is incapable to precisely predict clinical activity of drugs; therefore three-dimensional (3D)-culture systems are emerging and show potential for better simulating the physiological cell microenvironment. In this regard, a 3D models that reflect all types of intercellular interactions, as well as the interaction of cells with the extracellular ma-

trix, are becoming increasingly accepted. Spheroids represent one of these models. The purpose of our study was to reveal the antiproliferative and cytotoxic activity of cisplatin, doxorubicin, fluorouracil, and etoposide on Vero CCL-81 and HEK293 cell lines under 2D (monolayer) and 3D (spheroids) culture conditions. The comparison of antiproliferative activity ( $IC_{50}$ ) and cytotoxic activity ( $CC_{50}$ ) obtained in different culture conditions revealed that the antiproliferative activity of compounds was higher in 2D while cytotoxic effect was more prominent in 3D. We suggest that cells in 3D are cultured in more physiological conditions, consequently they are more resistant to antiproliferative activity of compounds. More prominent cytotoxic effect in 3D allowed us to theorize that implementation of 3D spheroids-based model will allow to recognize early toxicity at the initial steps of preclinical studies in vitro. Our data approved that in the course of determination of compounds specific activity, cell type, the cell proliferation rate and in the optimal diameter of spheroids for each cell type should be taken into account.

**Keywords:** spheroids, monolayer, drugs, antiproliferative activity, cytotoxicity

## МОРФОЛОГИЯ ПОВЕРХНОСТИ ХОНДРОСФЕР ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ ЦИТОХАЛАЗИНОМ Д

© 2021 г. А. А. Грядунова<sup>1,2,\*</sup>, Е. А. Буланова<sup>1</sup>, Е. В. Кудан<sup>1</sup>, В. А. Касьянов<sup>3</sup>,  
Ю. Д. Хесуани<sup>1</sup>, В. А. Миронов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория биотехнологических исследований “3Д Биопринтинг Солюшенс”, Москва, 115409 Россия

<sup>2</sup>Институт регенеративной медицины Первого Московского медицинского университета  
им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, 119991 Россия

<sup>3</sup>Лаборатория биомеханики Рижского университета им. П. Страдиньша, Рига LV-1007, Латвия

\*E-mail: zharnitskaya\_anna@mail.ru

Поступила в редакцию 19.02.2021 г.

После доработки 26.02.2021 г.

Принята к публикации 06.03.2021 г.

Целью данной работы является изучение морфологии поверхности хондросфер после обработки цитохалазином Д. Хондросферы с концентрацией клеток 8000 на 1 сфероид получали из первичных хондроцитов барана. Подсчитывали диаметры хондросфер, количества микроворсинок и округленных клеток (%) на поверхности. Для оценки диаметра хондросфер использовали фотографии, полученные с помощью инвертированного светового микроскопа, оснащенного цифровой фотокамерой. Для оценки количества округленных клеток и микроворсинок использовали фотографии, полученные в ходе сканирующей электронной микроскопии. Морфометрический анализ показал, что после действия цитохалазина Д диаметр хондросфер увеличивается, хондроциты округляются, подавляющее большинство хондроцитов сохраняет на своей поверхности плотно расположенные микроворсинки. При этом в незначительной части клеток наблюдается ранее не описанный феномен прогрессирующей депопуляции микроворсинок. Таким образом, цитохалазин Д оказывает существенное влияние на размеры и морфологию поверхности хондросфер.

**Ключевые слова:** цитохалазин Д, хондросферы, микроворсинки, сканирующая электронная микроскопия

**DOI:** 10.31857/S0041377121030044

Тканевые сфероиды представляют собой плотно упакованные шарообразные агрегаты живых клеток, используемые в качестве “строительных блоков” в тканевой инженерии (Mironov et al., 2009). Некоторые виды тканевых сфероидов находят применение в клинической практике. Так, сфероиды, состоящие из первичных хондроцитов, или хондросферы, уже более десяти лет успешно применяются в качестве одной из форм клеточной терапии для лечения повреждений хряща (Schubert et al., 2009). Таким образом, изучение хондросфер является перспективным направлением в современной регенеративной медицине.

Для ускоренного созревания хрящевой ткани рекомендуется применять химическую стимуляцию (Huang et al., 2018). В качестве одного из важных компонентов химического хондрогенного коктейля для такой стимуляции впервые было предложено использовать цитохалазин Д (Huang et al., 2018). Цитохалазин Д является метаболитом некоторых видов плесневых грибов и широко используется в клеточ-

ной биологии как классический ингибитор полимеризации актина (Brown, Spudich, 1979). Показано, что цитохалазин Д вызывает деполимеризацию актиновых микрофиламентов в хондроцитах при культивировании в монослое, приводящую к округлению клеток и усилению синтеза компонентов внеклеточного матрикса хряща, в основном гликозаминогликанов (Newman, Watt, 1988). Включение цитохалазина Д в состав химического хондрогенного коктейля, по-видимому, обусловлено именно этим фактом. Следовательно, в настоящее время цитохалазин Д можно рассматривать в качестве хондрогенного агента. Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению свойств цитохалазина Д, мы не нашли в литературе данных о его влиянии на хондроциты в условиях 3D-культивирования — в составе хондросфер.

Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния цитохалазина Д на морфологию поверхности хондросфер с помощью метода сканирующей электронной микроскопии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

**Культура клеток.** Первичные хондроциты барана были любезно предоставлены Н.П. Омеляненко (Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, Москва, Россия). Клетки выращивали в культуральной среде DMEM (Gibco, США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США), 1% антибиотика/антимикотика (Gibco, США) и 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия). Клетки инкубировали при температуре 37°C во влажной атмосфере при 5% CO<sub>2</sub> до достижения 85–95% конfluence. Отсутствие микоплазменного заражения подтверждали по протоколу окрашивания Hoechst 33258 (Sigma, США).

**Получение хондросфер.** Для фабрикации хондросфер использовали хондроциты 3 пассажа. Хондросферы получали с использованием планшетов с низкодгезивным покрытием Corning Spheroid Microplates (Corning, США) по протоколу производителя. После достижения 85–95% конfluence клетки промывали раствором Версена (ПанЭко, Россия), добавляли 0.25%-ный раствор трипсина с 0.53 мМ ЭДТА (Gibco, США) и суспендировали в культуральной среде DMEM. Для получения хондросфер использовали клеточную суспензию с концентрацией клеток 80000 кл./мл. В каждую ячейку 96-луночного планшета Corning Spheroid Microplate помещали 100 мкл готовой суспензии. Таким образом, концентрация клеток в одном сфероиде составила 8000.

**Обработка цитохалазином Д.** Через 3 сут хондросферы, находившиеся в ячейках 96-луночного планшета Corning Spheroid Microplate, обрабатывали раствором цитохалазина Д (Sigma, США) в концентрации 10 мкМ в культуральной среде DMEM и оставляли на 24 ч. По истечении 24 ч хондросферы фиксировали в 2.5%-ном растворе глutarальдегида (Sigma, США) для дальнейшего сканирующего электронно-микроскопического исследования.

**Сканирующая электронная микроскопия.** Образцы клеток фиксировали в 1%-ном растворе OsO<sub>4</sub> в фосфатном буфере в течение 1–2 ч и дегидратировали в серии спиртов возрастающей концентрации. Дегидратированные образцы высушивали методом перехода критической точки на установке HCP-2 (Hitachi Koki Co. Ltd., Япония) и подвергали напылению золотом с помощью установки ионного напыления IB-3 (EIKO, Япония). Затем образцы исследовали на сканирующем электронном микроскопе JSM-6510 LV (JEOL, Япония).

**Морфометрический анализ.** Для оценки диаметров хондросфер использовали фотографии, полученные на инвертированном световом микроскопе Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Япония), оснащенный цифровой фотокамерой. Для оценки количества округленных клеток и микроворсинок использовали фотографии, полученные в ходе сканирующей электронной микроскопии. Подсчет диаметров хондро-

сфер, а также количества округленных хондроцитов и микроворсинок на их поверхности проводили с использованием программного обеспечения ImageJ 1.51 (NIH, Bethesda, США). При подсчете диаметров использовали 96 фотографий хондросфер в каждой группе. При подсчете микроворсинок анализировали 10 фотографий поверхности хондросфер, в каждой из которых подсчитывали количество микроворсинок в 3-х произвольных областях площадью 10 × 10 мкм<sup>2</sup>.

**Статистический анализ.** Статистическую обработку проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA в программном обеспечении GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, США). Эксперимент повторяли 3 раза. Результаты измерений представлены средними значениями и их ошибкой, различия между группами считали достоверными при  $p < 0.05$ .

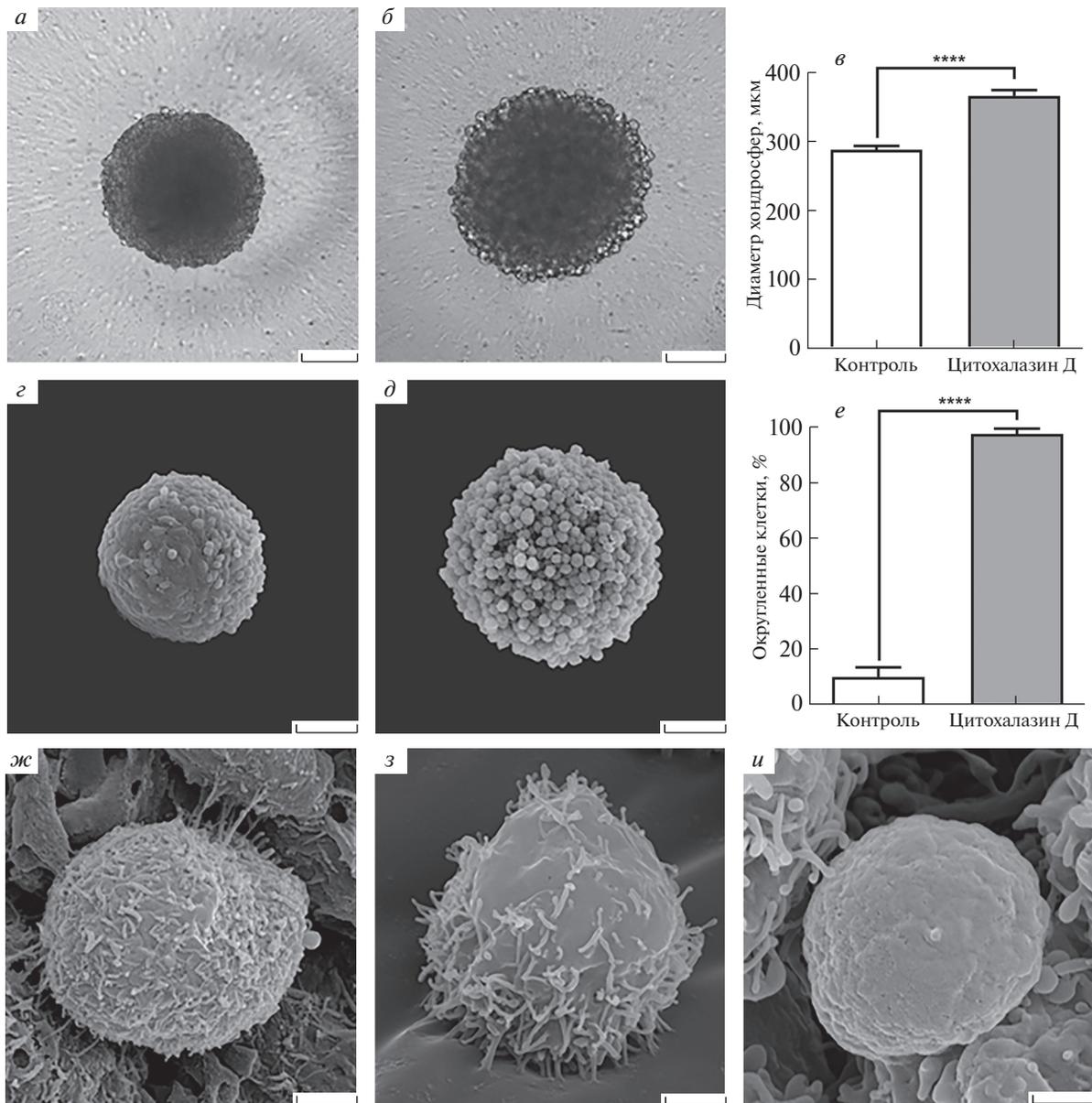
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфометрический анализ с использованием световой микроскопии показал существенное увеличение диаметров хондросфер, обработанных цитохалазином Д (365.31 ± 2.40 мкм), по сравнению с контрольной группой (287.28 ± 1.55 мкм). Следовательно, диаметр увеличился более чем на 20% (рис. 1а–в). При действии цитохалазина Д также наблюдали округление практически всех хондроцитов на поверхности хондросфер (97.44 ± 1.95%), тогда как в контрольной группе количество округленных клеток составляло 10.10 ± 3.39% (рис. 1г–е).

По данным сканирующей электронной микроскопии подавляющее большинство хондроцитов сохранило на своей поверхности плотно расположенные микроворсинки после обработки цитохалазином Д. Тем не менее, в незначительной части клеток наблюдали ранее не описанный феномен прогрессирующей депопуляции микроворсинок (рис. 1з). Редко можно было заметить хондроциты, практически полностью лишенные микроворсинок (рис. 1и). Таким образом, диаметр хондросфер, плотность упаковки клеток в их составе, а также форма самих клеток претерпевают существенные изменения после обработки цитохалазином Д.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало существенное влияние цитохалазина Д на морфологию хондросфер, которое проявилось прежде всего в увеличении их диаметра. Такое увеличение, по нашим данным, не связано с пролиферацией хондроцитов в составе сфероидов, но может быть сопряжено с синтезом внеклеточного матрикса, хотя обычно для его накопления требуется более продолжительное время культивирования (Newman, Watt, 1988; Omelyanenko et al., 2020). Декомпактизация хондросфер, наиболее вероятно, связана с округлением хондроци-



**Рис. 1.** Влияние цитохалазина Д на размеры и морфологию поверхности хондросфер: фазово-контрастные микрофотографии контрольного сфероиды (*а*) и сфероиды после обработки 10 мкМ цитохалазина Д (*б*); изменение диаметра хондросфер в процессе эксперимента (*в*); микрофотографии поверхности контрольного сфероиды (*г*) и сфероиды после обработки цитохалазином Д (*д*); изменение количества округленных клеток в процессе эксперимента (*е*); варианты поверхности клеток в составе контрольного сфероиды (*ж*) и сфероиды после обработки цитохалазином Д (*з, и*). Размерные шкалы: 100 мкм (*а, б, г, д*), 2 мкм (*ж–и*). Различия между группами достоверны при  $p \leq 0.0001$  (звездочки).

тов в их составе, что является следствием деполимеризации актиновых микрофиламентов под воздействием цитохалазина Д. Примечательным является феномен депопуляции микроворсинок, наблюдаемый в некоторых хондроцитах на поверхности хондросфер. В качестве продолжения анализа этого феномена необходимо проведение дополнительных исследований, затрагивающих влияние цитохалазина Д на кинетику слияния хондросфер между собой и на кинетику распластывания хондросфер на различ-

ных субстратах, включая поверхность поврежденного хряща. Еще одним важным аспектом является изучение синтеза и накопления внеклеточного матрикса хряща в присутствии цитохалазина Д. Наконец, имеет значение включение в состав хондросфер микро- или наночастиц, содержащих цитохалазин Д как отдельно, так и в комбинации с другими хондрогенными факторами (Dang et al., 2016).

Известно, что обработка хондроцитов цитохалазином Д способствует восстановлению их хондро-

генного фенотипа (Newman, Watt, 1988). Перестройка актиновых микрофиламентов по данным из литературы приводит к увеличению экспрессии коллагена II типа и к повышению содержания протеогликанов в матриксе хондроцитов (Nofal, Knudson, 2002). В свою очередь, накопление компонентов внеклеточного матрикса вызывает увеличение модуля упругости хондросфер, характеризующего их биомеханические свойства (Omelyanenko et al., 2020). Усиление упругости хондросфер позволит им выдерживать высокое давление при встраивании в место дефекта и распределять возникающие сжимающие напряжения по подлежащей субхондральной кости.

Таким образом, использование цитохалазина D при культивировании хондросфер может помочь повысить их эффективность при замещении дефектов хрящевой ткани.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-315-90017).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Brown S.S., Spudich J.A.* 1979. Cytochalasin inhibits the rate of elongation of actin filament fragments. *J. Cell Biol.* V. 83. P. 657.
- Dang P.N., Dwivedi N., Phillips L.M., Yu X., Herberg S., Bowman C., Solorio L.D., Murphy W.L., Alsbeg E.* 2016. Controlled Dual Growth Factor Delivery From Microparticles Incorporated Within Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Aggregates for Enhanced Bone Tissue Engineering via Endochondral Ossification. *Stem Cells Transl. Med.* V. 5. P. 206.
- Huang B.J., Brown W.E., Keown T., Hu J.C., Athanasiou K.A.* 2018. Overcoming Challenges in Engineering Large, Scaffold-Free Neocartilage with Functional Properties. *Tissue Eng. Part A.* V. 24. P. 1652.
- Mironov V., Visconti R.P., Kasyanov V., Forgacs G., Drake C.J., Markwald R.R.* 2009. Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials.* V. 30. P. 2164.
- Newman P., Watt F.M.* 1988. Influence of cytochalasin D-induced changes in cell shape on proteoglycan synthesis by cultured articular chondrocytes. *Exp. Cell Res.* V. 178. P. 199.
- Nofal G.A., Knudson C.B.* 2002. Latrunculin and cytochalasin decrease chondrocyte matrix retention. *J. Histochem. Cytochem.* V. 50. P. 1313.
- Omelyanenko N.P., Karalkin P.A., Bulanova E.A., Koudan E.V., Parfenov V.A., Rodionov S.A., Knyazeva A.D., Kasyanov V.A., Babichenko I.I., Chkadua T.Z., Khesuani Y.D., Gryadunova A.A., Mironov V.A.* 2020. Extracellular Matrix Determines Biomechanical Properties of Chondrospheres during Their Maturation In Vitro. *Cartilage.* V. 11. P. 521.
- Schubert T., Anders S., Neumann E., Schölmerich J., Hofstädter F., Grifka J., Müller-Ladner U., Libera J., Schedel J.* 2009. Long-term effects of chondrospheres on cartilage lesions in an autologous chondrocyte implantation model as investigated in the SCID mouse model. *Int. J. Mol. Med.* V. 23. P. 455.

## Chondrospheres Surface Morphology after Cytochalasin D Treatment

A. A. Gryadunova<sup>a, b, \*</sup>, E. A. Bulanova<sup>a</sup>, E. V. Koudan<sup>a</sup>, V. A. Kasyanov<sup>c</sup>, Yu. D. Khesuani<sup>a</sup>, and V. A. Mironov<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>Private Laboratory for Biotechnological Research “3D Bioprinting Solutions”, Moscow, 115409 Russia

<sup>b</sup>Institute for Regenerative Medicine of the I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 119991 Russia

<sup>c</sup>Riga Stradins University, Riga, LV-1007 Latvia

\*e-mail: zharnitskaya\_anna@mail.ru

The aim of the study is to investigate chondrospheres surface morphology after cytochalasin D treatment. Primary sheep chondrocytes from passage 3 were used for chondrospheres fabrication. The initial concentration was 8000 cells per spheroid. Chondrospheres diameters, number of microvilli and rounded cells on chondrospheres surface were calculated. Chondrospheres diameters examination was performed using inverted light microscope equipped with digital camera. Microphotographs from scanning electron microscopy were used to estimate the number of microvilli and rounded cells. Morphometric analysis showed that chondrospheres diameter increases and chondrocytes become rounded while the densely packed microvilli remain intact in the majority of chondrocytes after cytochalasin D treatment. However, a previously undescribed phenomenon of progressive microvilli depopulation is observed in a small part of cells. Thus, cytochalasin D significantly affects chondrospheres size and surface morphology.

**Keywords:** cytochalasin D, chondrospheres, microvilli, scanning electron microscopy

УДК 57.085.23

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОЛЛАГЕНА ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ ХРЯЩА МЕТОДОМ ТРЕХМЕРНОЙ БИОПЕЧАТИ

© 2021 г. Е. В. Исаева<sup>1</sup>\*, Е. Е. Бекетов<sup>1</sup>, В. В. Южаков<sup>1</sup>, Н. В. Аргучинская<sup>1</sup>, А. А. Кисель<sup>1</sup>,  
Е. П. Малахов<sup>1</sup>, Т. С. Лагода<sup>1</sup>, Н. Д. Яковлева<sup>1</sup>, П. В. Шегай<sup>2</sup>, С. А. Иванов<sup>1</sup>, А. Д. Каприн<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Министерства здравоохранения РФ, Обнинск, 249036 Россия

<sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Министерства здравоохранения РФ, Обнинск, 249036 Россия

\*E-mail: e.lesa@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.10.2020 г.

После доработки 24.11.2020 г.

Принята к публикации 30.11.2020 г.

3D-биопечать – перспективная технология создания тканеинженерных конструкций для замещения поврежденных тканей и органов. Коллаген обладает такими преимуществами, как биodeградируемость, биосовместимость и низкая иммуногенность, поэтому он широко используется в 3D-биопечати в тканевой инженерии. Однако при использовании коллагена в традиционной низкой концентрации процесс биопечати затруднен и не обеспечивает высокую точность. Цель настоящего исследования – оценка пригодности коллагена высокой концентрации для создания скаффолдов с инкорпорированными хондроцитами методом 3D-биопечати для формирования хрящевой ткани *in vitro* и *in vivo*. Результаты исследования показали, что собственной пористости 4%-ного коллагенового геля было недостаточно для сохранения жизнеспособности клеток в течение длительного времени в условиях *in vitro*. Сразу после начала культивирования скаффолдов наблюдали массовую миграцию клеток к свободным поверхностям и за их пределы. Клетки, оставшиеся в коллагене, большей частью погибли в течение 4 нед. В эксперименте на животных через 2 нед. после имплантации скаффолдов наблюдали картину слабовыраженного гранулематозного воспаления. Через 6 нед. в зоне имплантата под эпидермисом сформировалась соединительная ткань, в которой рядом с кровеносными сосудами обнаруживали макрофаги и группы мелких клеток с округлыми ядрами, по морфологическим критериям соответствующие молодым хондроцитам, однако количества этих клеток было недостаточно для начала формирования хрящевой ткани.

**Ключевые слова:** тканевая инженерия, 3D-биопечать, скаффолд, биочернила, коллаген, хондроциты, ги-стология, иммуногистохимия

DOI: 10.31857/S0041377121030056

Все большее распространение в регенеративной медицине и тканевой инженерии приобретает 3D-биопечать. Она позволяет получать тканеинженерные конструкции (скаффолды) строго заданной формы, распределять клетки и поддерживающие биоматериалы определенными способами, чтобы имитировать микроархитектуру различных тканей человека. Ожидается, что технология трехмерной биопечати в будущем радикально изменит регенеративную медицину (Nguyen et al., 2017). В основе 3D-биопечати лежит использование “биочернил” – биосовместимых материалов, дополняемых живыми клетками (стволовыми или дифференцированными). В последнее время как сами биочернила, так и технологии изготовления тканеинженерных конструкций на их основе являются предметом интенсивных исследований. На основании уже имеющихся данных сформулированы основные требования,

предъявляемые к биочернилам (Murphy, Atala, 2014; Kesti et al., 2015; Бекетов и др., 2019; Zhang et al., 2019):

1) они должны быть совместимыми с определенными типами клеток и организмов, не вызывать гибель клеток или иммунный ответ и оказывать положительное влияние на прикрепление, пролиферацию, миграцию и функцию как эндогенных, так и экзогенных клеток;

2) биочернила должны быть пригодны для печати, обеспечивать стабильный выход материала, наноситься как на культуральную посуду, так и на другие поверхности, например, вспомогательный гидрогель (sacrificial hydrogel), обеспечивать своевременную полимеризацию;

3) биоматериалы должны иметь контролируемую кинетику деградации и нетоксичные продукты распада, поскольку встроенные клетки секретируют

протеазы и продуцируют белки внеклеточного матрикса, которые определяют новую ткань;

4) структуры на основе биоматериалов должны обладать хорошими механическими свойствами, которые необходимы для продолжения функционирования конструкции.

В настоящее время исследования с использованием 3D-биопечати для восстановления хрящевой и костной тканей, а также кожи доведены до стадии клинического применения (Murphy et al., 2020). Хрящевая ткань характеризуется относительно простым строением с низкой плотностью клеток, не содержит кровеносных сосудов и нервов, что упрощает изготовление тканеинженерных конструкций (Grogan et al., 2003; Murphy et al., 2020). В случае хрящевой ткани для экструзионной 3D-биопечати используют такие материалы, как желатинметакриламид (Schuurman et al., 2013; Levato et al., 2017), коллаген (Ren et al., 2016), полиэтиленгликольдиметакрилат (Cui et al., 2012), наноцеллюлоза с добавкой альгината (Nguyen et al., 2017), децеллюляризованный хрящевой матрикс с полисахаридами гелланом и альгинатом (Kesti et al., 2015).

Коллаген – это природный белковый полимер, молекула которого представляет собой правозакрученную спираль из трех  $\alpha$ -цепей. Эти белковые цепи содержат сайты клеточной адгезии на основе трипептида аргинин–глицин–аспарагиновая кислота (RGD) (Chaisri et al., 2015). Молекулярная структура и масса, а также температурные условия влияют на физико-химические характеристики коллагена и определяют вязкость и образование гидрогелей на его основе (Zhang et al., 2019). Коллаген входит в состав внеклеточного матрикса и в основном содержится в соединительной ткани животных и человека. В настоящее время описано 29 типов коллагена, которые кодируются более чем 40 генами (Chaisri et al., 2015), однако более 90% всего коллагена высших организмов приходится на I, II, III и IV типы (Abraham et al., 2008). Коллаген I типа участвует в многочисленных физиологически важных взаимодействиях, модулируя клеточную пролиферацию, миграцию, дифференцировку и специфическую экспрессию генов (Liu et al., 2008). Коллаген характеризуется биодegradуемостью, биосовместимостью и низкой иммуногенностью, поэтому он широко используется в 3D-биопечати в тканевой инженерии (Liu et al., 2008; Osidak et al., 2019; Zhang et al., 2019).

Традиционно для биопечати применяют биочернила на основе коллагена низкой концентрации – до 1% (Drobnik et al., 2019; Okubo et al., 2019), что объясняется необходимостью доступа питательных веществ и газов к инкорпорированным в скаффолд клеткам. Однако дальнейшее развитие метода 3D-биопечати направлено на повышение точности печати и лучшее сохранение геометрических параметров сформированных конструкций, что требует применения более вязких гидрогелей (Skardal et al., 2015). Один из вариантов – применение биочернил

на основе коллагена высокой концентрации (Osidak et al., 2019). Цель настоящего исследования – оценка пригодности коллагена высокой концентрации для создания скаффолдов с инкорпорированными хондроцитами методом 3D-биопечати для формирования хрящевой ткани *in vitro* и *in vivo*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Получение клеток.** В эксперименте использовали клетки, полученные из мечевидных хрящей двух беспородных белых крыс-самцов (масса 300 г, возраст 4 мес.). Хрящ отделяли от грудины, удаляли все мягкие ткани, измельчали ножницами на кусочки толщиной 3–4 мм, дважды промывали стерильным фосфатным буфером и помещали в стакан с 0.15%-ным раствором коллагеназы в среде DMEM. Фрагменты ткани инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение ~20 ч (MCO-5AC, Sanyo, Япония). После инкубации для окончательного разделения клеток раствор перемешивали 30 мин на магнитной мешалке (Biosan, Латвия), затем клетки осаждали в течение 5 мин при 400 g (центрифуга ELMi CM-6M, Латвия). Для отмывания от фермента клеточный осадок ресуспендировали в среде, дополненной 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Франция) и центрифугировали в том же режиме. Процедуру повторяли дважды. После этого клетки ресуспендировали в среде с сывороткой, отбирали 200 мкл суспензии, окрашивали 0.4%-ным раствором трипанового синего в фосфатном буфере и подсчитывали количество живых клеток.

**Культивирование клеток.** Клеточную суспензию (~450 000 мл<sup>-1</sup>) переносили в культуральный флакон с площадью поверхности 25 см<sup>2</sup> (Corning, США), добавляли среду с 10% сыворотки, пенициллином-стрептомицином (по 50 ЕД/мкг/мл), глютамином (649 мкг/мл), помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор для прикрепления. Через 48 ч производили замену среды на свежую. Культивировали до образования монослоя (примерно 7 сут), после чего переносили в новые флаконы. Для эксперимента использовали клетки 2-го пассажа.

**Подготовка биочернил.** Биочернила готовили на основе стерильного ателоколлагена свиньи I типа в соответствии с описанной методикой (Osidak et al., 2019). В день эксперимента клетки снимали с пластика раствором трипсина–ЭДТА, после окрашивания трипановым синим подсчитывали в камере Горяева (Минимед, Россия) количество живых клеток, центрифугировали (400 g, 5 мин) и ресуспендировали в 0.25 мл среды без сыворотки. Клеточную суспензию в объеме 0.25 мл смешивали с 0.25 мл буферного раствора для коллагена и охлаждали при 4°C в течение 10 мин. Этот раствор смешивали с 0.5 мл раствора коллагена, получив таким образом биочернила с концентрацией коллагена 4%. До печати био-

чернила держали при 4°C. Конечная концентрация клеток составляла 20 млн мл<sup>-1</sup>.

**Параметры печати.** Для создания скаффолдов был использован 3D-биопринтер Rokit Invivo (Южная Корея) с ПО версии 1.68. Слайсинг модели проводили в программе NewCreatorK версии 1.57.63. Гидрогель находился в шприце с внутренним диаметром 8.24 мм. Подача материала осуществлялась через иглу 21G (внутренний диаметр 514 мкм) длиной 0.5 дюймов типа “Luer-Lock”. Печать осуществляли в стерильные чашки Петри диаметром 60 мм (Corning, США). Высота слоя составляла 386 мкм – 75% от диаметра сопла (Аргучинская и др., 2019). Для получения стабильного филамента печать проводили с увеличенным в 1.5 раза выходом материала с пропорционально (до уровня 66%) сниженной плотностью заполнения и концентрическим алгоритмом печати. Выход материала на первом слое увеличивался на 30% для учета погрешности определения нулевого уровня. Скорость печати составляла 5 мм/с. Температура диспенсера была установлена на уровне 4°C, температура печатного столика соответствовала комнатной. Перед печатью проводили стерилизацию внутреннего пространства принтера с помощью встроенной УФ-лампы с длиной волны 254 нм. В каждой чашке размещали по три печатных конструкции размером 4 × 4 × 4 мм.

**Инкубирование после печати.** После окончания печати чашки заливали теплой питательной средой в количестве, полностью покрывающем печатные конструкции. Состав среды: DMEM с содержанием глюкозы 4.5 г/л, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 50 ЕД/мкг/мл пенициллина-стрептомицина, 649 мкг/мл глютамина, 100 нг/мл фактора роста фибробластов, 100 нг/мл инсулиноподобного фактора роста I типа, 10 нг/мл трансформирующего фактора роста β1. Каркасы инкубировали в стандартных для культур клеток условиях. Среду меняли два раза в неделю.

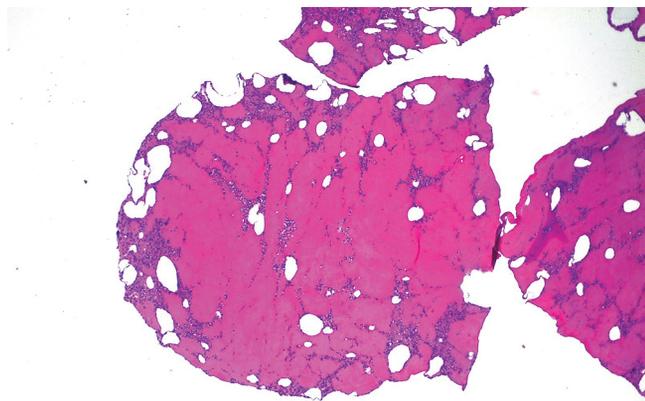
**Эксперименты на животных.** Через 1 ч после печати два скаффолда были имплантированы двум беспородным белым крысам-самцам. Все операции с животными осуществляли с применением ингаляционного эфирного наркоза. Животным выстригали шерсть в области холки, операционное поле обрабатывали 70%-ным раствором этанола. Делали разрез ножницами и с помощью скальпеля формировали под кожей карман, в который помещали имплантат. При зашивании раны края кармана стягивали, место вживления имплантата помечали цветной нитью шовного материала. Шов обрабатывали 3%-ным раствором перекиси водорода. Второй шов накладывали на кожу, повторно обрабатывали перекисью водорода. Для лучшей фиксации сверху наносили медицинский клей. Для обезболивания вокруг операционного поля в холку в трех местах вводили по 0.1 мл 0.5%-ного раствора новокаина. В течение эксперимента крыс содержали изолированно друг от

друга в одиночных клетках со свободным доступом к воде и пище. Место операции визуально осматривали ежедневно. Животных подвергли эвтаназии через 2 и 6 нед. после имплантации, отбирали материал для гистологического исследования.

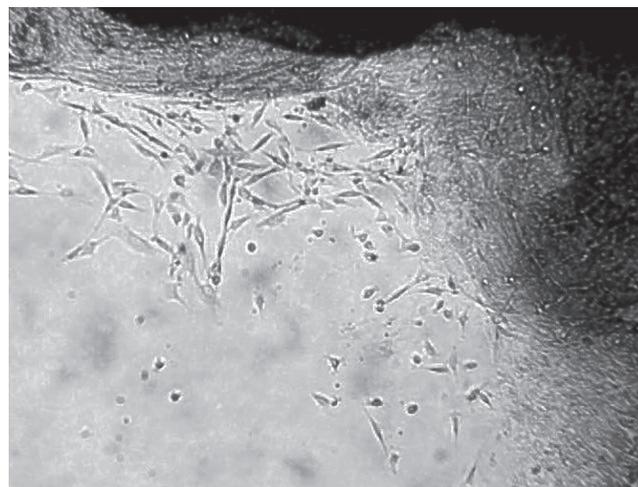
**Гистологические и иммуногистохимические исследования.** Гистологическому исследованию подвергали напечатанные конструкции через 1 ч, 2 и 4 нед. после печати. Материал, полученный в экспериментах с животными, исследовали через 2 и 6 нед. после имплантации. Коллагеновые каркасы и фрагменты тканей фиксировали 24 ч в кислой жидкости Буэна. После отмывки в 70%-ном этаноле выполняли стандартную гистологическую проводку образцов с их последующим заключением в парафиновую среду. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм, полученные на микротоме (Leica RM2235, Германия), помещали на силанизированные стекла (S3003, Dako, Дания). Для гистологических исследований депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином и эозином и альциановым синим по Моури. После обезживания в спиртах и просветления в ксилоле препараты заключали в канадский бальзам.

Иммуногистохимические исследования на серийных срезах проводили с использованием поликлональных кроличьих антител к ядерному антигену пролиферирующих клеток – PCNA (1 : 100) и моноклональных кроличьих антител к маркеру эндотелия – адгезионной молекулы тромбоцитов/эндотелиальных клеток-1 – PECAM-1 (1 : 250). Для иммуновизуализации кроличьих антител применяли козьи антитела к кроличьим IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 1000). Растворы для иммуногистохимии готовили на фосфатно-солевом буфере.

Выявление антигенов на гистологических срезах выполнено согласно основным требованиям для иммунопероксидазных методов. Предварительно все антитела и наборы были протестированы на позитивном контроле экспериментального материала. Оптимальные условия иммуноокрашивания определяли по соотношению интенсивности иммуноположительной реакции к “фону”. Согласно протоколу иммуногистохимических исследований, до нанесения первичных антител к PCNA и CD31 депарафинированные срезы, погруженные в цитратный буфер (pH 6.0), прогревали в микроволновой печи (5 мин, 720 Вт). Эндогенную пероксидазу блокировали в 3%-ном растворе перекиси водорода. В блокирующий буфер добавляли 2% нормальной сыворотки животных-доноров вторых антител, 1% бычьего сывороточного альбумина и 0.1% Тритона X-100. В растворе первичных антител препараты инкубировали в течение ночи во влажной камере при 4°C. После отмывки препаратов в фосфатно-солевом буфере на срезы наносили вторичные антитела на 1 час при комнатной температуре. Субстратную пероксидазу выявляли с использованием диаминобензидина



**Рис. 1.** Распределение хондроцитов в коллагеновых конструкциях через 1 ч после печати. Окрашивание гематоксилином и эозином. Увел. об.: 2.5×.



**Рис. 2.** Миграция хондроцитов из коллагеновых каркасов на дно чашек Петри через 1 сут после печати. Фазовый контраст. Увел. об.: 10×.

(Liquid DAB+, DAKO, K3468). Ядра клеток докрасивали гематоксилином Майера.

Гистологические препараты изучали в микроскопе Leica DM 1000 (Германия) с камерой Leica ICC50 HD (Германия).

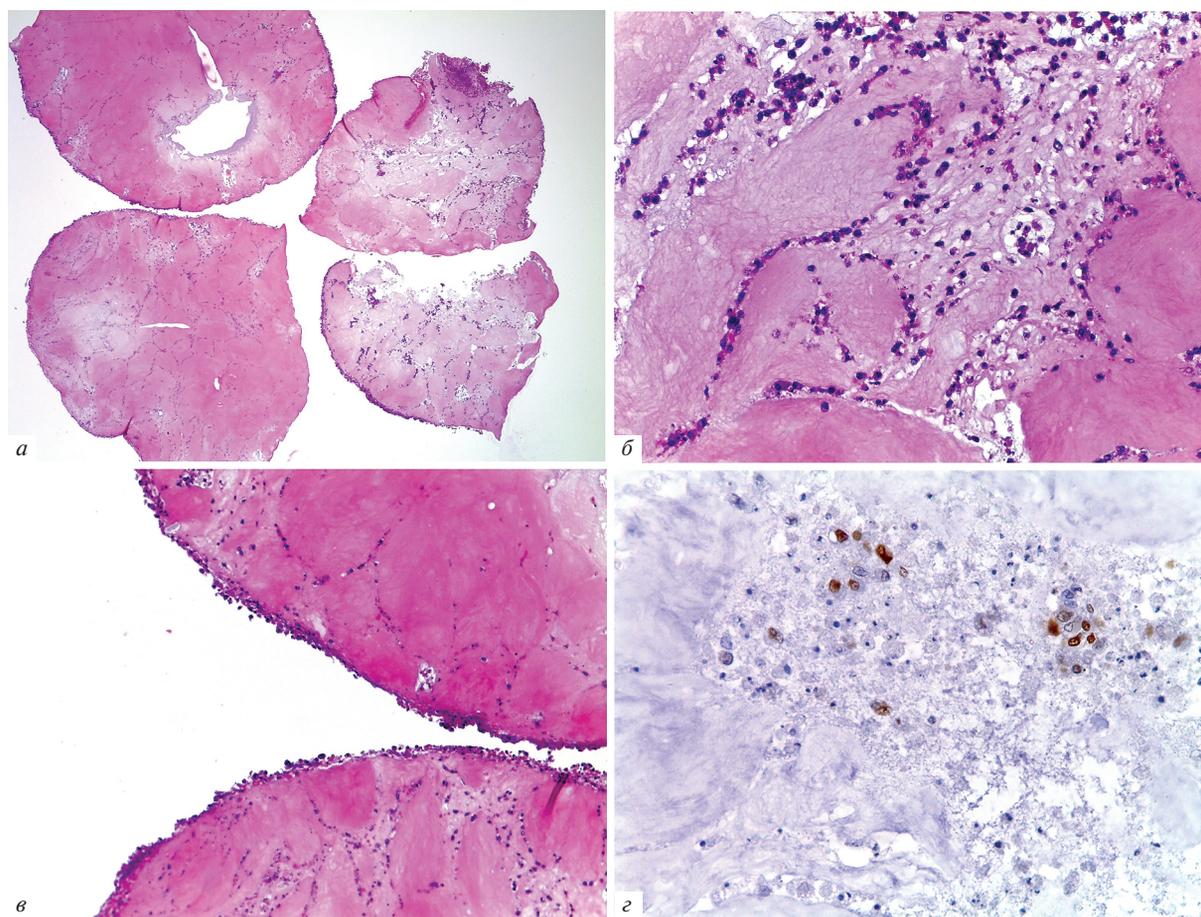
**Использованные реактивы.** Альциановый синий (8GX), инсулиноподобный фактор роста I типа (IGF-1), сыворотка козья, трансформирующий фактор роста  $\beta$ 1, тринитрофенол (для приготовления жидкости Буэна, 1.3%), тритон X-100 (Sigma-Aldrich, США); ацетон, ксилол (орто) (ЧДА), перекись водорода (3%), хлороформ (ХЧ) (Россия); бычий сывороточный альбумин (Santa Cruz, США); гематоксилин Майера, парафиновая среда (Гистомикс), формалин (для приготовления жидкости Буэна, 40%), эозин (1%-ный спиртовой раствор) (БиоВитрум, Россия); глютамин, коллагеназа II типа (*Clostridium histolyticum*, 315 ед/мг), пенициллин-стрептомицин, среда DMEM (содержание глюкозы 4.5 г/л), раствор трипсина–ЭДТА, трипановый синий, фактор роста фибробластов (ООО НПП “ПанЭко”, Россия); диаминобензидин (Dako, Дания); канадский бальзам (Merck, Германия); козьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (ab205718), моноклональные кроличьи антитела к CD31/PECAM-1 (ab182981) (Abcam, Великобритания); комплект ателоколлагена свиньи I типа с буферным раствором (80 мг/мл, ИМТЕК, Россия); медицинский клей БФ-6 (МПЗ, Россия); новокаин (ОАО “Дальхимфарм”, Россия); поликлональные кроличьи антитела к PCNA (PA5-27214, Invitrogen, США); фосфатно-солевой буфер (рН 7.4, ЭКОсервис, Россия); шовный материал (Monocryl poliglecaprone 25, Ethicon, США–Бельгия); эмбриональная телячья сыворотка (Biosera, Франция); этанол медицинский (95%, ЗАО “РФК”, Россия); эфир для наркоза (Химмед, Россия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Результаты исследований *in vitro*.** При первичной изоляции клеток из хрящевой ткани животных с помощью фермента коллагеназы общее их количество было невелико (~775 тыс.), что, вероятно, объясняется возрастом доноров. Выход живых клеток при описанном способе изоляции составил 86.4%. Клетки нулевого пассажа имели характерную для хондроцитов кубическую форму и зернистую цитоплазму, образовывали плотный монослой на 7 сут культивирования. Жизнеспособность клеток 2-го пассажа, которые использовали в эксперименте, до смешивания с коллагеном составляла 99.9%.

Состояние клеток в составе коллагеновой конструкции через 1 ч после печати, в течение которого она находилась в питательной среде в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе, представлено на рис. 1: коллаген окрашен в розовый цвет, клетки имеют базофильную окраску. Распределение клеток по объему скаффолда неравномерно. Клетки концентрировались большей частью у воздушных пузырей внутри конструкции и вблизи свободных поверхностей скаффолда. Через 1 сут нахождения в инкубаторе и в следующие несколько дней наблюдали массовую миграцию клеток из коллагеновых каркасов и прикрепление их ко дну чашек (рис. 2). В дальнейшем ее темпы снижались. Для того, чтобы предотвратить истощение питательной среды клетками, мигрировавшими из коллагеновых конструкций, скаффолды были перенесены в новые чашки Петри.

Со второй недели наблюдали уменьшение размеров, деформацию и, в некоторых случаях, частичное разрушение скаффолдов. На рис. 3а представлена микрофотография срезов разных каркасов через 14 сут после печати. Здесь видна неравномерная окраска коллагена, присутствуют более светлые (рыхлые) и темные



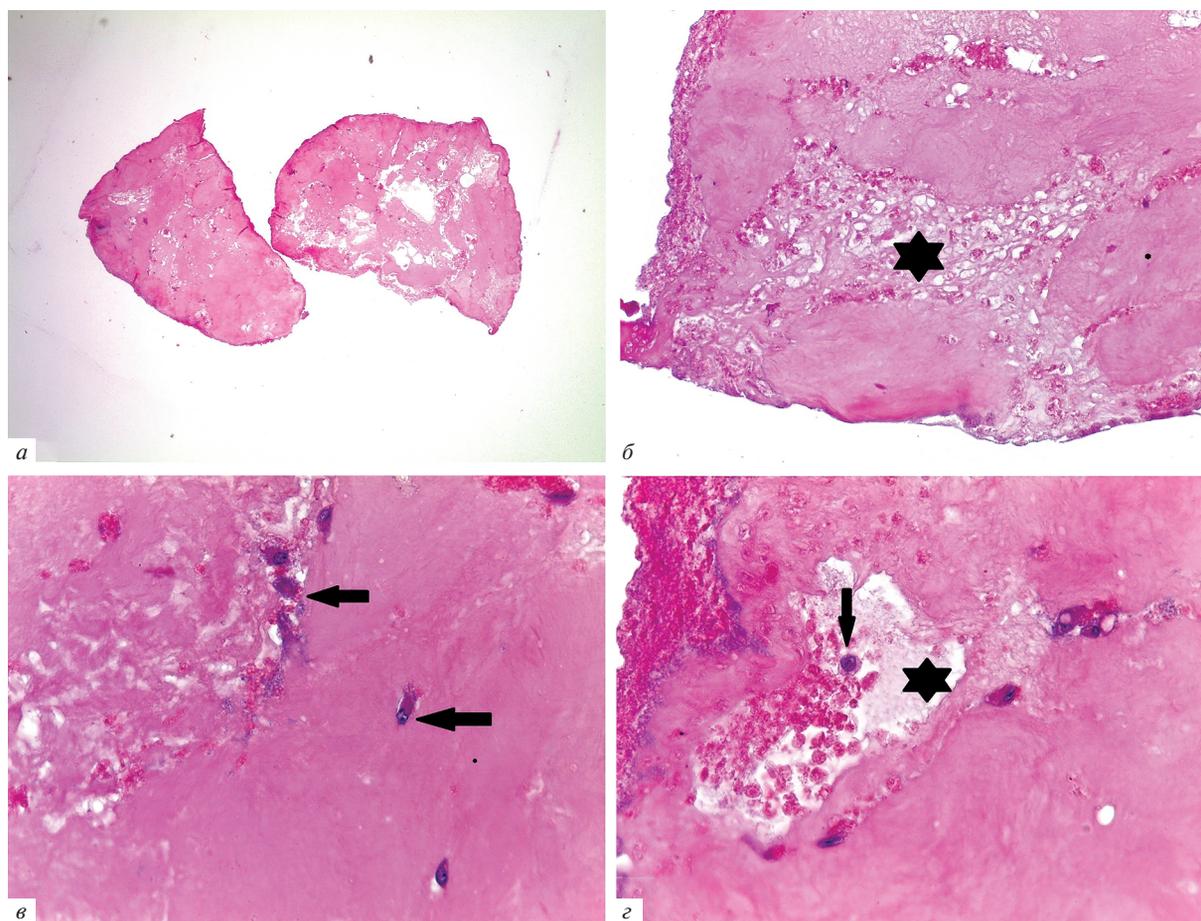
**Рис. 3.** Хондроциты в составе тканеинженерных коллагеновых конструкций через 14 сут после печати. *а–в* – Окрашивание гематоксилином и эозином, *г* – иммуноокрашивание на PCNA. Увел. об.: *а* – 2.5×, *б* – 20×, *в* – 10×, *г* – 40×.

(плотные) участки. Вероятно, плотность коллагена изменилась вследствие разрушения, а также действия клеточных протеолитических ферментов. В более плотных участках воздушные пузыри отсутствовали. Клетки сосредоточены в более рыхлых участках (рис. 3б). Много клеток располагалось на поверхности конструкций (рис. 3в). PCNA-положительная реакция ядер наблюдалась только в отдельных клетках (рис. 3г), что, на наш взгляд, свидетельствует о том, что основная часть клеток находилась в состоянии покоя. В следующие 14 сут большая часть клеток, заключенных в коллаген, погибла.

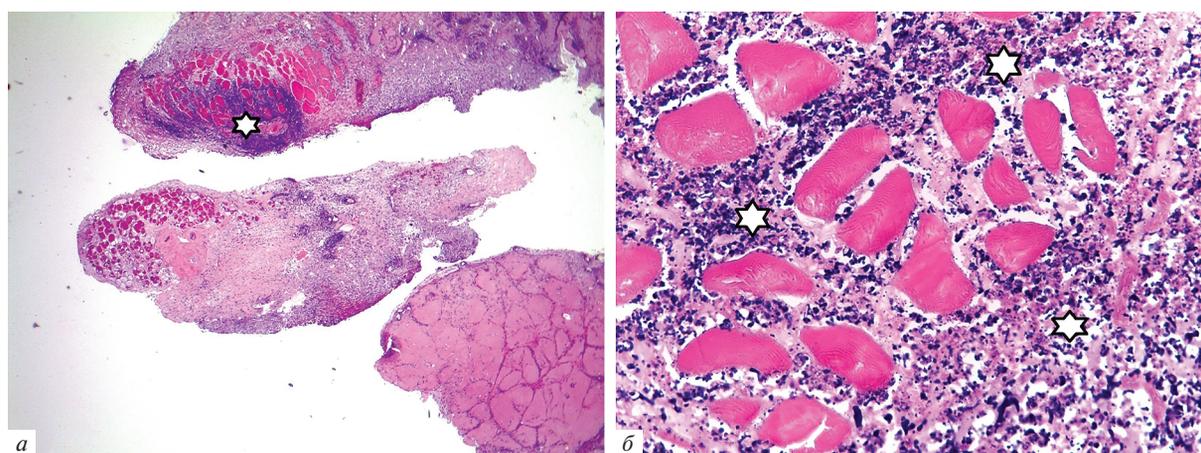
На срезах, сделанных через 28 сут после печати, можно видеть, что конструкции уменьшились в размерах и деформировались (рис. 4а), присутствовал клеточный детрит (рис. 4б). На микрофотографиях отчетливо видно, что через 4 нед. в коллагене сохранились только отдельные живые клетки (рис. 4в, г).

**Результаты исследований *in vivo*.** Гистологическое исследование показало, что через 2 нед. в отдельных участках зоны введения имплантата животным присутствовал клеточный детрит, состоявший из фрагментов каркаса, погибших полиморфноядерных

лейкоцитов и некротизированных подкожных мышечных волокон (рис. 5а, б). Вокруг скаффолда формировалась капсула из соединительной ткани, которая прорастала в коллаген, разделяя его на отдельные фрагменты (рис. 6). Вокруг кровеносных сосудов располагались макрофаги, по-видимому, вовлеченные в процесс рассасывания органического каркаса, и гранулемы инородных тел (рис. 7). Гранулематозные узелки, окруженные кровеносными сосудами, содержали большое количество клеточных элементов, концентрически располагавшихся вокруг фрагментов деградирующего матрикса. При иммуногистохимическом окрашивании на CD-31 в зонах рассасывания скаффолда выявлялись многочисленные формирующиеся мелкие кровеносные сосуды (рис. 8). Положительная реакция ядер на PCNA наблюдалась в клетках соединительной ткани, эндотелии сосудов и в клеточных элементах гранул (рис. 9). В окружающей соединительной ткани отмечалось присутствие клеточных элементов с округлыми ядрами и узким ободком цитоплазмы (возможно, хондроцитов). Таким образом, результаты патоморфологического исследования свидетельствуют о том, что через 2 нед. после имплантации скаффолда под кожу



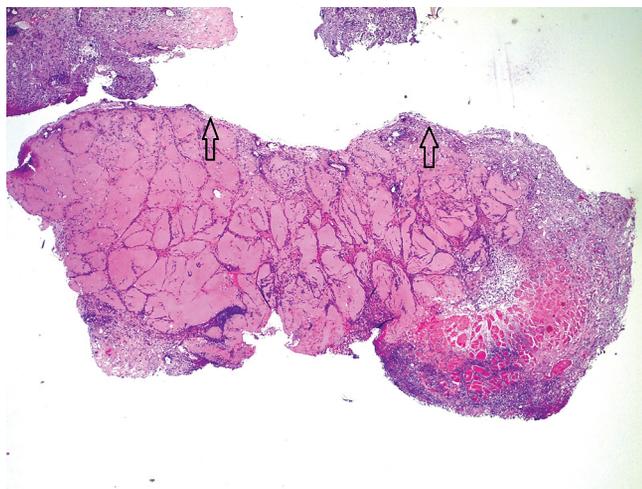
**Рис. 4.** Коллагеновые конструкции через 28 сут после печати. Окрашивание гематоксилином и эозином. Стрелками показаны живые клетки; звездочки – клеточный детрит. Увел. об.: а – 2,5×, б – 10×, в, г – 40×.



**Рис. 5.** Место введения скаффолда через 2 нед. после его имплантации под кожу холки крысы. Звездочками показаны области с признаками воспалительной реакции в зоне имплантации. Окрашивание гематоксилином и эозином. Увел. об.: а – 2,5, б – 5×.

крыс наблюдается гранулематозное воспаление с разрушением органического матрикса макрофагами и гигантскими клетками.

Через 6 нед. в зоне введения имплантата под эпидермисом сформировалась соединительная ткань (рис. 10а), в которой, рядом с кровеносными сосуда-



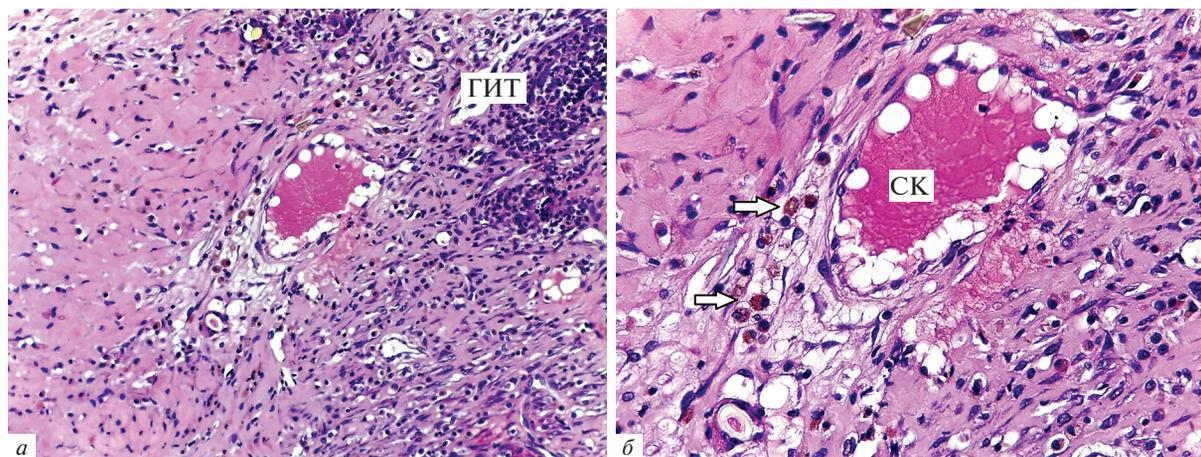
**Рис. 6.** Формирование соединительнотканной капсулы на границе с подкожной жировой клетчаткой (отмечено стрелками). Окрашивание гематоксилином и эозином. Увел. об.: 2.5×.

ми, обнаруживались макрофаги и группы мелких клеток с округлыми ядрами, по морфологическим критериям соответствующие молодым хондроцитам (рис. 10б, в). Цитоплазма этих клеток дала положительную реакцию на гликозаминогликаны при окрашивании альциановым синим (рис. 10г). В то же время данные свидетельства формирования хрящевой ткани можно считать косвенными и требующими дальнейшего подтверждения.

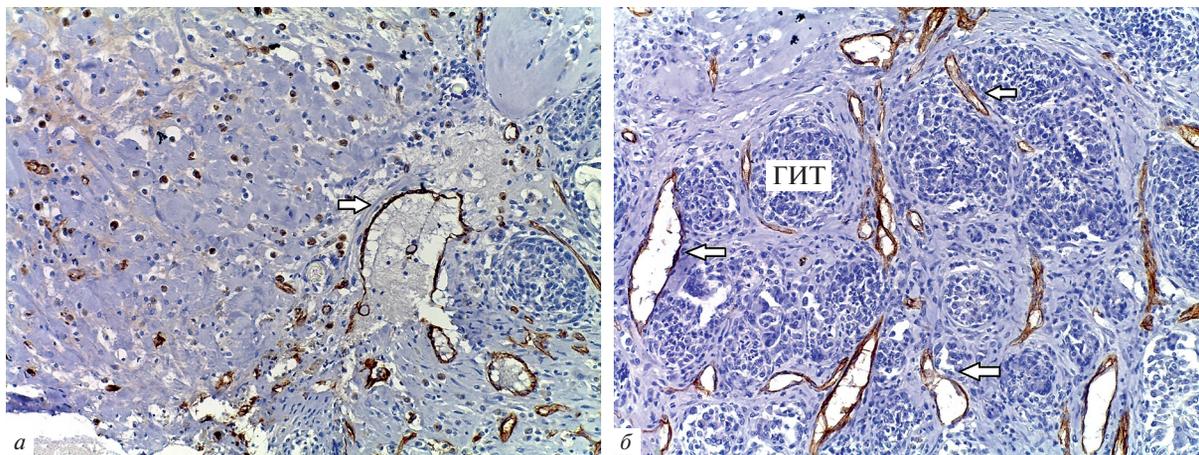
## ОБСУЖДЕНИЕ

Трехмерная (3D) культура хондроцитов считается предпочтительной для регенерации хрящевой ткани (Okubo et al., 2019). Сочетание 3D условий культиви-

рования с добавлением факторов роста позволяет сохранить специфический фенотип хондроцитов (Nguyen et al., 2017; Okubo et al., 2019), обеспечивая синтез и накопление молекул внеклеточного матрикса – протеогликанов и коллагенов, которые могут быть потеряны в условиях *in vitro* (Grogan et al., 2003; Бекетов и др., 2019). Трехмерные условия культивирования создаются, в основном, с помощью каркасов из различных материалов, которые служат для прикрепления, жизнедеятельности и пролиферации клеточных элементов. Жизнеспособность клеток в искусственных тканях зависит от того, насколько эффективно они снабжаются кислородом и питательными веществами. Ограниченный поток метаболитов в тканевых конструкциях – одна из проблем всей тканевой инженерии (Brown et al., 2007). В статических условиях культивирования основным способом переноса веществ в гидрогелях является диффузия. Предполагается, что кислород постоянно поступает в периферические зоны тканевой инженерной конструкции: он растворяется в питательной среде, при этом его концентрация пропорциональна парциальному давлению газа и коэффициенту растворимости (Brown et al., 2007). Поскольку в искусственных тканях диффузия кислорода часто происходит медленнее, чем его потребление, кислород является лимитирующим фактором в выживании клеток в конструкциях толще 100–200 мкм (Malda et al., 2004). На доступность кислорода кроме длины пути диффузии влияет плотность клеточной массы, так как способность кислорода диффундировать через клетки значительно меньше, чем через воду (Radisic et al., 2005; Brown et al., 2007). В каркасах с достаточно большой объемной долей клеток затрудненная диффузия метаболитов будет дополняться их повышенным потреблением. Поэтому в статических клеточных конструкциях, где питательные вещества распространяются только путем диффузии, неиз-



**Рис. 7.** Зона рассасывания скаффолда. *a* – Макрофаги и гранулемы инородных тел в зоне элиминации имплантата; *б* – фрагмент *a* при большем увеличении. СК – Скаффолд, ГИТ – гранулема инородных тел, стрелками показаны макрофаги. Окрашивание гематоксилином и эозином. Увел. об.: *a* – 20×, *б* – 40×.



**Рис. 8.** Васкуляризация зоны рассасывания скаффолда. *а* – Ангиогенез на границе скаффолда, *б* – ангиогенез в области формирования гранул инородных тел (ГИТ) с многоядерными клетками рассасывания. Стрелками показана иммуногистохимическая реакция эндотелия сосудов с антителами к CD31. Увел. об.: 20×.

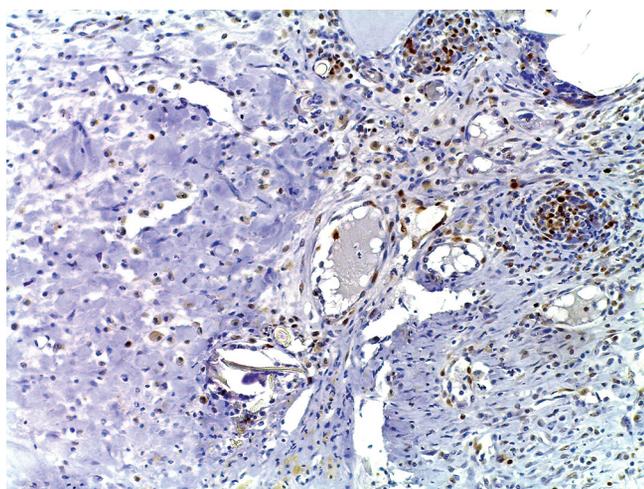
бежно возникают области, в которых преобладает пролиферация клеток, – это наружная поверхность скаффолда (Lewis et al., 2005).

Результаты, полученные в нашем исследовании, являются хорошей иллюстрацией всему вышесказанному. Уже через 1 ч нахождения тканеинженерных конструкций в статических условиях инкубатора произошло перемещение клеток к наружным поверхностям скаффолда и воздушным пузырькам. В течение следующих нескольких дней наблюдали массовый выход клеток за пределы коллагеновой конструкции и прикрепление их ко дну культуральной посуды. О гетерогенном распределении клеток внутри тканеинженерных каркасов сообщают и другие авторы. Так, Левис с соавторами (Lewis et al., 2005) наблюдали увеличение плотности бычьих хон-

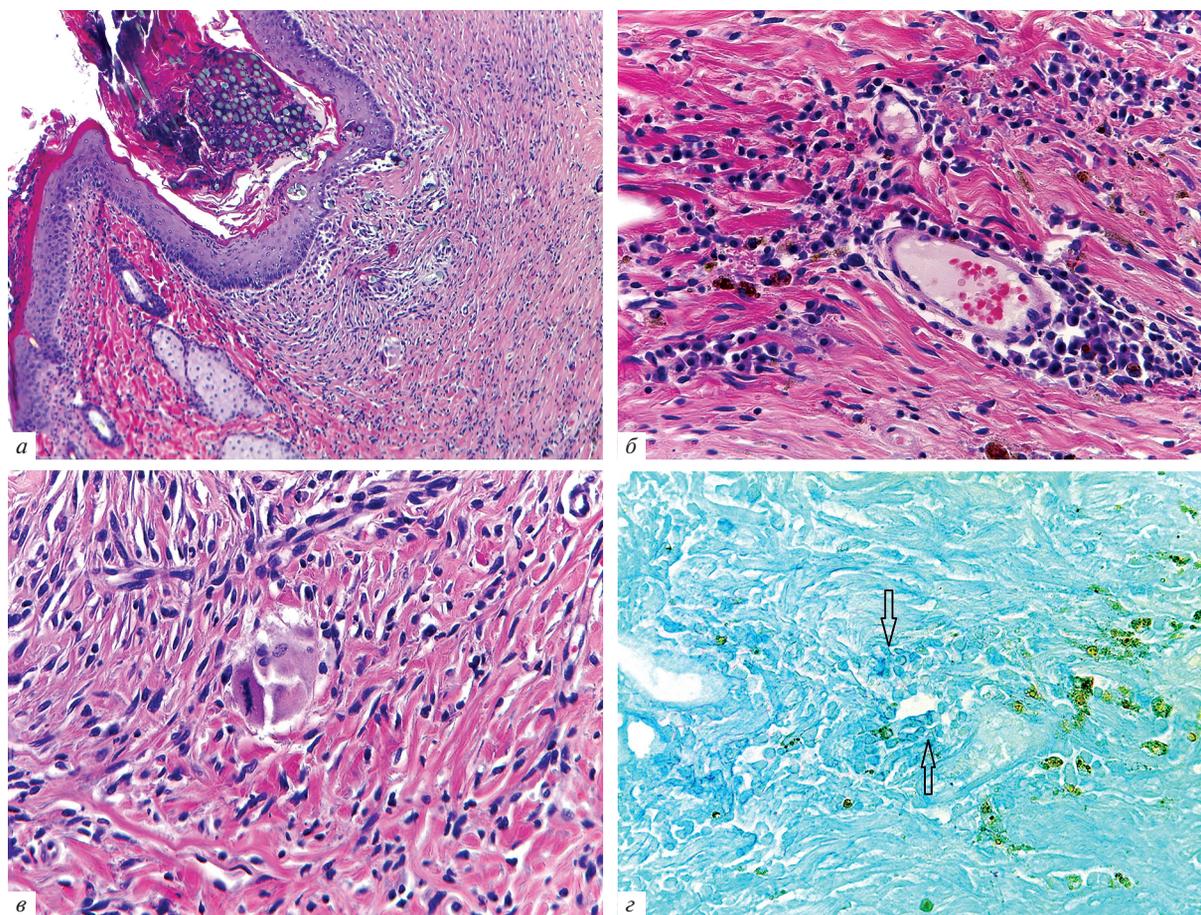
дроцитов в периферических слоях пористого каркаса из терефталата/полибутилентерефталата в течение первых 14 сут. культивирования. В литературе также сообщается (Radisic et al., 2005), что концентрация кислорода и жизнеспособность сердечных миоцитов крыс снижались линейно и плотность живых клеток уменьшалась экспоненциально с ростом расстояния от поверхности конструкции (коллагеновая губка диаметром 6 мм и толщиной 1.5 мм).

Хрящ – аваскулярная ткань и относительно медленная диффузия веществ в глубину конструкции не считается преобладающей проблемой в инженерии хряща (Grogan et al., 2003). Однако в искусственных каркасах используется высокая плотность клеток для получения более “функциональной” ткани, так как она имеет решающее значение для установления межклеточных контактов и осуществления тканевых функций (Radisic et al., 2005; Brown et al., 2007; Cigan et al., 2016). При биопечати высокая плотность клеток необходима также для достижения хорошей выживаемости после печати (Nguyen et al., 2017). Таким образом, в диффузно-ограниченных конструкциях возникает противоречие между высокой плотностью клеток и достаточным содержанием кислорода. Это становится особенно важным в свете выводов, сделанных Окубо с соавторами (Okubo et al., 2019). По их мнению, эффективность хондрогенеза напрямую зависела от плотности клеток в скаффолдах (чем выше, тем лучше) и фактор высокой жизнеспособности клеток являлся более важным с точки зрения формирования ткани, чем попытки стимулировать хондрогенез.

В соответствии с представленными данными при культивировании скаффолда в течение 4 нед. произошло его частичное разрушение и сжатие. Одной из причин, вызвавшей разрушение коллагена, могло быть выделение клетками протеолитических ферментов (Zhang et al., 2019). Деформация и сжатие



**Рис. 9.** Иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA в зоне рассасывания скаффолда. Увел. об.: 20×.



**Рис. 10.** Зона имплантации скаффолда под кожу холки крысы через 6 недель. *a* – В верхнем левом углу виден фрагмент шовной нити в месте имплантации; *б, в* – в окружающих тканях видны группы мелких клеток с округлыми ядрами, по морфологическим критериям соответствующие молодым хондроцитам, *з* – группа клеток с положительной реакцией на гликозаминогликаны в подкожной соединительной ткани крысы (показаны *стрелками*) в зоне рассасывания органического матрикса. *a–в* – Окрашивание гематоксилином и эозином, *з* – окрашивание альциановым синим. Увел. об.: *a* – 10×, *б–з* – 40×.

конструкций из натуральных материалов, например, внеклеточного матрикса хряща или коллагена вследствие жизнедеятельности клеток также описаны в литературе (Liu et al., 2008; Rowland et al., 2013). Клеточно-опосредованное сжатие пористого материала может уменьшить диффузию кислорода и питательных веществ к центру, и, как следствие, объем, доступный для клеточной пролиферации (Rowland et al., 2013), что также не способствует формированию полноценной ткани. Дробник с соавторами (Drobnik et al., 2019) исследовали долговечность трехмерных губчатых пористых каркасов на основе коллагена I типа с нервными эмбриональными крысиными клетками или без клеток после имплантации в головной мозг крысам. Было показано, что имплантаты оставались структурно не поврежденными в течение 4 нед., но индуцировали гранулематозное воспаление, включающее накопление многоядерных макрофагов, мононуклеарных воспалительных клеток и образование кровеносных сосудов. Авторы предположили, что иммунные реакции, включая воспаление, окис-

лительный стресс и низкий уровень трофических факторов могут вызывать гибель клеток внутри инженерных конструкций после имплантации. Мы наблюдали сходную картину воспаления после подкожной имплантации коллагеновых каркасов крысам. Но в нашем исследовании каркасы полностью рассосались в течение 4–6 нед., вероятно, по причине того, что состояли из немодифицированного коллагена. Обнаружение кровеносных сосудов, прорастающих в каркас, является положительным фактором, так как васкуляризация считается критически важным событием в тканевой инженерии (Murphy et al., 2020). Несмотря на то, что жизнеспособные клетки, по морфологическим критериям соответствующие молодым хондроцитам, сохранились, полноценного формирования хрящевой ткани не произошло. Вероятно, это также связано как с быстрым рассасыванием коллагенового скаффолда, так и небольшим количеством выживших клеток. Оставшиеся клетки не успели сформировать собственный матрикс, характерный для хрящевой ткани.

Для клинического применения трансплантаты должны быть объемными (не плоскими) и содержать физиологическую плотность метаболически активных дифференцированных клеток (Radisic et al., 2005). В тканеинженерных конструкциях, толщина которых составляет несколько мм, снабжение клеточек питательными веществами и особенно кислородом является критической проблемой. Ограничение диффузии питательных веществ приводит к пространственно неоднородным свойствам искусственной ткани (Bian et al., 2009). Как показывает анализ литературы, более высокая жизнеспособность клеток достигается в менее плотных гелях, в которых лучше осуществляется диффузия (Nguyen et al., 2017; Okubo et al., 2019). Однако в трехмерной биопечати плотность материала должна обеспечивать возможность получения стабильной конструкции заданной формы, иначе все преимущества технологии будут сведены к нулю. Это противоречие может быть разрешено с помощью включения дополнительных каналов и пор, например, из вспомогательных материалов (sacrificial hydrogel), которые удаляются из готовых изделий (Levato et al., 2017), или с использованием динамических систем культивирования – биореакторов. В то же время существует мнение, что перфузионные системы могут не подходить для получения хрящевой ткани, так как способны удалять специфические метаболиты (коллаген) и приводить к апоптозу клеток (Grogan et al., 2003). Результаты нашего исследования показали, что собственной пористости использованного 4%-ного коллагенового геля было недостаточно для снабжения инкорпорированных клеток кислородом и питательными веществами и сохранения их жизнеспособности в течение длительного времени в условиях *in vitro*. Вторым недостатком материала была его быстрая (в течение месяца) деградация в организме животных. Это в свою очередь не позволило необходимое время поддерживать условия для формирования хрящевой ткани в месте имплантации. Таким образом, в дальнейших исследованиях целесообразно использовать модифицированные варианты коллагена или другие полимеры, в том числе синтетические, характеризующиеся более длительным сроком деградации.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают большую благодарность Дибировой Заире Гаджиевне – лаборанту-исследователю лаборатории радиационной патоморфологии за неоценимую помощь в проведении технических этапов гистологических исследований.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа проводилась в рамках выполнения тем государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации за 2018–2020 гг.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проведены в соответствии с принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аргучинская Н.В., Бекетов Е.Е., Осидак Е.О., Северюков Ф.Е., Шегай П.В., Каприн А.Д. 2019. Создание скаффолда щитовидного хряща человека методом 3D-биопринтинга. Гены и клетки. Т. 14. № 5. С. 26. (Arguchinskaya N.V., Beketov E.E., Osidak E.O., Severyukov F.E., Shegai P.V., Kaprin A.D. 2019. Human thyroid cartilage scaffold fabrication using 3D-bioprinting. Genes and Cells. V. 14. № 5. P. 26.)
- Бекетов Е.Е. Исаева Е.В., Шегай П.В., Иванов С.А., Каприн А.Д. 2019. Современное состояние тканевой инженерии для восстановления хрящевой ткани. Гены и клетки. Т. 14. № 2. С. 12. (Beketov E.E. Isaeva E.V., Shegai P.V., Ivanov S.A., Kaprin A.D. 2019. Current state of tissue engineering for cartilage regeneration. Genes and Cells. V. 14. № 2. P. 12.) <https://doi.org/10.23868/201906013>
- Abraham L.C., Zuena E., Perez-Ramirez B., Kaplan D.L. 2008. Guide to collagen characterization for biomaterial studies. J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. V. 87. P. 264. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31078>
- Bian L., Angione S.L., Ng K.W., Lima E.G., Williams D.Y., Mao D.Q., Ateshian G. A., Hung C.T. 2009. Influence of decreasing nutrient path length on the development of engineered cartilage. Osteoarthritis Cartilage. V. 17. P. 677. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2008.10.003>
- Brown D.A., MacLellan W.R., Laks H., Dunn J.C.Y., Wu B.M., Beygui R.E. 2007. Analysis of oxygen transport in a diffusion-limited model of engineered heart tissue. Biotechnol. Bioeng. V. 97. P. 962. <https://doi.org/10.1002/bit.21295>
- Chaisri P., Chingsungnoen A., Siri S. 2015. Repetitive gly-leu-lys-gly-glu-asn-arg-gly-asn peptide derived from collagen and fibronectin for improving cell-scaffold interaction. Appl. Biochem. Biotechnol. V. 175. P. 2489. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1388-y>
- Cigan A.D., Durney K.M., Nims R.J., Vunjak-Novakovic G., Hung C.T., Ateshian G.A. 2016. Nutrient channels aid the growth of articular surface-sized engineered cartilage constructs. Tissue Eng. Part A. V. 22. P. 1063. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2016.0179>
- Cui X., Breitenkamp K., Finn M.G., Lotz M., D'Lima D.D. 2012. Direct human cartilage repair using three-dimensional bioprinting technology. Tissue Eng. Part A. V. 18. P. 1304. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0543>
- Drobnik J., Pietrucha K., Janczar K., Polis L., Polis B., Safandowska M., Szymański J. 2019. Intra-cerebral implantation of a variety of collagenous scaffolds with nervous embryonic cells. Exp. Ther. Med. V. 18. P. 4758. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.8116>

- Grogan S.P., Rieser F., Winkelmann V., Berardi S., Mainil-Varlet P. 2003. A static, closed and scaffold-free bioreactor system that permits chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis and Cartilage*. V. 11. P. 403.  
[https://doi.org/10.1016/s1063-4584\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/s1063-4584(03)00053-0)
- Kesti M., Eberhardt C., Pagliccia G., Kenkel D., Grande D., Boss A., Zenobi-Wong M. 2015. Bioprinting complex cartilaginous structures with clinically compliant biomaterials. *Adv. Funct. Mater.* V. 25. P. 7406.  
<https://doi.org/10.1002/adfm.201503423>
- Levato R., Webb W.R., Otto I.A., Mensinga A., Zhang Y., van Rijen M., van Weeren R., Khan I.M., Malda J. 2017. The bio in the ink: cartilage regeneration with bioprintable hydrogels and articular cartilage-derived progenitor cells. *Acta Biomater.* V. 1. P. 41.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.08.005>
- Lewis M.C., Macarthur B.D., Malda J., Pettet G., Please C.P. 2005. Heterogeneous proliferation within engineered cartilaginous tissue: the role of oxygen tension. *Biotechnol. Bioeng.* V. 91. P. 607.  
<https://doi.org/10.1002/bit.20508>
- Liu C.Z., Xia Z.D., Han Z.W., Hulley P.A., Triffitt J.T., Czernuszka J.T. 2008. Novel 3d collagen scaffolds fabricated by indirect printing technique for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* V. 85. P. 519.  
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.30975>
- Malda J., Woodfield T.B., Floodt F.V., Kooy F.K., Martens D.E., Trumper J., Blitterswijk C.A., Riesle J.U. 2004. The effect of PEGT/PBT scaffold architecture on oxygen gradients in tissue engineered cartilaginous constructs. *Biomaterials*. V. 25. P. 5773.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.028>
- Murphy S.V., Atala A. 2014. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.* V. 32. P. 773.  
<https://doi.org/10.1038/nbt.2958>
- Murphy S.V., De Coppi P., Atala A. 2020. Opportunities and challenges of translational 3d bioprinting. *Nat. Biomed. Eng.* V. 4. P. 370.  
<https://doi.org/10.1038/s41551-019-0471-7>
- Nguyen D., Hägg D.A., Forsman A., Ekholm J., Nimkingratana P., Brantsing C., Kalogeropoulos T., Zaunz S., Concaro S., Brittberg M., Lindahl A., Gatenholm P., Enejder A., Simonsson S. 2017. Cartilage tissue engineering by the 3d bioprinting of ips cells in a nanocellulose/alginate bioink. *Sci. Rep.* V. 7. P. 658.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-00690-y>
- Okubo R., Asawa Y., Watanabe M., Nagata S., Nio M., Takato T., Hikita A., Hoshi K. 2019. Proliferation medium in three-dimensional culture of auricular chondrocytes promotes effective cartilage regeneration *in vivo*. *Regen. Ther.* V. 15. P. 306.  
<https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.10.002>
- Osidak E.O., Karalkin P.A., Osidak M.S., Parfenov V.A., Sivog-rivov D.E., Pereira A.S., Gryadunova A.A., Koudan E.V., Khesuani Y.D., Kasyanov V.A., Belousov S.I., Krasheninnikov S.V., Grigoriev T.E., Chvalun S.N., Bulanova E.A. et al. 2019. Vis-coll collagen solution as a novel bioink for direct 3d bioprinting. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* V. 30. P. 31.  
<https://doi.org/10.1007/s10856-019-6233-y>
- Radisic M., Malda J., Epping E., Geng W., Langer R., Vunjak-Novakovic G. 2005. Oxygen gradients correlate with cell density and cell viability in engineered cardiac tissue. *Biotechnol. Bioeng.* V. 93. P. 332.  
<https://doi.org/10.1002/bit.20722>
- Ren X., Wang F., Chen C., Gong X., Yin L., Yang L. 2016. Engineering zonal cartilage through bioprinting collagen type ii hydrogel constructs with biomimetic chondrocyte density gradient. *BMC Musculoskelet Disord.* V. 20. P. 301.  
<https://doi.org/10.1186/s12891-016-1130-8>
- Rowland C.R., Lennon D.P., Caplan A.I., Guilak F. 2013. The effects of crosslinking of scaffolds engineered from cartilage ECM on the chondrogenic differentiation of MSCs. *Biomaterials*. V. 34. P. 5802.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.027>
- Schuurman W., Levett P.A., Pot M.W., Weeren P., Dhert W.J.A., Hutmacher D.W., Melchels F.P.W., Klein T.J., Malda J. 2013. Gelatin-methacrylamide hydrogels as potential biomaterials for fabrication of tissue-engineered cartilage constructs. *Macromol. Biosci.* V. 13. P. 551.  
<https://doi.org/10.1002/mabi.201200471>
- Skardal A., Devarasetty M., Kang H.W., Mead I., Bishop C., Shupe T., Lee S.J., Jackson J., Yoo J., Soker S., Atala A. 2015. A Hydrogel bioink toolkit for mimicking native tissue biochemical and mechanical properties in bioprinted tissue constructs. *Acta Biomater.* V. 25. P. 24.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.07.030>
- Zhang Y., Zhou D., Chen J., Zhang X., Li X., Zhao W., Xu T. 2019. Biomaterials based on marine resources for 3d bioprinting applications. *Mar. Drugs.* V. 17. P. 555.  
<https://doi.org/10.3390/md17100555>

## The Use of Collagen in a High Concentration for the Engineering of Cartilage Tissue with 3D-Bioprinting

E. V. Isaeva<sup>a,\*</sup>, E. E. Beketov<sup>a</sup>, V. V. Yuzhakov<sup>a</sup>, N. V. Arguchinskaya<sup>a</sup>, A. A. Kisel<sup>a</sup>, E. P. Malakhov<sup>a</sup>, T. S. Lagoda<sup>a</sup>, N. D. Yakovleva<sup>a</sup>, P. V. Shegai<sup>b</sup>, S. A. Ivanov<sup>a</sup>, and A. D. Kaprin<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Tsyb MRRC – Branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, 249036 Russia

<sup>b</sup>National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, 249036 Russia

\*e-mail: elesa@yandex.ru

3D-bioprinting is a promising technology for tissue engineering structure formation in the case of damaged tissue and organ replacement. Collagen is one of the most appropriate hydrogels for the purpose, due to its exceptional biocompatibility. However, the use of collagen with conventionally low concentration makes bioprinting difficult and

does not provide high accuracy. The purpose of this study was evaluation of suitability of collagen with high concentration in case of chondrocyte-laden scaffold fabrication via 3D-bioprinting for cartilage formation *in vitro* and *in vivo*. Immediately after the beginning of the scaffold incubation, cell migration to the surface and out of the scaffold was observed. The results of the study showed that the 4% porosity inherent for collagen is not enough for cells to survive in case of long-term incubation *in vitro*. The cells remaining in the collagen mostly died within 4 weeks. As for *in vivo* study, 2 weeks after implantation of the scaffold, a weak granulomatous inflammation was observed. After 6 weeks, connective tissue was formed in the area of implantation, where macrophages and the groups of small cells with rounded nuclei were found. In accordance with morphological criteria, these cells could be considered as young chondrocytes. However, their amount was not sufficient to start the formation of cartilage tissue.

**Keywords:** tissue engineering, 3D-bioprinting, scaffold, bio-ink, collagen, chondrocytes, histology, immunohistochemistry

УДК 577.12

## ВЛИЯНИЕ КАРБОДИИМИДА НА СТРУКТУРНО-МЕХАНИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОЛЛАГЕНОВЫХ ПЛЕНОК

© 2021 г. Ю. А. Нашекина<sup>1</sup>, \*, М. Ю. Сироткина<sup>1</sup>, Д. М. Дарвиш<sup>1</sup>, И. А. Барсук<sup>2</sup>,  
О. А. Москалюк<sup>3</sup>, Н. А. Михайлова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

<sup>2</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, 194044 Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна,  
Санкт-Петербург, 191186 Россия

\*E-mail: yuliya.shved@gmail.com

Поступила в редакцию 18.01.2021 г.

После доработки 28.02.2021 г.

Принята к публикации 01.03.2021 г.

Коллаген – один из важнейших белков внеклеточного матрикса. Благодаря своей высокой биосовместимости, он является привлекательным природным полимером и материалом для создания тканеинженерных матриц, в частности матриц, имитирующих строму роговицы глаза. В данной работе из тканей животных был экстрагирован и охарактеризован коллаген I типа, и на его основе сформированы коллагеновые пленки. С целью создания дополнительных ковалентных связей в пленках применяли сшивающий агент 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC/NHS). Исследовано влияние обработки EDC/NHS на механические свойства и деградацию пленок из коллагена I типа. Показано увеличение жесткости матриц и их устойчивости к биодegradации после обработки коллагена. Проведен анализ влияния обработки коллагена EDC/NHS на жизнеспособность и морфологию клеток роговицы линии SIRC. Показано, что обработка пленок сшивающим агентом повышает жизнеспособность клеток линии SIRC и не изменяет их морфологию.

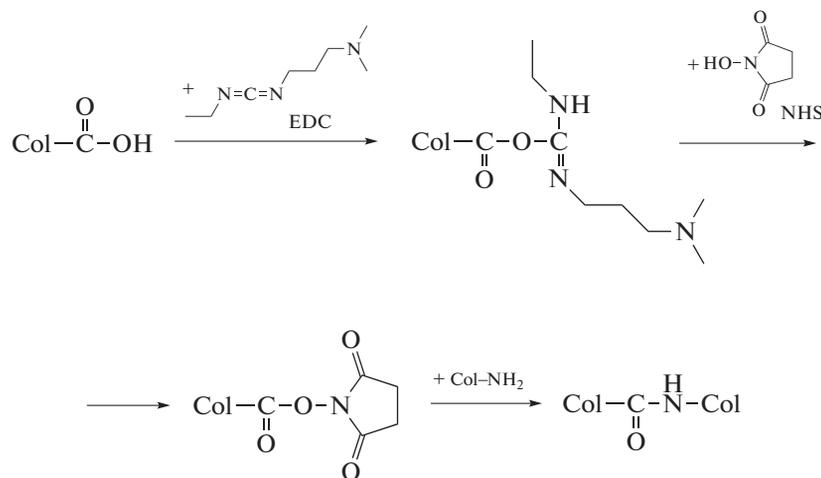
**Ключевые слова:** коллаген I типа, карбодиимид, клеточная линия SIRC, биодegradация, механические свойства коллагеновых пленок

**DOI:** 10.31857/S004137712103007X

Согласно данным ВОЗ, на 2017 г. в мире насчитывают около 36 млн людей, страдающих от слепоты. Поражения роговицы являются одной из основных причин слепоты. Заболевания роговицы имеют различную этиологию, но все они проявляются в разрушении структуры ткани. При серьезных осложнениях показана пересадка кадаверной (трупной) донорской роговицы – кератопластика (Bourges, 2017; Di Zazzo et al, 2017). Помимо ряда достоинств, кератопластика имеет существенные недостатки и, прежде всего, большую вероятность тканевой несовместимости трансплантата, несмотря на хорошую биосовместимость по отношению к органу зрительной си-

стемы – глазу. Также остро стоят вопросы дефицита и хранения донорского материала (Gain et al., 2016). Альтернативой донорской роговице может служить искусственный кератопротез и тканеинженерные конструкции, которые представляют собой пленку или матрицу, с выращенными на них клетками. Перспективным материалом для формирования такой пленки является белок внеклеточного матрикса – коллаген I типа. Коллаген – основной структурный белок внеклеточного матрикса, он составляет около 30% от всех белков тела человека. Молекула коллагена включает в себя три левозакрученных полипептидных α-цепи, которые в свою очередь образуют правозакрученную тройную спираль (Holmes et al., 2018). Коллаген в нативном виде обладает значительной прочностью и устойчивостью к биодegradации за счет многочисленных межмолекулярных ковалентных связей. Однако при обработке ферментами или кислотами во время экстракции коллагена из тканей нативные незрелые ковалентные связи разрываются, и в раствор выходит молекулярный коллаген. Коллагеновые матрицы, изготавливаемые из раствора коллагена, обладают низкими прочностными ха-

**Принятые сокращения:** ГА – глутаровый альдегид; ЛСК – лимбальные стволовые клетки; DMEM F-12 – питательная среда Игла в модификации Дюльбекко; питательная смесь F-12; EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид; MES – 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота; MTT – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид; NHS – N-гидроксисукцинимид; PBS – фосфатно-солевой буфер; SDS – додецилсульфат натрия; SIRC – клеточная линия из ткани роговицы кролика “Statens Seruminstitut Rabbit Cornea”.



**Рис. 1.** Схема реакции сшивания коллагена (Col) с помощью имидов.

EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид, NHS – N-гидроксисукцинимид.

рактическими и требуют обработки сшивающими агентами для образования дополнительных межмолекулярных связей. На сегодняшний день в литературе представлен достаточно широкий спектр различных способов сшивания молекул коллагена (Нащекина и др., 2020б). Все подобные методы условно можно разделить на два класса – физические и химические методы сшивания. К физическим методам относятся дегидротермальный и радиационный методы. Дегидротермальный метод заключается в нагревании образца до температуры свыше 90°C в глубоком вакууме для его обезвоживания. В результате образуются ковалентные связи между амидной и карбоксильной группами, а также между амидной и гидроксильной группами (Oliveira et al., 2019). Сшивание коллагена путем облучения матрицы ультрафиолетовым или рентгеновским излучением позволяет точно регулировать время и интенсивность воздействия, а также одновременно стерилизовать образец (Rýgllová et al., 2017).

Большинство химических сшивающих агентов можно подразделить на реагирующие с ε-аминогруппами коллагена и реагирующие с карбоксильными группами коллагена. К первой группе относятся эпоксиды, хиноны, формальдегид, глутаровый альдегид и изоционат, ко второй группе – карбодиимид и ацилазид (Paul et al., 2003; Rýgllová et al., 2017). Среди химических сшивающих агентов наибольшую популярность имеют глутаровый альдегид и карбодиимид.

Глутаровый альдегид (ГА) образует ковалентные сшивки между свободными первичными аминами лизина, иногда аргинина и карбоксильной группой глутаминовой кислоты. Реакция сшивания ГА с остатками лизина или гидроксилизина приводит к образованию промежуточного основания Шиффа, а дальнейшая реакция приводит к альдольной кон-

денсации, в результате чего образуются ГА-связи (Rýgllová et al., 2017; Нашекина и др., 2020a). Карбодиимиды относятся к типу сшивающих агентов, которые при образовании межмолекулярных связей не включаются в конечный продукт и образуют так называемые “связи нулевой длины”, из-за чего они имеют низкую цитотоксичность (Rýgllová et al., 2017). Наиболее часто используемым карбодиимидом является 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC) (Paul et al., 2003).

EDC активирует карбоксильную группу глутаминовой или аспарагиновой кислоты в полипептидной цепи, которые затем могут реагировать с аминогруппами лизина или гидроксилизина в других цепях, с образованием амидной связи. Добавление N-гидроксисукцинимид (NHS) снижает скорость гидролиза активированной группы и повышает эффективность реакции. Побочные продукты реакции (производные мочевины) проявляют определенную степень цитотоксичности, но они растворимы в воде и могут быть вымыты из конструкции после сшивания (Rose et al., 2014; Rýgllová et al., 2017; Oryan et al., 2018). Реакция сшивки с карбодиимидом представлена на рис. 1.

Несмотря на большое количество опубликованных данных по использованию карбодиимида для сшивания коллагена, все еще недостаточно информации о влиянии разных концентраций EDC на свойства коллагеновых пленок, обработанных этим сшивающим агентом. Также в литературе полностью отсутствуют данные по взаимодействию клеток роговицы с коллагеновыми пленками, сшитыми EDC. Целью настоящего исследования была оценка структурно-механических свойств коллагеновых пленок, обработанных раствором EDC разной концентрации, а также исследование цитосовместимо-

сти полученных пленок по отношению к клеткам роговицы линии SIRC.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Выделение коллагена I типа.** Коллаген I типа выделяли из сухожилий крысиных хвостов путем кислотной экстракции (Швед и др., 2007). Коллаген экстрагировали в 0.5 М растворе уксусной кислоты и осаждали NaCl, доведя концентрацию соли в растворе до 0.9 М. После проведения ряда диализов в уксусной кислоте и фосфатов натрия коллаген стерилизовали диализом против 0.5%-ного раствора хлороформа и снова диализовали против раствора уксусной кислоты. Чистоту выделенного белка подтверждали методом SDS-электрофореза.

**Приготовление коллагеновых пленок.** Из полученного раствора коллагена I типа с концентрацией 4.6 мг/мл методом полива формировали пленки. Пленки были высушены при температуре 37°C в течение 2 сут. Для изучения взаимодействия клеток с коллагеновой поверхностью пленки отливали на дно лунок 24 и 96-луночных плат.

**Сшивание коллагена в пленках.** Сшивающие агенты 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид (EDC) (Sigma-Aldrich, США) и N-гидроксисукцинимид (NHS) (Sigma-Aldrich, США) растворяли в 0.05 М 2-(N-морфолино) этансульфоновой кислоте (MES-буфере) (Sigma-Aldrich, США) при pH 5.5. Сшивающие агенты растворяли до конечной концентрации, соответствующей определенному мольному соотношению к количеству карбоксильных групп коллагена (их количество в коллагене составляет 1.2 мМ на 1 г коллагена). Мольное соотношение EDC, NHS и карбоксильных групп коллагена I типа представлено в табл. 1. Пленки, полученные из раствора коллагена I типа, инкубировали в растворе в течение 1 ч. Затем для удаления непрореагировавших веществ и побочных продуктов реакции пленки промывали 2 раза по 10 мин в растворе фосфатно-солевого буфера (PBS) и 2 раза по 10 мин в бидистилляте "Super-Q". Пленки стерилизовали под действием UV-излучения в течение 20 мин.

**Оценка механических свойств пленок.** Исследование механических свойств пленок проводили на установке INSTRON 1122 (Instron, США), при скорости растяжения 10 мм/мин. В процессе испытаний записывали диаграммы растяжения материалов, на основе которых определяли следующие величины: прочность ( $\sigma_p$ ), измеряемую в мегапаскалях (МПа); эластичность ( $\epsilon$ ) – относительное удлинение при разрыве в процентах (%); модуль упругости (E) в гигапаскалях (ГПа).

**Оценка биодegradации пленок под действием протеолитического фермента коллагеназы.** Бактериальную коллагеназу (Sigma-Aldrich, США) растворяли в буфере TES-Ca (50 мМ TES и 0.36 CaCl<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich, США) и добавляли к образцу в количестве 1 U

**Таблица 1.** Мольное соотношение EDC, NHS и карбоксильных групп коллагена I типа

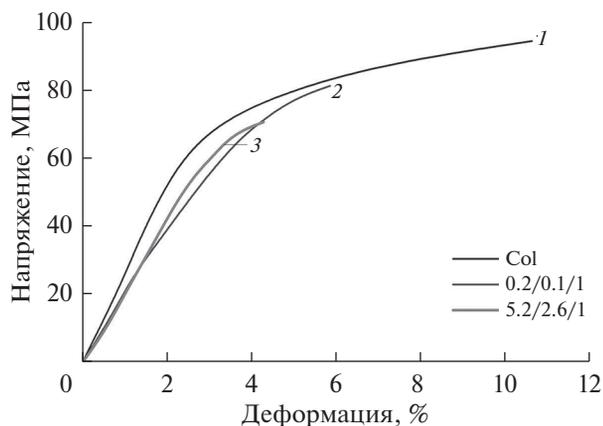
Сшивающий агент	Мольное соотношение	
EDC	0.2	5.2
NHS	0.1	2.6
COOH	1	1

на 1 мг коллагена. Затем образцы инкубировали в течение 1 ч при постоянном перемешивании и температуре 37°C. Биодegradацию пленок оценивали по количеству растворившегося коллагена методом определения оксипролина в растворе.

**Измерение оксипролина в растворе.** Оксипролин – одна из основных аминокислот коллагена, которая отсутствует в большинстве других белков. Измерение оксипролина в растворе позволяет определить количество коллагена в образце. Коллагеновые пленки до и после обработки коллагеназой гидролизуют в стеклянных ампулах в 6 М HCl при 120°C в течение 1 сут. Полученные гидролизаты высушивали в лиофилизаторе FreeZone (Labconco, Германия). Затем к сухим образцам добавляли 200 мкл воды и 1 мл реактива А (0.62 М хлорамин Т в растворе, содержащем 1 часть изопропанола, 1 часть H<sub>2</sub>O и 8 частей ацетатного-цитратного буфера (pH = 6.0)). Из полученного раствора отбирали по 1 мл смеси и инкубировали 20 мин при комнатной температуре. После этого добавляли 1 мл реагента Б (32.3 М 4-Диметиламинобензальдегид (ПДАБА) в растворе, содержащем 7 частей изопропанола и 3 части HClO<sub>4</sub> (60%)) и инкубировали 15 мин при температуре 65°C. Затем раствор охлаждали и фотометрировали на спектрофотометре ПЭ-5400УФ (Экротим, Россия) при длине волны 550 нм; сравнение проводили с контрольным образцом.

**Культивирование клеток линии SIRC.** Клетки роговицы кролика линии Seruminstitut Rabbit Cornea (SIRC) были предоставлены ЦКП "Коллекция культур клеток позвоночных" (Институт цитологии РАН). Клетки культивировали в среде DMEM-F12 (Биолот, Россия), содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки (HyClone, США), 0.4% гентамицина (Gibco, США) и 0.5% L-глутамина (Lonza, США) при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Для экспериментов клетки рассевали в лунки 96-луночных плат в количестве 700 и 6500 клеток на лунку, а также на стекла диаметром 11 мм в лунки 24-луночных плат в количестве 6500 клеток на лунку.

**Флуоресцентная микроскопия.** Клетки культивировали на пленках в течение 1 сут, после чего пленки с клетками промывали в PBS и фиксировали в 4%-



**Рис. 2.** Кривые растяжения образцов. Зависимость деформации растяжения от напряжения: *Кривая 1* – пленка на основе коллагена I типа (Col); *кривые 2 и 3* – пленки на основе Col, обработанные соответственно сшивающим агентом 0.2/0.1/1 и 5.2/2.6/1 (указано мольное соотношение EDC, NHS и карбоксильных групп (COOH) молекулы коллагена).

ном растворе формальдегида (Sigma-Aldrich, США) в течение 20 мин. Затем пленки обрабатывали 0.1%-ным раствором Тритон X-100 (Sigma-Aldrich, США). Окраску цитоскелета проводили путем обработки 8%-ным раствором родамин-фаллоидина (Invitrogen, США). Препараты фиксировали на предметном стекле, ядра клеток окрашивали DAPI с помощью заключающей среды Mounting Medium with DAPI (Abcam, США).

Организацию актинового цитоскелета анализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus FV3000 (Германия) и флуоресцентного микроскопа LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss AG, Германия).

**МТТ анализ.** Жизнеспособность клеток после 1 и 4 сут культивирования оценивали с помощью МТТ метода. После культивирования клеток линии SIRC в каждую лунку 96-луночной платы вносили 50 мкл раствора 3-(4,5-диметилтиазол 2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) (5 мг/мл) в среде DMEM-F-12 и клетки инкубировали еще 2 ч при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. По окончании инкубации среду с МТТ осторожно удаляли, и в каждую лунку добавляли 50 мкл DMSO (Биолот, Россия). Клетки в растворе ресуспендировали и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Показатели оптической плотности измеряли на спектрофотометре при длине волны 570 нм. Значение оптической плотности для контрольного образца принимали 100%.

**Статистическая обработка данных.** Для установления достоверности различий полученных данных использовали *t*-критерий Стьюдента. Данные представляли в виде средних значений ± SD (Standard Deviation, стандартное отклонение) ( $n = 3$  для исследования биодеградации,  $n = 5$  для МТТ-теста).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Коллаген I типа, выделенный из сухожилий крысиных хвостов, был охарактеризован методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле. Важным признаком структурной целостности выделенного коллагена является наличие на электрофореграмме определенного набора (5 и более) бандов, соответствующих описанным ранее в литературных источниках (Lillie et al., 1987; Rýgllová et al., 2013). Образец коллагена I типа содержит два банды (размером 120–140 кДа, в зависимости от источника коллагена), соответствующих мономерам двух  $\alpha$ -цепей ( $\alpha 1$  и  $\alpha 2$ ). Кроме того, в образце присутствуют димеры и тримеры  $\alpha$ -цепей, которые представлены в виде так называемых  $\beta$ - и  $\gamma$ -компонентов соответственно.

На основе выделенного коллагена формировали пленки. Далее пленки обрабатывали в растворе сшивающего агента. Количество сшивающего агента для эксперимента рассчитывали в мольном соотношении относительно карбоксильных групп коллагена (EDC/NHS/COOH). Нами были использованы концентрации компонентов в составе сшивающего агента близкие к использованным другими авторами (Duan, Sheardown 2007; Ahmad et al., 2015): EDC/NHS/COOH – 0.2/0.1/1 и 5.2/2.6/1.

На первом этапе было проанализировано влияние сшивающих агентов на механические свойства пленок. Пленки испытывали в режиме растяжения, результаты исследований представлены на рис. 2 и в табл. 2. Полученные результаты показывают, что эластичность сшитых пленок обратно пропорциональна концентрации сшивающего агента: наименее эластичными оказались пленки с высокой концентрацией EDC. В тоже время прочность и модуль упругости сшитых пленок несколько снижаются по сравнению с контрольными образцами. Это согласуется с данными, представленными в работах других авторов (Angele et al., 2004; Powell, Boyce 2006; Liu et al., 2018).

Исследование влияния сшивающих агентов на скорость деградации проводили путем обработки пленок бактериальной коллагеназой. Количество растворенного коллагена определяли по количеству оксипролина в пробе. Результаты представлены на рис. 3. Анализ показал значительное повышение устойчивости сшитых коллагеновых пленок к действию коллагеназы.

При формировании коллагеновых пленок для улучшения их механических характеристик мы использовали сшивающие агенты, которые могут оказывать токсическое влияние на культивируемые клетки. В связи с чем, важной характеристикой пленок, которую необходимо исследовать, является их цитотоксичность. Для выявления возможной цитотоксичности пленок, обработанных сшивающим агентом, мы оценивали жизнеспособность клеток с помощью МТТ теста. Для исследования была выбрана линия клеток SIRC роговицы кролика. Клет-

**Таблица 2.** Характеристика и параметры механических свойств пленок на основе коллагена I типа при растяжении\*

Образец	Ширина, мм	Толщина, мм	Прочность, МПа	Удлинение при разрыве, %	Модуль упругости, ГПа
Col 1	5	0.008	92 ± 9	10.3 ± 2	2.4 ± 0.4
0.2/0.1/1	3	0.012	83 ± 7	6.4 ± 2	2.3 ± 0.3
5.2/2.6/1	3	0.011	71 ± 9	4.3 ± 1	2.1 ± 0.5

\* Состав образцов указан в подписи к рис. 2

ки стандартной линии SIRC имеют преимущество по сравнению с первичными лимбальными стволовыми клетками (ЛСК), популяция которых гетерогенна; также свойства ЛСК зависят от возраста и состояния здоровья донора.

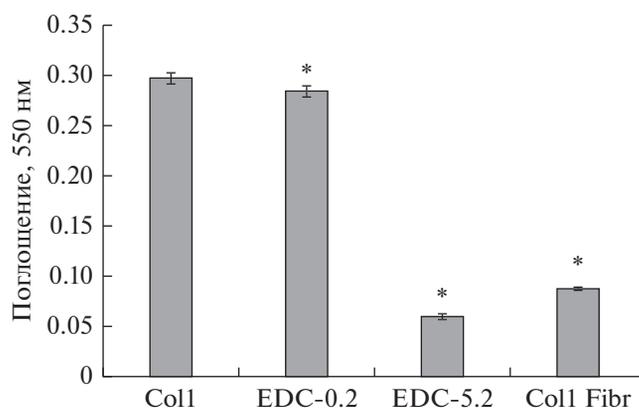
Жизнеспособность клеток, культивируемых на коллагеновых пленках, обработанных сшивающим агентом, исследовали в сравнении с контрольными образцами (покровное стекло и пленки, обработанные растворителем для сшивающего агента – MES). Так как EDC/NHS относится к сшивающим агентом “нулевой длины”, то есть реагент участвует в реакции сшивания молекул коллагена, но сам не встраивается в новообразованную связь, ожидается, что он не должен оказывать негативного эффекта на клетки. Полученные результаты подтверждают это предположение (рис. 4). Негативное влияние могут оказывать остатки сшивающего агента в случае недостаточного отмывания его после обработки пленок. Обработка сшивающим агентом не только не несет отрицательного эффекта, что свидетельствует о полном удалении остатков непрореагировавшего сшивающего агента, но и оказывает достоверное положительное влияние на жизнеспособность клеток после 1 сут культивирования в случае обработки пленок сшивающим агентом в меньшей концентрации. Данная тенденция (в пределах погрешности) наблюдается и при использовании более высокой концентрации сшивающего агента. К тому же было показано достоверное положительное влияние сшитых пленок на жизнеспособность клеток после 4 сут культивирования. Увеличение количества жизнеспособных клеток линии SIRC на сшитых пленках через 1 и 4 сут после посева, вероятно, связана не с химическими, а с механическими свойствами пленки. Сравнительно недавно было показано, что жесткость матриц прямо пропорционально влияет на распластанность, адгезию и пролиферацию культивируемых клеток (Wong et al., 2004).

Морфологию клеток и организацию их актинового цитоскелета оценивали с помощью световой и флуоресцентной микроскопии. Результаты представлены на рис. 5. Было продемонстрировано, что

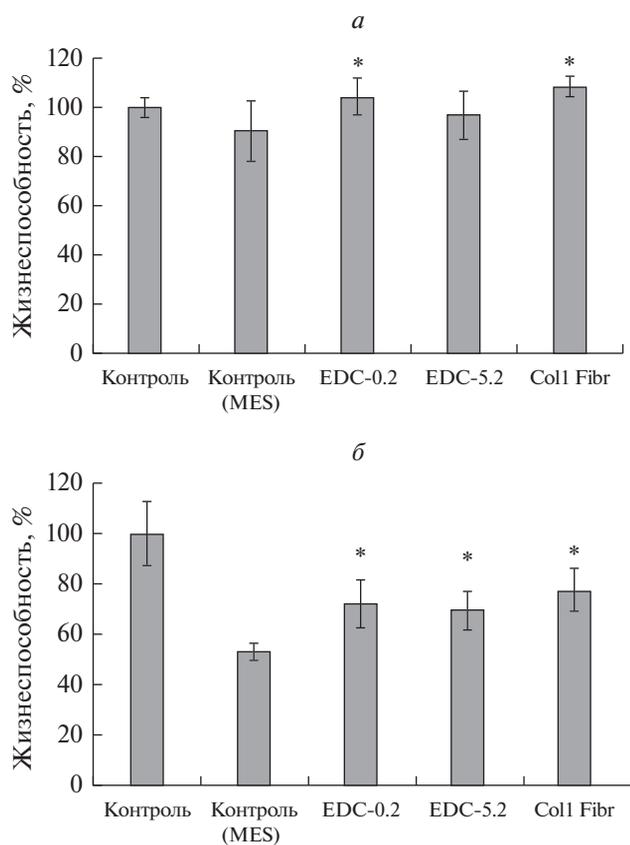
клетки, растущие на обработанных сшивающим агентом пленках, являются намного более распластанными по сравнению с контролем. В контрольных образцах (стекло) клетки имеют округлую форму, собраны в агрегаты, цитоскелет имеет неорганизованную структуру. На коллагеновых пленках, не обработанных или обработанных растворителем MES, большинство клеток имеют округлую форму, единичные клетки распластаны. На сшитых пленках большее количество клеток находятся в распластанном состоянии. В клетках наблюдается хорошо организованный цитоскелет, ядра несколько увеличены.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Коллаген широко используется в тканевой инженерии, этот белок имеет ряд преимуществ по сравнению с другими синтетическими и природными материалами, поскольку обладает высокой биосовместимостью.



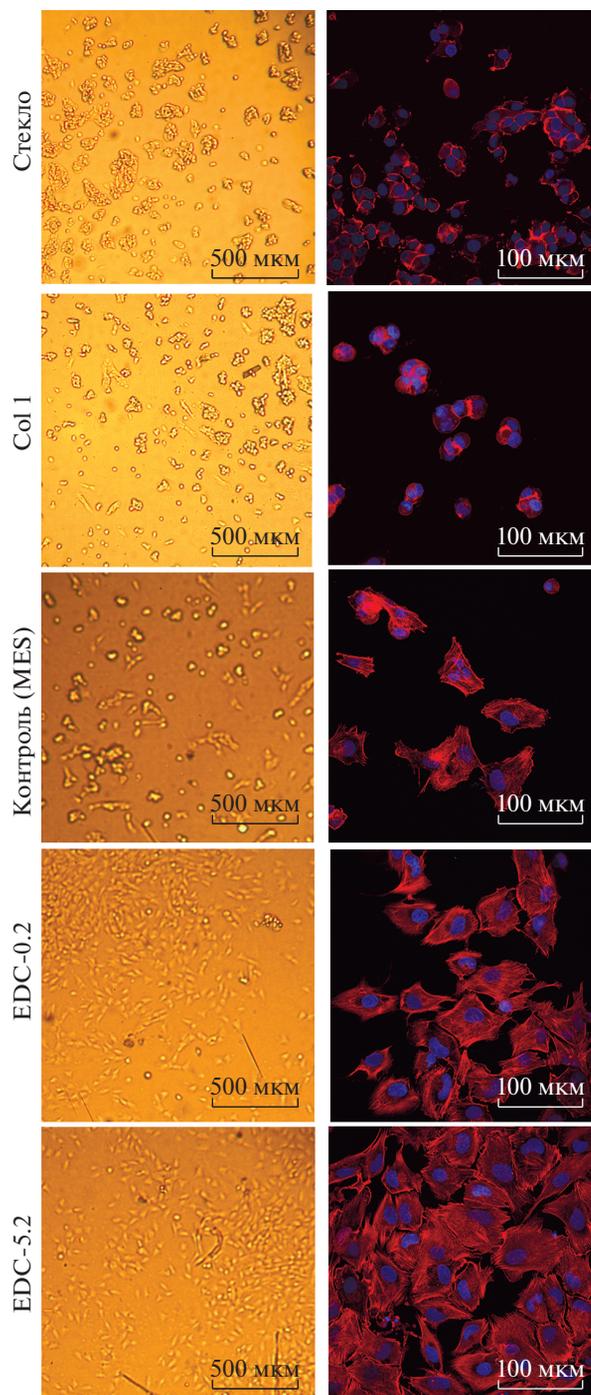
**Рис. 3.** Диаграмма, иллюстрирующая характер деградации коллагеновых пленок под действием коллагеназы. Col – пленка на основе коллагена I типа, EDC-0.2 и EDC-5.2 пленки, обработанные раствором с соотношением компонентов сшивающего агента к карбоксильным группам коллагена (EDC/NHS/COOH) 0.2/0.1/1 и 5.2/2.6/1 соответственно. Звездочкой отмечены статистически достоверные отличия от контроля ( $p \leq 0.05$ ).



**Рис. 4.** Жизнеспособность клеток линии SIRC, культивируемых на шитых коллагеновых пленках в течение 1 сут (*а*) и 4 сут (*б*). На диаграмме представлены относительные значения данных, полученных в МТТ-тесте; за 100% был принята оптическая плотность контроля. Контроль – клетки на культуральном пластике, контроль (MES) – клетки на пленках на основе коллагена I типа, обработанных растворителем для сшивающего агента (MES-буфером), EDC-0.2 и EDC-5.2 – клетки на пленках, обработанных раствором с соотношением компонентов сшивающего агента к карбоксильным группам коллагена (EDC/NHS/COOH) 0.2/0.1/1 и 5.2/2.6/1 соответственно. Звездочкой отмечены статистически достоверные отличия от контроля ( $p \leq 0.05$ ).

мостью и присутствует в подавляющем большинстве тканей животных и человека.

Кислотная экстракция позволяет получить коллаген I типа близкий к его нативной структуре. Нативный коллаген, в отличие от сформированных коллагеновых пленок, имеет незрелые и зрелые ковалентные связи. При кислой экстракции коллагена разрушаются незрелые альдиминовые ковалентные связи, а также электростатические и гидрофобные связи в фибриллах. В раствор выходит молекулярный коллаген. Поэтому необработанные пленки, полученные из раствора коллагена, имеют нестабильные механические свойства и большую скорость биodeградации по сравнению с нативным коллагеном.



**Рис. 5.** Морфология и структура актинового цитоскелета клеток линии SIRC в разных условиях культивирования. Стекло – контрольные клетки на покровном стекле, контроль (MES) – клетки на пленках на основе коллагена I типа, обработанных растворителем для сшивающего агента (MES-буфером), EDC-0.2 и EDC-5.2 – клетки на пленках, обработанных раствором с соотношением компонентов сшивающего агента к карбоксильным группам коллагена (EDC/NHS/COOH) 0.2/0.1/1 и 5.2/2.6/1 соответственно. Левая панель – световая микроскопия, ув. об. 8×, правая панель – конфокальная микроскопия, ув. об. 40×. Красный цвет – актиновые микрофиламенты, окраска родамин-фаллоидином; синий цвет – ядра клеток, окраска DAPI.

Для улучшения механических свойств и снижения скорости биodeградации, пленки на основе молекулярного коллагена I типа обрабатывали раствором сшивающего агента EDC/NHS. Данный сшивающий агент — один из наиболее распространенных и часто используемых химических сшивающих агентов в тканевой инженерии. EDC/NHS имеет важное преимущество, поскольку он не высвобождается в процессе биodeградации пленок, так как реагент не встраивается в конечную цепь, образуя так называемые “связи нулевой длины”.

При испытании механических свойств коллагеновых пленок было показано, что эластичность пленок снижается при увеличении концентрации сшивающего агента. Снижение эластичности можно объяснить увеличением числа ковалентных связей, препятствующих перегруппировке структурных элементов в процессе деформирования. Такие результаты согласуются с литературными данными. Так, например, было показано (Powell, Boyce, 2006), что эластичность матриц уменьшается с увеличением количества сшивающего агента, а прочность и модуль упругости при этом имеют нелинейную зависимость от этого параметра. Однако встречаются работы, в которых получены противоречащие нашим результатам данные: увеличение эластичности коллагеновых матриц и снижение прочности и модуля упругости с увеличением количества сшивающего агента (Liu et al., 2008). Подобный эффект, вероятно, связан с влажностью исследуемых матриц. Даже незначительное количество воды в пленках существенно влияет на их механические свойства (Angele et al., 2004).

Результаты наших исследований показали значительное увеличение устойчивости к биodeградации сшитых пленок. Увеличение ковалентных и нековалентных внутри- и межмолекулярных связей коллагена повышает устойчивость пленок к действию матриксных металлопротеаз, в частности коллагеназы. Эти результаты хорошо согласуются с данными о значительном повышении биостабильности пленок, обработанных сшивающим агентом EDC/NHS (Angele et al., 2004; Powell, Boyce, 2006).

Для исследования возможности применения полученных пленок коллагена для решения задач офтальмологии мы культивировали на них клетки роговицы кролика линии SIRC. Клетки линии SIRC относятся к самоиммортизировавшимся линиям клеток. Обычно данную линию применяют для первичного скрининга токсичности и проницаемости глазных капель (Rönkkö et al., 2016). При использовании сшитых коллагеновых пленок регистрировали достоверное увеличение жизнеспособности клеток в случае использования сшивающего агента в малой концентрации как через 1 сут, так и через 4 сут после посева (в случае обработки пленок сшивающим агентом в большей концентрации наблюдали тенденцию к увеличению жизнеспособности через 1 сут после посева). Было показано увеличение рас-

пластанности клеток на пленках, обработанных сшивающим агентом. Эти результаты хорошо согласуются с данными других авторов (Wong et al., 2004) о том, что распластанность клеток, показатели их адгезии и пролиферации обратно пропорциональны эластичности матриц. Отсутствие отрицательного эффекта обработки пленок сшивающим агентом на жизнеспособность клеток также подтверждается в других исследованиях (Wang et al., 2017). Из литературы известно о положительном влиянии обработки пленок EDC/NHS на пролиферативную активность клеток по сравнению с контролем (Powell, Boyce, 2006; Zhao et al., 2015).

Полученные данные позволяют сделать заключение, что коллагеновые пленки, обработанные раствором EDC/NHS, могут быть перспективным материалом для изготовления тканеинженерных конструкций и использоваться для кератопластики при восстановлении роговицы.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работы по механическим испытаниям и исследованию взаимодействия клеток с пленками выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-03-00400\_a). Разработка метода приготовления пленок выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках темы государственного задания № 0103-2019-0012.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При проведении исследования были соблюдены все применимые международные и национальные принципы использования лабораторных животных.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Нащекина Ю.А., Луконина О.А., Дарвиш Д.М., Нащекин А.В., Елоховский В.Ю., Юдин В.Е., Михайлова Н.А. 2020а. Биологические и реологические свойства коллагена, сшитого глутаровым альдегидом. Журн. техн. физики. Т. 9. С. 601. (Nashchekina Yu.A., Lukonina O.A., Darvish D.M., Nashchekin A.V., Elokhovskii V.Yu., Yudin V.E., Mikhailova N.A. 2020. Biological and rheological properties of collagen cross-linked with glutaraldehyde. Tech. Phys. V. 65. P. 1535.)
- Нащекина Ю.А., Луконина О.А., Михайлова Н.А. 2020а. Химические сшивающие агенты для коллагена: механизмы взаимодействия и перспективность применения в регенеративной медицине. Цитология. Т. 62. № 7. С. 459. (Nashchekina Yu.A., Lukonina O.A., Mikhailova N.A. Chemical cross-linking agents for collagen: Interaction mechanisms and perspectives for regenerative medicine. Tsitologiya. V. 62. № 7. P. 459.)

- Швед Ю.А., Кухарева Л.В., Зорин И.М., Билибин А.Ю., Блинова М.И., Пинаев Г.П. 2007. Взаимодействие культивируемых клеток кожи с разными структурными формами коллагена, нанесенного на полилактидную матрицу. Цитология. Т. 49. № 1. С. 32. (Shved Yu.A., Kukhareva L.B., Zorin I.M., Bilibin A.Yu., Blinova M.I., Pinaev G.P. 2007. Interaction of cultured skin cells with the polylactide matrix covered with different collagen structural isoforms. Cell Tiss. Biol. V. 1. P. 89.)
- Ahmad Z., Shepherd J.H., Shepherd D.V., Ghose S., Kew S.J., Cameron R.E., Best S.M., Brooks R.A., Wardale J., Rushton N. 2015. Effect of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide and N-hydroxysuccinimide concentrations on the mechanical and biological characteristics of cross-linked collagen fibres for tendon repair. Reg. Biomaterials. V. 2. P. 77.
- Angele P., Abke J., Kujat R., Faltermeier H., Schumann D., Nerlich M., Kinner B., Englert C., Ruzszzak Z., Mehrl R., Mueller R. 2004. Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. Biomaterials. V. 25. P. 2831.
- Bourges J.L. 2017. Corneal dystrophies. J. Fr. Ophthalmol. V. 40. P. e177.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfo.2017.05.003>
- Duan X., Sheardown H. 2007. Incorporation of cell-adhesion peptides into collagen scaffolds promotes corneal epithelial stratification. J. Biom. Sci. Pol. Ed. V. 18. P. 701.
- Gain P., Jullienne R., He Z., Aldossary M., Acquart S., Cognasse F., Thuret G. 2016. Global survey of corneal transplantation and eye banking. JAMA Ophthalmol. V. 134. P. 167.
- Holmes D.F., Lu Y., Starborg T., Kadler K.E. 2018. Collagen fibril assembly and function. Curr. Top Dev. Biol. V. 130. P. 107.
- Lillie J.H., Wootton J.A., MacCallum D.K., McKelvey S.W., Minor R.R. 1987. Electrophoretic isolation and peptide mapping of collagen types from microsamples of tissue. Methods in Enzym. V. 145. P. 171.
- Liu W., Merrett K., Griffith M., Fagerholm P., Dravida S., Heyne B., Scaiano J. C., Watsky, M. A., Shinozaki N., Lagali N., Mungler R., Li F. 2008. Recombinant human collagen for tissue engineered corneal substitutes. Biomaterials. V. 29. P. 1147.
- Oliveira P.N., Montebault, A., Sudre G., Alcouffe P., Marcon L., Gehan H., Lux F., Albespy K., Centis V., Campos D., Roques S., Meulle M., Renard M., Durand M., Denost Q. et al. 2019. Self-crosslinked fibrous collagen/chitosan blends: Processing, properties evaluation and monitoring of degradation by bi-fluorescence imaging. Int. J. Biol. Macromol. V. 131. P. 353.
- Oryan A., Kamali A., Moshiri A., Baharvand H., Daemi H. 2018. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. Int. J. Biol. Macromol. V. 107. P. 678.
- Paul R.G., Bailey A.J. 2003. Chemical stabilisation of collagen as a biomimetic. Sci. World J. V. 3. P. 138.
- Powell H. M., Boyce S.T. 2006. EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability. Biomaterials. V. 27. P. 5821.
- Rönkkö S., Vellonen K.S., Järvinen K., Toropainen E., Urtti A. 2016. Human corneal cell culture models for drug toxicity studies. Drug Deliv. Transl. Res. V. 6. P. 660.
- Rose J.B., Pacelli S., Haj A.J., El Dua H.S., Hopkinson A., White J.L., Rose F. 2014. Gelatin-based materials in ocular tissue engineering. Materials. V. 7. P. 3106.
- Rýglóvá Š., Braun M., Suchý T. 2017. Collagen and its modifications – crucial aspects with concern to its processing and analysis. Macrom. Mat. Eng. V. 302. P. e.1600460.  
<https://doi.org/10.1002/mame.201600460>
- Wang Y., Wang X., Shang J., Liu H., Yuan Y., Guo Y., Huang B., Zhou Y. 2017. Repairing the ruptured annular fibrous by using type I collagen combined with citric acid, EDC and NHS: an *in vivo* study. Europ. Spine J. V. 2. P. 884.
- Wong J.Y., Leach J.B., Brown X.Q. 2004. Balance of chemistry, topography, and mechanics at the cell–biomaterial interface: Issues and challenges for assessing the role of substrate mechanics on cell response. Surf. Sci. V. 570. P. 119.
- Di Zazzo A., Kheirkhah A., Abud T.B., Goyal S., Dana R. 2017. Management of high-risk corneal transplantation. Surv. Ophthalmol. V. 62. P. 816.
- Zhao X., Liu Y., Li W., Long K., Wang L., Liu S., Wang Y., Ren L. 2015. Collagen based film with well epithelial and stromal regeneration as corneal repair materials: Improving mechanical property by crosslinking with citric acid. Mat. Sci. Eng. V. 55. P. 201.

## Effect of Carbodiimide on the Structural, Mechanical and Biological Properties of Collagen Films

Yu. A. Nashchekina<sup>a,\*</sup>, M. Yu. Sirotkina<sup>a</sup>, D. M. Darvish<sup>a</sup>, I. A. Barsuk<sup>b</sup>,  
O. A. Moskalyuk<sup>c</sup>, and N. A. Mikhailova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia

<sup>b</sup>Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, 194044 Russia

<sup>c</sup>Saint Petersburg State University of Industrial Technologies and Design, St. Petersburg, 191186 Russia

\*e-mail: yuliya.shved@gmail.com

Collagen is one of the most important proteins in the extracellular matrix. Due to its high biocompatibility, it is an attractive natural polymer and material for the creation of tissue-engineered matrices, in particular matrices that mimic the stroma of the cornea of the eye. In this work, type I collagen was extracted and characterized from animal tissues, and collagen films were formed on its basis. In order to create additional covalent bonds in the films, the

crosslinking agent 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide and N-Hydroxysuccinimide (EDC/NHS) were used. The effect of EDC/NHS treatment on the mechanical properties and degradation of type I collagen films was investigated. An increase in the stiffness of matrices and their resistance to biodegradation after collagen processing has been shown. An analysis of the effect of collagen processing with EDC/NHS on viability and morphology of SIRC corneal cells was carried out. It was shown that the treatment of films with a cross-linking agent increases the viability of SIRC cells and does not have a negative effect on their morphology.

**Keywords:** type I collagen, carbodiimide, SIRC cell line, biodegradation, mechanical properties

УДК 57.085.1;57.085.23

## РЕКОНСТРУКЦИЯ СОСУДОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КЛЕТОЧНОЙ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА

© 2021 г. Н. М. Юдинцева<sup>1, \*</sup>, Ю. А. Нащекина<sup>1</sup>, М. А. Шевцов<sup>1, 2</sup>, В. Б. Карпович<sup>2</sup>, Г. И. Попов<sup>2</sup>,  
И. А. Самусенко<sup>3</sup>, Н. А. Михайлова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

<sup>2</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,  
Санкт-Петербург, 197022 Россия

<sup>3</sup>Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России,  
Санкт-Петербург, 197082 Россия

\*E-mail: yudintceva@mail.ru

Поступила в редакцию 21.01.2021 г.

После доработки 04.02.2021 г.

Принята к публикации 05.02.2021 г.

Поликапролактон (ПКЛ) широко применяется для конструирования сосудистых трансплантатов малого диаметра благодаря своим биомеханическим свойствам, медленной скорости деградации, а также хорошей биосовместимости. В настоящей работе тестировали тканеинженерную конструкцию (ТИК) на основе трубчатой матрицы, заселенной гладкомышечными (ГМ) клетками аорты, на модели замещения брюшной аорты крысы. Полиэфирные трубчатые матрицы получали методом термического разделения фаз и заселяли ГМ-клетками. Чтобы проследить дальнейшую судьбу ГМ-клеток, использовали суперпарамагнитные наночастицы оксида железа, которые являются эффективным маркером имплантированных клеток для их долгосрочной визуализации. Гистологическую оценку миграции аутологичных эндотелиальных клеток и образования эндотелиальной оболочки проводили через 4, 8 и 12 нед. после введения трансплантата. Миграция эндотелия в просвет имплантированной конструкции с последующим образованием клеточного монослоя была выявлена через 4 нед. Помеченные наночастицами ГМ-клетки были обнаружены на всем протяжении ТИК, что свидетельствовало о роле этих клеток в эндотелизации ТИК. В конце 12-недельного периода наблюдения архитектура неоинтимы и неоадвентиции имела большое сходство с таковыми у нативного сосуда. Сравнение с бесклеточной конструкцией показало лучшую проходимость клеточной ТИК без возникновения каких-либо осложнений и хорошие биоинтегративные свойства.

**Ключевые слова:** гладкомышечные и эндотелиальные клетки, поликапролактон, сосуд малого диаметра, суперпарамагнитные наночастицы оксида железа, тканеинженерная конструкция, трубчатая матрица

**DOI:** 10.31857/S0041377121030111

Шунтирование является основным подходом к лечению сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с облитерацией кровеносных сосудов. Однако недостаток аутологичных сосудов пациентов (вен или артерий) из-за повторных операций или сопутствующей патологии (атеросклероза) приводит к необходимости развития тканеинженерных сосудистых трансплантатов. Создание клинически применимых сосудов малого диаметра (менее 6 мм) в качестве альтернативы аутологичным венозным или

артериальным сосудистым заменителям в настоящее время является предметом интенсивных исследований в области трансляционной медицины (Li et al., 2014; Xu et al., 2017). Несмотря на большое количество исследований, до сих пор нет выводов о клинической пригодности сосудистых тканеинженерных конструкций (ТИК). Для обеспечения структурной целостности и долгосрочной проходимости идеальный сосудистый трансплантат должен обладать антитромботической поверхностью, устойчивостью к образованию аневризмы и иметь низкий риск осложнений, таких как гиперплазия интимы или кальцификация.

За последние десятилетия были разработаны различные биологические сосудистые трансплантаты

**Принятые сокращения:** ГМ – гладкомышечные клетки; ПКЛ – поликапролактон; ЭК – эндотелиальные клетки; СЭМ – сканирующая электронная микроскопия; ТИК – тканеинженерная конструкция; ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия.

на основе децеллюлированных тканей (Hibino et al., 2015; Negishi et al., 2017), фиброина шелка (Catto et al., 2015), гидрогелей (Aussel et al., 2017), внеклеточного матрикса, синтезированного клетками (Rosellini et al., 2010). Различная степень успеха у применяемых конструкций частично определяется химическими и механическими свойствами материала (Pashneh-Tala et al., 2015). В настоящее время для приготовления сосудистых ТИК широко используют биodeградируемые синтетические полимеры (de Valence et al., 2012; Aussel et al., 2017). Полимеры играют решающую роль в технологии тканевой инженерии, поскольку представляют собой наиболее подходящий материал для применения в сердечно-сосудистой хирургии, главным образом, благодаря их свойствам и практическим преимуществам (простота изготовления, удобство имплантации, хранения и т.д.). Кроме того, скорость деградации полимера можно регулировать путем изменения множества факторов, включая молекулярную массу, отношение площади поверхности к объему и др. По сравнению с биологическими материалами синтетические полимеры демонстрируют улучшенные биомеханические свойства, которые делают их хорошими кандидатами на размещение трансплантата в сосудах с высоким артериальным давлением.

Поликапролактон (ПКЛ) является одним из наиболее перспективных кандидатов при разработке сосудистых ТИК благодаря таким свойствам как биосовместимость, медленная скорость деградации и превосходные биомеханические свойства (Fukunishi et al., 2016). Важную роль при разработке ТИК играют технологии изготовления трубчатых матриц. Наиболее часто используемые методы включают электроспиннинг, выщелачивание порогенов или биопринтинг (Noch et al., 2014). К сожалению, применение синтетических материалов в сосудистой хирургии часто приводит к возникновению различных осложнений, включая тромбоз, гиперплазию интимы и кальцификацию трансплантата (Mel et al., 2008; Mehta et al., 2011).

Одной из стратегий, позволяющих избежать возникновения подобных осложнений, является заселение биodeградируемых синтетических материалов клетками сосудов двух основных типов: эндотелиальными клетками и (или) гладкомышечными (ГМ). Эндотелий обладает плейотропным эффектом и играет важную роль в регуляции гомеостаза и проходимости кровеносных сосудов (Dharmashankar et al., 2010; Wilson et al., 2014). Неполная эндотелизация ТИК, особенно в случае регенерации кровеносных сосудов малого диаметра, приводит к тромбозу, протеканию швов, псевдоаневризмам и т.д. (Stowell, Wang, 2018; Zhao et al., 2018). Известно, что на образование эндотелиальной оболочки значительное влияние оказывает рельеф матрицы. Для того, чтобы модулировать образование эндотелиального монослоя, предпринимались многочисленные попытки образования гребней и канавок на поверхностях

матриц (Wang et al., 2019) или изменения жесткости волокон (Stekelenburg et al., 2008; Bingcheng et al., 2020). Однако эффективного и быстрого решения проблемы эндотелизации ТИК пока не достигнуто.

Другими клетками, играющими важную роль в регуляции тонуса сосуда и диаметра просвета, являются ГМ-клетки. Показано, что низкая способность ГМ-клеток заселять трансплантат, а также снижение эффективности синтеза коллагена и эластина, приводят к образованию нарушений в стенке сосуда, ухудшению параметров вазомоторности и эластичности, а также к длительным осложнениям, связанным с трансплантатом (de Valence et al., 2012). Сосудистые ТИК, заселенные аутологичными эндотелиальными клетками, безусловно являются предпочтительными, так как не вызывают иммунных реакций хозяина. Однако получение и культивирование аутологичных эндотелиальных клеток имеет ряд ограничений, включая болезненность забора биопсии, длительный период масштабирования клеток, а также снижение их жизнеспособности, что в значительной степени связано с возрастом пациента и сопутствующими заболеваниями. Для заселения трансплантата можно использовать аллогенные эндотелиальные клетки, однако это связано с повышенным риском их отторжения (Radke, et al., 2018).

В настоящей работе реконструировали брюшную аорту крысы, используя трубчатую матрицу на основе ПКЛ, заселенную аллогенными ГМ-клетками аорты крысы. Мы предположили, что после внесения ТИК, заселенной ГМ-клетками, клетки эндотелия хозяина будут активно мигрировать из прилегающей части нативной аорты и образовывать клеточный монослой во внутреннем просвете каркаса, что позволит улучшить биосовместимость трансплантата. Для отслеживания последующей судьбы ГМ-клеток в условиях *in vivo* их метили суперпарамагнитными наночастицами оксида железа. В течение 12-недельного периода наблюдения с помощью методов гистологии оценивали характер реконструкции сосудов и наличие осложнений. Было показано, что внутренний просвет сосудистых ТИК полностью покрывался эндотелиальными клетками, а помеченные наночастицами ГМ-клетки присутствовали на всем протяжении формируемого нео-сосуда.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Животные.** В работе использовали самцов крыс Вистар, полученных из питомника Рапполово РАМН (Санкт-Петербург, Россия). Исследования проводили согласно ГОСТ 33216-2014 “Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами” и Протокола № 1-208 от 21 марта 2018 этического комитета Первого государственного медицинского университета им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия). Всех животных лечили в соответствии с руководящими принципами Федерации европейской лабораторной научной ассоциации.

**Выделение ГМ-клеток аорты крысы.** Клетки выделяли из брюшной аорты крыс ( $n = 6$ ), используя метод ферментативной обработки (Song et al., 2009). ГМ-клетки культивировали в среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей 10% эмбриональной сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина (Cargisorn, Германия). Смену питательной среды выполняли два раза в неделю. После достижения клетками 80–90% конфлуентности выполняли пересев посредством обработки культуры 0.25%-ным раствором трипсин–ЭДТА (Gibco, США). В экспериментах использовали клетки 4–6 пассажей.

**Интернализация наночастиц ГМ-клетками.** Суперпарамагнитные наночастицы оксида железа ( $Fe_3O_4$ ) с размерами менее 50 нм были покрыты декстраном для повышения биосовместимости и снижения агрегации. Клетки, достигшие состояния монослоя, культивировали в среде DMEM, содержащей 10% фетальной сыворотки и гентамицин, в присутствии суперпарамагнитных наночастиц (150 мкг/мл) в течение 24 ч в условиях  $CO_2$ -инкубатора. После инкубации среду меняли на свежую. Клетки трижды отмывали от неинтернализированных наночастиц раствором PBS и оценивали жизнеспособность с помощью окраски трипановым синим (0.4%; Биолот, Россия). Дополнительно с помощью МТТ-теста анализировали цитотоксичность наночастиц, используя набор Vybrant® МТТ в соответствии с протоколом производителя (Life Technologies, США).

**Приготовление и модификация трубчатой матрицы на основе поликапролактона (ПКЛ).** На первой стадии готовили матрицу из расплавленного сахара. Матрица имела форму стержня диаметром 1.1 мм и длиной 60 мм. Сахарный стержень последовательно покрывали тремя слоями раствора полимера ПКЛ (мол. масса 80000; Sigma-Aldrich, США), растворенного в хлороформе в концентрации 2%. После полного выпаривания растворителя воздействием воздуха в течение 24 ч трубчатую матрицу промывали дистиллированной водой для удаления кристаллов сахара, а затем стерилизовали с помощью газообразного озона в режиме 200 ppm в течение 120 мин при относительной влажности 80%. Для усиления прикрепления клеток матрицу выдерживали в растворе фибриногена (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 0.1 мг/мл при 4°C в течение ночи. Для анализа параметров и архитектуры образцы матрицы использовали сканирующую электронную микроскопию (СЭМ) (FE-SEM; JEOL, Япония). Механические свойства образцов определяли с помощью универсальной испытательной машины (Instron, США).

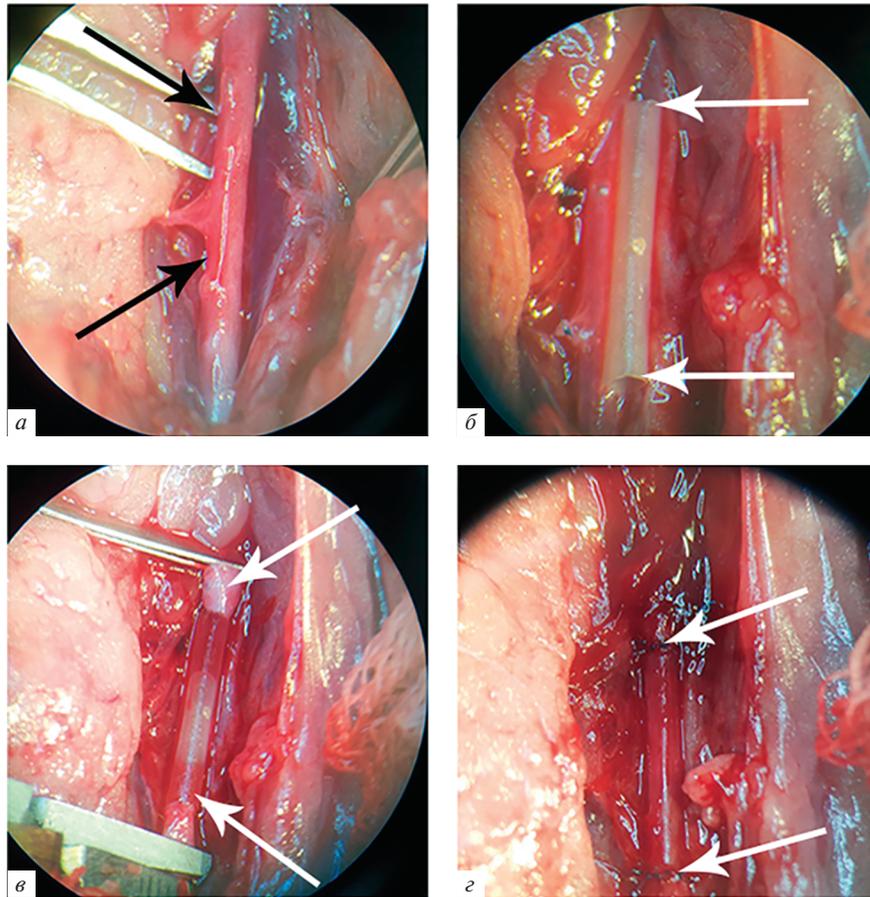
**Заселение ГМ-клетками трубчатой матрицы на основе ПКЛ.** Суспензию клеток (20 мкл) в концентрации  $10^6$  кл./мл вводили микропипеткой в просвет трубчатой матрицы. Заселенную клетками матрицу вращали каждые 30 мин в течение 4 ч для равномерного распределения клеток по всей внутренней поверхности. Затем добавляли среду DMEM, содержа-

щую 10% фетальной сыворотки и гентамицин, до полного погружения матрицы и культивировали при температуре 37°C и 5%  $CO_2$ . Питательную среду меняли два раза в неделю. Характер распределения клеток оценивали с помощью конфокальной микроскопии (Olympus FV3000, Япония) через 3 сут и 3 нед. культивирования образцов.

**Иммунофлуоресцентный анализ.** ГМ-клетки в слайд-флаконах (IBIDI, Германия), а также образцы трубчатых матриц, заселенные ГМ-клетками, трижды промывали раствором PBS и фиксировали раствором 10%-ного нейтрального формалина (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин. Затем образцы трубчатых матриц, заселенных ГМ-клетками, помещали в реактив Tissue-Tek (Sakura, Япония) и хранили при  $-80^\circ C$ . В дальнейшем с помощью криотома из них готовили срезы толщиной 10–15 мкм. Для пермеабиллизации клеточной мембраны вносили 0.1%-ный раствор Тритона X100 (Sigma-Aldrich, США) на 15 мин. Затем трижды отмывали и инкубировали в растворе 0.2%-ного бычьего сывороточного альбумин в течение 1 ч для блокировки сайтов неспецифического связывания.

В качестве первичных антител использовали антитела против альфа-ГМ-актина (anti-alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA); Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 250. Инкубацию клеток и криосрезов с антителами проводили в течение ночи при температуре 4°C. В качестве вторичных антител использовали Rabbit Anti-Mouse IgG FITC-labeled (Sigma-Aldrich, США) в разведении 1 : 500. Инкубирование выполняли в течение 45 мин при комнатной температуре в темноте. После трехкратной отмывки препаратов раствором PBS для окраски ядер на 10 мин вносили краситель DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Thermo Fisher Scientific, США), затем отмывали раствором PBS и заключали в среду Mounting medium (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве отрицательного контроля использовали клетки, окрашенные только вторичными антителами. Для выявления иммунофлуоресценции и детекции ядер использовали диодный лазер с длиной волны соответственно 488 и 405 нм. Для анализа внутриклеточной локализации магнитных наночастиц применяли сканирование отраженным лазером (504 нм). В работе был использован конфокальный микроскоп (Olympus FV3000, Япония) с использованием конфокальной системы Olympus IX83 microscope (Olympus Corporation, Япония).

**Операция по реконструкции брюшной аорты.** Животных делили на две группы ( $n = 6$ ): экспериментальная группа получала ТИК, заселенную ГМ-клетками; контрольная группа – бесклеточную ТИК. При операционных манипуляциях применяли ингаляционную анестезию, состоящую из 3%-ного изофлурана (Laboratorios Karizoo, Испания). Проводили Y-образную лапаротомию и мобилизацию инфраренальной части брюшной аорты (рис. 1а). Для рекон-



**Рис. 1.** Модель замещения брюшной аорты крысы. *а* – Мобилизация инфраренальной части брюшной аорты крысы (аорта показана черными стрелками); *б* – ТИК (белые стрелки) длиной 6 мм; *в* – замена аорты с использованием ТИК; *г* – ТИК, заполненная кровью.

струкции использовали ТИК длиной 6 мм (рис. 1б). После мобилизации брюшной аорты от левой почечной вены и сперматической артерии бесклеточную ТИК или ТИК, заселенную ГМ-клетками, вшивали 12-узловыми швами, используя шовный материал (нейлон 9/0) (рис. 1в, г). Проприодимость ТИК оценивали по классической методике сразу и через 30 мин после имплантации (Acland, 1972). Антикоагулянты в послеоперационном периоде не применяли. Животные получали свободный доступ к воде и стандартную диету. Кроме того, все животные получили послеоперационную профилактику антибиотиками (энрофлоксацин, 5 мг/кг; Laboratorios Kargizo, Испания) в течение 7 сут.

**Гистологический анализ.** На сроках 4, 8 и 12 нед. животных выводили из эксперимента и фиксировали реконструированные сосуды в 10%-ном формалине в течение 24 ч. Далее материал проходил стандартную обработку в изопропиловом спирте и парафине для приготовления гистологических и гистохимических препаратов с толщиной серийных

парафиновых срезов 3–5 мкм. Для микроскопического исследования срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Все образцы проанализировали на инфильтрацию лимфоцитами, гистиоцитами, эпителиоидными и гигантскими многоядерными клетками. Кроме того, срезы окрашивали антителами против  $\alpha$ -SMA (Diagnostic BioSystems, США). После инкубации при комнатной температуре в течение 30 мин с последующим несколькими промывками PBS проводили окрашивание ядер с использованием гематоксилина Майера. Затем для визуализации  $\alpha$ -SMA применяли систему детекции мышь/кролик UnoVue™ HRP/DAB (Diagnostic BioSystems, США) в соответствии с протоколом производителя. Морфологическое исследование гистологических препаратов и препаратов, окрашенных гистохимическим методом, проводили при помощи светооптического микроскопа (Leica DM LS, Германия). Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры (Leica DC320, Германия). В качестве

**Таблица 1.** Механические свойства трубчатой матрицы на основе ПКЛ

Образец	Толщина стенки, мкм	Прочность на разрыв, МПа	Модуль Юнга, МПа	Растяжение, %
ПКЛ матрица	100	23 ± 2.36 <sup>a</sup>	226 ± 8.1 <sup>a</sup>	800 ± 66 <sup>a</sup>
Нативная аорта	150	2.27 ± 0.56	17.3 ± 5.1	139 ± 32

Отличия от контрольной группы (нативная аорта крысы) достоверны (<sup>a</sup>) при  $P \leq 0.05$  ( $t$ -критерий Стьюдента).

контроля использовали нативную аорту интактных животных.

**Приготовление криосрезов.** Для обнаружения клеток, помеченных наночастицами, образцы реконструированных сосудов помещали в Tissue-Tek (Sakura, Япония) и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Срезы (толщиной 5–7 мкм), полученные из этих блоков, помещали на предметные стекла Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific, США) и анализировали с помощью конфокальной микроскопии. Дополнительно срезы окрашивали, используя первичные антитела, специфические для ГМ-клеток (против  $\alpha$ -SMA; Abcam, США) в разведении 1 : 100. В качестве вторичных антител использовали Rabbit Anti-Mouse FITC-labeled antibody (Sigma-Aldrich, США) в разведении 1 : 500. Срезы дополнительно окрашивали DAPI и монтировали в среде Mounting medium. Флуоресцентные изображения получали с использованием конфокальной системы (Olympus FV3000, Япония). Иммунофлуоресценцию и ядра, а также локализацию магнитных наночастиц детектировали так же, как и при иммунофлуоресцентном анализе (см. выше).

**Статистический анализ.** Данные по оценке механических свойств трубчатых матриц, а также полученные гистологические показатели обрабатывали статистически методами вариационной статистики при помощи программы Microsoft Excel с определением показателей среднего значения ( $M$ ), ошибки среднего ( $m$ ), достоверности различий между группами сравнения с вычислением критерия Стьюдента ( $t$ ), уровня значимости ( $\alpha$ ), доверительного интервала ( $p$ ). Различия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

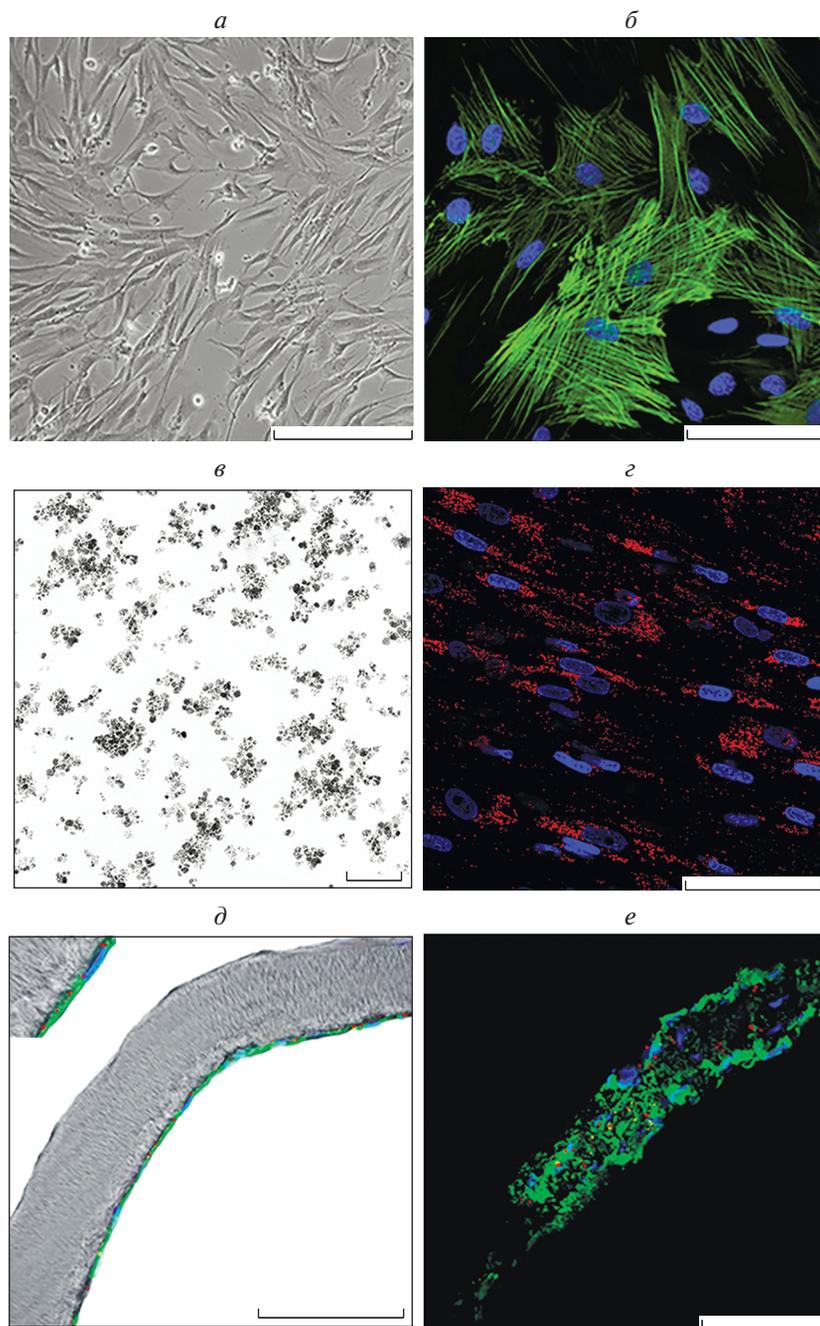
Выделенные из аорты крысы ГМ-клетки представляли собой однородную популяцию с биполярной веретенообразной морфологией (рис. 2а) и окрашивались антителами против  $\alpha$ -SMA (рис. 2б). Используемые суперпарамагнитные наночастицы оксида железа в соответствии с данными ТЭМ имели размеры менее 50 нм (рис. 2в). Культивирование ГМ-клеток с наночастицами в течение 24 ч приводило к высокому уровню их интернализации. Поглощенные наночастицы располагались в цитоплазме клеток, окружая ядро, но не проникая в него (рис. 2г). Цито-

токсического влияния наночастиц на ГМ-клетки после совместного культивирования в течение 24 ч не отмечено (данные не приводятся). Отсутствие цитотоксического действия на клетки наночастиц в используемом режиме подтверждено и в нашей более ранней работе, в которой суперпарамагнитные наночастицы оксида железа применяли как в качестве метки, введенной в стволовые клетки (Yudintceva et al., 2018), так и для диагностических целей (Shevtsov et al., 2015). При оценке характера распределения ГМ-клеток, заселенных в трубчатые матрицы, было показано, что через 3 сут культивирования ГМ-клетки, помеченные наночастицами, образовывали монослой на внутренней поверхности (рис. 2д), а через 3 нед. распределялись по всей толще и на всем протяжении матрицы (рис. 2е).

Согласно данным СЭМ, внутренний диаметр трубчатой матрицы из ПКЛ (рис. 3а) составлял 1.1 мм (рис. 3б), а толщина стенки – 100 мкм (рис. 3в). ГМ-клетки, заселенные вовнутрь трубчатой матрицы, имели нормальную морфологию (рис. 3г).

Для бесклеточных трубчатых матриц на основе ПКЛ и нативных образцов аорты крыс определяли модуль упругости (модуль Юнга), предел прочности и деформацию при растяжении. Значения механических свойств у матрицы из ПКЛ (прочность на разрыв, растяжение и модуль Юнга) были существенно выше, чем у нативной аорты, несмотря на меньшую толщину ее стенки (табл. 1).

Гистологический анализ реконструированных сосудов выявил наличие в контрольной группе (применение бесклеточной ТИК) раннего ( $\leq 24$  ч) тромбоза ТИК у пяти из шести животных. Одно из животных в этой группе выжило до конца периода наблюдения, однако последующая оценка (после 12 нед.) подтвердила поздний тромбоз ТИК с rekanализованным тромбом, припаянным к стенке в просвете аорты (рис. 4). В экспериментальной группе, получившей ТИК, заселенные ГМ-клетками, никаких осложнений не обнаружено. На всех сроках наблюдения сосудистые ТИК, заселенные клетками, оставались проходимыми, патологического влияния (воспаления, кровоизлияния) на окружающие ткани выявлено не было. Неинтима аорты была представлена в виде волокнистой соединительной ткани с



**Рис. 2.** ГМ-клетки аорты. *а* – Морфологическая картина ГМ-клеток аорты в монослое, световая микроскопия. *б* – Иммунофлуоресценция клеток (зеленый цвет), окрашенных на  $\alpha$ -SMA с использованием специфических антител; ядра окрашены DAPI (синий цвет). *в* – Наночастицы (ТЭМ). *г* – Интернализация наночастиц клетками (красный цвет). *д, е* – ГМ-клетки (окрашенные на  $\alpha$ -SMA и DAPI), заселенные в трубчатые матрицы, через 3 сут и 3 нед. соответственно. *б, г, д, е* – Конфокальная микроскопия. Масштабная линейка: 200 (*а, б*), 100 (*е–е*) мкм.

внутренней эластичной мембраной, покрытой эндотелием. Признаков гиперплазии неоинтимы также не выявлено (рис. 4). В качестве дополнительного контроля использовали аорту интактного животного (рис. 4).

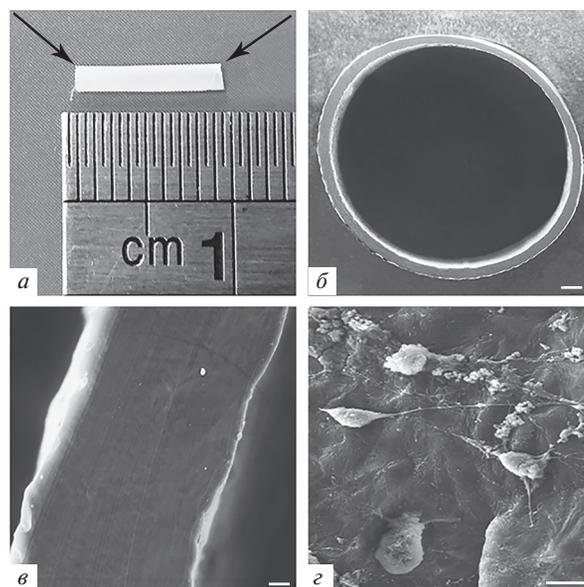
С помощью иммуногистохимического анализа была показана тенденция к постепенному упорядочиванию гладкомышечных волокон в стенке реконструированных сосудов от раннего (4 нед.) к позднему (12 нед.) сроку имплантации ТИК по сравнению

с контрольным бесклеточным нео-сосудом (рис. 4). Наличие материала ТИК в адвентиции со слабой воспалительной инфильтрацией одиночными гистиоцитами, эпителиоидными клетками и гигантскими многоядерными клетками подтверждалось визуально. Последующий анализ с помощью конфокальной микроскопии продемонстрировал, что после 12-недельного периода присутствие клеток, помеченных наночастицами и дополнительно окрашенных на  $\alpha$ -SMA, выявляется в толще и на всем протяжении ТИК (рис. 4).

Полиэстер является широко используемым синтетическим материалом для реконструкции сосудов малого калибра благодаря его превосходной биосовместимости и подходящей механической прочности (Gao, 2016; Bouchet et al., 2019). Известно, что максимальный модуль упругости составляет приблизительно 130 МПа для вен и 17 МПа для артерий человека (Donovan et al., 1990; Porter et al., 1993), а прочность на разрыв у вен составляет около 6.5 МПа, у артерий это значение несколько ниже (Stegemann et al., 2007). Значения прочности и устойчивости к деформации приготовленной трубчатой матрицы на основе ПКЛ были значительно выше, чем у нативных кровеносных сосудов, что указывает на возможность ее применения в качестве биорезорбируемого сосудистого трансплантата (табл. 1). Однако у разработанных *in vitro* сосудистых трансплантатов малого диаметра на основе биодеградируемых полимеров после имплантации часто возникают различные осложнения (стеноз, гиперплазия интимы, кальцификации трансплантата и т.д.).

Долгосрочная проходимость ТИК малого диаметра продолжает оставаться одной из главных проблем в области исследований сердечно-сосудистой ткани из-за возникновения тромбоза. Один из подходов к снижению тромбогенности синтетических материалов, хотя и с ограниченным успехом, основан на покрытии просветной поверхности каркаса антикоагулянтами (Devine et al., 2001; Ren et al., 2015). Другой стратегией повышения биосовместимости трансплантата и снижения риска осложнений является заселение трансплантата клетками сосуда (Cui et al., 2019; Generali et al., 2019). Многообещающим источником клеток, благодаря простоте выделения, культивирования, а также их способности индуцировать эндотелиализацию (Arias et al., 2018; Hassan et al., 2018) являются ГМ-клетки сосудов.

Представленное исследование продемонстрировало возможность применения аллогенных ГМ-клеток, заселенных в трубчатую матрицу на основе ПКЛ, индуцировать миграцию аутологичного эндотелия в условиях *in vivo*. Данные гистологического анализа подтвердили, что просвет ТИК, заселенной ГМ-клетками, был полностью покрыт монослоем эндотелия уже через 4 нед. после операции, а также биоинтеграцию и хорошую проходимость по сравнению с бесклеточной (рис. 4). Можно предпола-

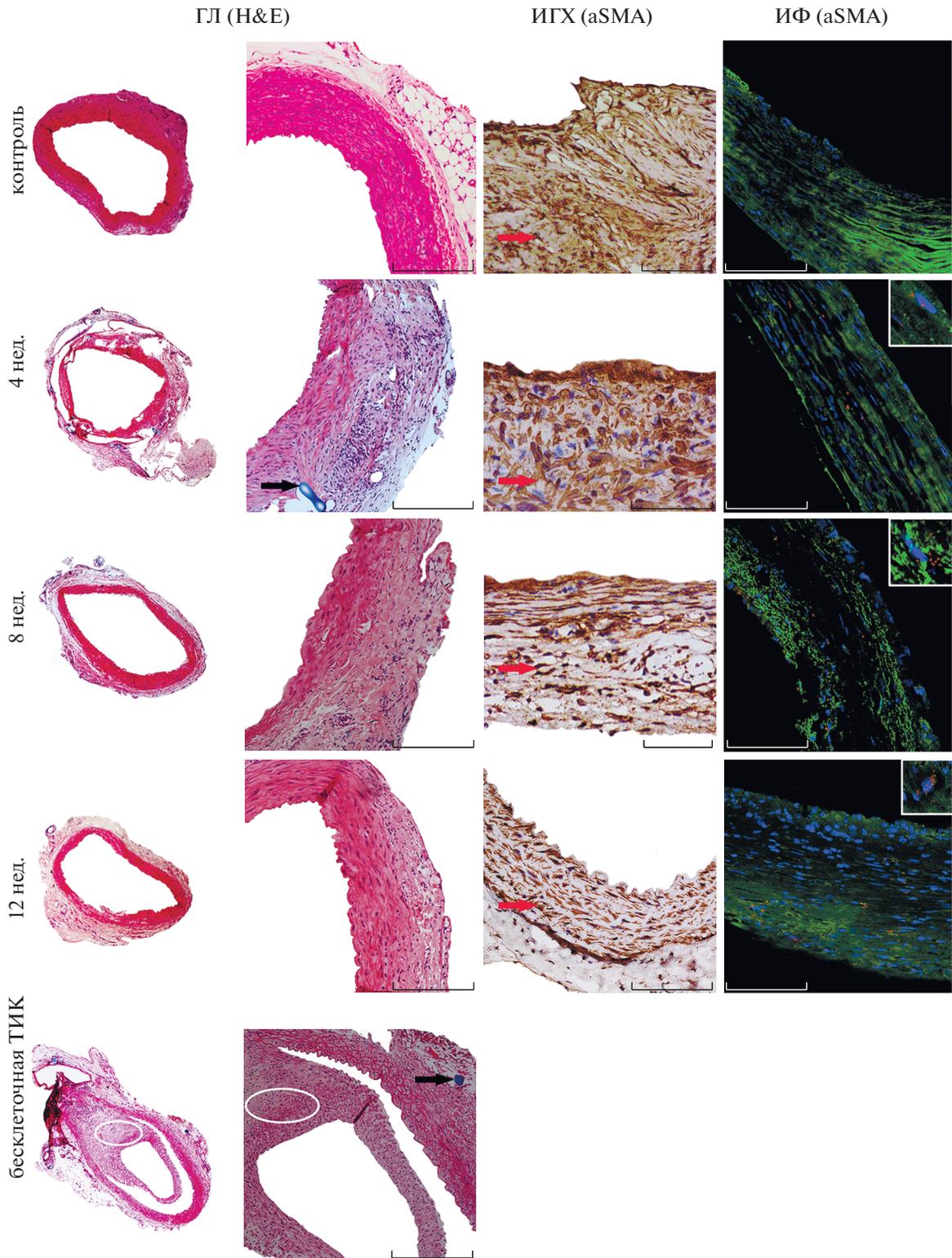


**Рис. 3.** Трубчатая матрица на основе ПКЛ. *a* – Внешний вид и параметры матрицы. *б, в* – Поперечный и продольный срезы матрицы соответственно. *г* – ГМ-клетки на внутренней поверхности матрицы. СЭМ. Масштабная линейка: 10 мкм.

гать, что миграция аутологичных клеток эндотелия в раннем послеоперационном периоде предотвращает образование тромбоза в ТИК (рис. 4). Ранее в нескольких исследованиях сообщалось об антикоагулянтных свойствах эндотелиальных клеток, которые способствуют регуляции гемостаза (van Hinsbergh et al., 2012; Yau et al., 2015).

Полученные биомеханические свойства заселенной клетками ПКЛ-матрицы можно сравнить с результатами, полученными в исследованиях, в которых ГМ-клетки использовали для заселения децелюляризованного (Neff et al., 2011) или синтетического (Cheng et al., 2008) скаффолда. Скорость резорбции ПКЛ-матрицы не превышала скорости пролиферации клеток внутри нее в течение периода наблюдения, что позволяет предположить возможное использование этой матрицы для генерации нео-сосудов с хорошей долгосрочной проходимость. Интересно, что помеченные наночастицами ГМ-клетки обнаруживали на протяжении всей ТИК в течение анализируемого периода длительностью 12 нед. (рис. 4), что может указывать на участие этих клеток в формировании стенок нео-сосудов, а также в индуцировании миграции эндотелия по внутреннему просвету трансплантата.

Полученные данные свидетельствуют о возможности использовать аллогенные ГМ-клетки сосуда для конструирования сосудистых ТИК и демонстрируют успешное использование клеточной ТИК,



**Рис. 4.** Гистологическое (ГЛ), иммуногистохимическое (ИГХ) и иммунофлуоресцентное (ИФ) детектирование сосудов, реконструированных с помощью ТИК, через 4, 8 и 12 нед. после введения трансплантата. Интактная брюшная аорта крысы служила контролем. Черные стрелки на ГЛ-препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином (H&E), указывают на материал ПКЛ матрицы. Красные стрелки (ИГХ) указывают на ГМ-клетки, положительно окрашенные на  $\alpha$ -SMA (коричневый цвет). ИФ: меченные наночастицами ГМ-клетки (красный цвет) и окрашенные на  $\alpha$ -SMA с помощью специфических антител (зеленый цвет) в реконструированной стенке сосуда; вставки – фотоувеличение (10 $\times$ ) части изображения. Область тромбоза сосуда с использованием бесклеточной ТИК выделена эллипсом (ГЛ).

приготовленной на основе биodeградируемого полиэфирного полимера ПКЛ.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-08-00024; получение суперпарамагнитных наночастиц оксида железа, оценка *in vitro* цитотоксических свойств наносuspензии с применением ГМ-клеток), а также в рамках Государственного задания ФГБУН Института цитологии РАН (№ 0103-2019-0012; эксперименты *in vivo* по эффективности применения ТИК в реконструкции аорты у животных).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проводили согласно ГОСТ 33216-2014 “Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами” и Протокола № 1-208 от 21 марта 2018 г. этического комитета Первого государственного медицинского университета им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия). Всех животных лечили в соответствии с руководящими принципами Федерации европейской лабораторной научной ассоциации.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Acland R. 1972. Signs of patency in small vessel anastomosis. *Surgery*. V. 72. P. 744.
- Arias S.L., Shetty A., Devorkin J., Allain J.P. 2018. Magnetic targeting of smooth muscle cells in vitro using a magnetic bacterial cellulose to improve cell retention in tissue-engineering vascular grafts. *Acta Biomater*. V. 77. P. 172.
- Aussel N.B., Thebaud X., Berard V., Brizzi V., Delmond S., Barreille R., Siadous R., James C., Ripoche J., Durand M., Montebault A., Burdin B., Letourneur D., Heureux N.L., David L., Bordenave L. 2017. Chitosan-based hydrogels for developing a small-diameter vascular graft: in vitro and in vivo evaluation. *Biomed. Mater*. V. 12. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa78d0>
- Bingcheng Y., Yanbing S., Tang H., Wang X., Zhang Y. 2020. Stiffness of the aligned fibers affects structural and functional integrity of the oriented endothelial cells. *Acta Biomater*. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.03.022>
- Bouchet M., Gauthier M., Maire M., Aji A., Lerouge S. 2019. Towards compliant small-diameter vascular grafts: predictive analytical model and experiments. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl*. V. 100. P. 715.
- Catto V., Fare S., Cattaneo I., Figliuzzi M., Alessandrino A., Freddi G., Remuzzi A., Tanzi, M.C. 2015. Small diameter electrospun silk fibroin vascular grafts: Mechanical properties, in vitro biodegradability, and in vivo biocompatibility. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl*. V. 54. P. 101.
- Cheng S.T., Chen Z.F., Chen G.Q. 2008. The expression of cross-linked elastin by rabbit blood vessel smooth muscle cells cultured in polyhydroxyalkanoate scaffolds. *Biomaterials*. V. 29(31). P. 4187–4194.
- Cui H., Zhu W., Huang Y., Liu C., Yu Z., Nowick, M., Miao S., Cheng Y., Zhou X., Lee S., Zhou Y., Wang S., Mohiuddin M., Horvath K., Zhang L.G. 2019. In vitro and in vivo evaluation of 3D bioprinted small-diameter vasculature with smooth muscle and endothelium. *Biofabrication*. V. 12. <https://dx.doi.org/10.1088%2F1758-5090%2F12020202>
- De Valence S., Tille J.-Ch., Mugnai D., Mrowczynski W., Gurny R., Moller M., Walpoth B.H. 2012. Long term performance of polycaprolactone vascular grafts in a rat abdominal aorta replacement model. *Biomaterials*. V. 33. P. 38.
- Devine C., Hons B., McCollum C. 2001. Heparin-bonded dacron or polytetrafluoroethylene for femoropopliteal bypass grafting: A multicenter trial. *J. Vasc. Surg*. V. 33. P. 533.
- Dharmashankar K., Widlansky M.E. 2010. Vascular endothelial function and hypertension: Insights and directions. *Cur. Hypertens. Rep*. V. 12. P. 448.
- Donovan D.L., Schmidt S.P., Townshend S.P., Njus G.O., Sharp W.V. 1990. Material and structural characterization of human saphenous vein. *J. Vas. Surg*. V. 12. P. 531.
- Fukunishi T., Best C.A., Sugiura T., Shoji T., Yi T., Udelsman B., Hibino N. 2016. Tissue-engineered small diameter arterial vascular grafts from cell-free nanofiber pcl/chitosan scaffolds in a sheep model. *PLoS One*. V. 11. P. e0158555. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158555>
- Gao C. 2016. Polymeric biomaterials for tissue regeneration. From surface/interface design 3D constructs. <https://www.springer.com/gp/book/9789811022920>
- Generali M., Casanova E.A., Kehl D., Wanner D., Hoerstrup S.P., Cinelli P., Weber B. 2019. Autologous endothelialized small-caliber vascular grafts engineered from blood-derived induced pluripotent stem cells. *Acta Biomater*. V. 97. P. 333.
- Hassan G.S., Jacques D., D'Orleans-Juste P., Magder S., Bkaily G. 2018. Physical contact between human vascular endothelial and smooth muscle cells modulates cytosolic and nuclear calcium homeostasis. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. V. 96. P. 655.
- Hibino N., McConnell P., Shinoka T., Malik M., Galantowicz M. 2015. Preliminary experience in the use of an extracellular matrix (CorMatrix) as a tube graft: Word of caution. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg*. V. 27. P. 288.
- Hoch E., Tovar G.E., Borchers K. 2014. Bioprinting of artificial blood vessels: Current approaches towards a demanding goal. *Eur. J. Cardiothorac. Surg*. V. 46. P. 767.
- Li S., Sengupta D., Chien S. 2014. Vascular tissue engineering: from in vitro to in situ. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med*. V. 6. P. 61.
- Mehta R.I., Mukherjee A.K., Patterson T.D., Fishbein M.C. 2011. Pathology of explanted polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Cardiovasc. Pathol*. V. 20. P. 213.
- Mel A., Jell G., Stevens M.M., Seifalian A.M. 2008. Biofunctionalization of biomaterials for accelerated in situ endothelialization: A review. *Biomacromolecules*. V. 9. P. 2969.

- Neff L.P., Tillman B.W., Yazdani S.K., Machingal M.A., Yoo J.J., Soker S., Christ G.J. 2011. Vascular smooth muscle enhances functionality of tissue-engineered blood vessels in vivo. *J. Vasc. Surg.* V. 53. P. 426.
- Negishi J., Hashimoto Y., Yamashita A., Zhang Y., Kimura T., Kishida A., Funamoto S. 2017. Evaluation of small-diameter vascular grafts reconstructed from decellularized aorta sheets. *J. Biomed. Mater. Res. A.* V. 105. P. 1293.
- Pashneh-Tala S., MacNeil S., Claeysens F. 2015. The tissue-engineered vascular graft—past, present, and future. *Tissue Eng. Part B. Rev.* V. 22. P. 68.
- Porter T.R., Taylor D.O., Fields J., Cysan A., Akosah K., Mohanty P.K., Pandian N.G. 1993. Direct in vivo evaluation of pulmonary arterial pathology in chronic congestive heart failure with catheter-based intravascular ultrasound imaging. *Am. J. Cardiol.* V. 71. P. 754.
- Radke D., Jia W., Sharma D., Fena K., Wang G., Goldman J., Zhao F. 2018. Tissue engineering at the blood-contacting surface: a review of challenges and strategies in vascular graft development. *Adv. Healthcare Mater.* <https://doi.org/10.1002/adhm.201701461>
- Ren X., Feng Y., Guo J., Wang H., Li Q., Yang J., Li W. 2015. Correction: Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chem. Soc. Rev.* V. 44. P. 5745.
- Rosellini E., Vozzi G., Barbani N., Giusti P., Cristallini C. 2010. Three-dimensional microfabricated scaffolds with cardiac extracellular matrix-like architecture. *Int. J. Artif. Organs.* V. 33. P. 885.
- Shevtsov M.A., Nikolaev B.P., Ryzhov V.A., Yakovleva L.Y., Dobrodumov A.V., Marchenko Y.Y., Guzhova I.V. 2015. Brain tumor magnetic targeting and biodistribution of superparamagnetic iron oxide nanoparticles linked with 70-kDa heat shock protein study by nonlinear longitudinal response. *J. Magn. Magn. Mater.* V. 388. P. 123.
- Song H.J., Xue W.J., Li Y., Tian X.H., Song Y., Ding X.M., Li Z.L. 2009. Improved islet survival and function with rat endothelial cells in vitro co-culture. *Transpl. P.* V. 41. P. 4302.
- Stegemann J.P., Kaszuba S.N., Rowe S.L. 2007. Review: Advances in vascular tissue engineering using protein-based biomaterials. *Tissue Eng.* V. 13. P. 2601.
- Stekelenburg M., Rutten MC, Snoeckx H.E.H., Baaijens F.P. 2008. Dynamic straining combined with fibrin gel cell seeding improves strength of tissue-engineered small-diameter vascular grafts. *Tissue Eng. Part A.* V. 15. P. 1081.
- Stowell C.E.T., Wang Y. 2018. Quickening: Translational design of resorbable synthetic vascular grafts. *Biomaterials.* V. 173. P. 71.
- Van Hinsbergh V.W. 2012. Endothelium—role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin. Immunopathol.* V. 34. P. 93.
- Wang W., Xu X., Li Z., Kratz K., Ma N., Lendlein A. 2019. Modulating human mesenchymal stem cells using poly(n-butyl acrylate) networks in vitro with elasticity matching human arteries. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* V. 71. P. 277.
- Wilson H.K., Canfield S.G., Shusta E.V., Palecek S.P. 2014. Concise review: Tissue-specific microvascular endothelial cells derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cells.* V. 32. P. 3037.
- Xu S., Lu F., Cheng L., Li C., Zhou X., Wu Y., Qi Z. 2017. Preparation and characterization of small-diameter decellularized scaffolds for vascular tissue engineering in an animal model. *Biomed. Eng. Online.* V. 16. <https://doi.org/10.1186/s12938-017-0344-9>
- Yau J.W., Teoh H., Verma S. 2015. Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovasc. Disord.* V. 15. P. 130.
- Yudintceva N.M., Bogolubova I.O., Muraviov A.N., Sheykhov M.G., Vinogradova T.I., Sokolovich E.G., Shevtsov M.A. 2018. Application of the allogenic mesenchymal stem cells in the therapy of the bladder tuberculosis. *J. Tiss. Eng. Regen. Med.* V. 12. P. e1580. <https://doi.org/10.1002/term.2583>
- Zhao Q., Cui H., Wang J., Chen H., Wang Y., Zhanget L., Wang M. 2018. Regulation effects of biomimetic hybrid scaffolds on vascular endothelium remodeling of biomimetic hybrid scaffolds on vascular endothelium Remodeling. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* V. 10. P. 23583.

## Small-Diameter Vessels Reconstruction Using Cell Tissue-Engineering Graft Based on the Poly(E-Caprolactone)

N. M. Yudintceva<sup>a,\*</sup>, Yu. A. Nashchekina<sup>a</sup>, M. A. Shevtsov<sup>a,b</sup>, V. B. Karpovich<sup>b</sup>, G.I. Popov<sup>b</sup>, I. A. Samusenko<sup>c</sup>, and N. A. Mikhailova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Cytology Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia

<sup>b</sup>First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, St. Petersburg, 197022 Russia

<sup>c</sup>Federal State Budgetary Institute “The Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine” (Ministry of Russian Federation for Civil Defense, Emergencies and Elimination of Consequences of Natural Disasters), St. Petersburg, 197082 Russia

\*e-mail: yudintceva@mail.ru

Poly(ε-caprolactone) (PCL) is widely applied for the construction of small-diameter tissue-engineered vascular grafts (TEVGs) due to its biomechanical properties, slow degradation, and good biocompatibility. In the present study the TEVG based on a tubular scaffold seeded with smooth muscle aortic cells (SMCs) in a rat abdominal aorta replacement model was tested. Polyester tubular scaffolds were generated by thermally induced phase separation and seeded with rat SMCs. To track the implanted SMCs *in vivo*, cells were labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs). Histological evaluation of the migration of autologous endothelial cells (ECs) and forma-

tion of the endothelial lining was performed 4, 8, and 12 weeks after graft interposition. TEVG demonstrated a high patency rate without any complications at the end of the 12-week period. The migration of ECs into the lumen of the implanted TEVG and formation of the cell monolayer were already present at 4 weeks, as confirmed by histological analysis. The architecture of both neointima and neoadventitia were similar to those of the native vessel. SPION-labeled SMCs were detected throughout the TEVG, indicating the role of these cells in the endothelization of scaffolds. The SMC-seeded scaffolds demonstrated improved patency and biointegrative properties when compared to the acellular grafts.

**Keywords:** smooth muscle and endothelial cells, polycaprolactone, tubular scaffold, small diameter vessel, superparamagnetic iron oxide nanoparticles, tissue engineering graft

## ЛОКАЛЬНЫЙ МЕХАНОЗАВИСИМЫЙ ВХОД КАЛЬЦИЯ КОНТРОЛИРУЕТ АКТИВНОСТЬ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ ВЫСОКОЙ И НИЗКОЙ ПРОВОДИМОСТИ В КЛЕТКАХ ЛИМФОМЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2021 г. В. Ю. Васильева<sup>1</sup>, В. И. Чубинский-Надеждин<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

\*E-mail: vchubinskiy@gmail.com

Поступила в редакцию 20.02.2021 г.

После доработки 03.03.2021 г.

Принята к публикации 05.03.2021 г.

Лимфома Беркитта является агрессивной и быстрорастущей формой не-Ходжкинской лимфомы, характеризующейся самым высоким инвазивным потенциалом среди всех известных типов лимфом. Ионы кальция являются одними из основных внутриклеточных сигнальных мессенджеров, контролирующих процесс диссеминации раковых клеток в организме. Лимфома Беркитта является распространенной клеточной моделью для исследований, направленных на понимание патофизиологических особенностей и механизмов лечения лимфом, однако практически ничего неизвестно о физиологических путях, обеспечивающих поступление кальция из внеклеточной среды в цитоплазму этих клеток. В настоящей работе впервые были проведены электрофизиологические исследования нативных кальций-проницаемых ионных каналов, участвующих в клеточном ответе на механическую стимуляцию клеток лимфомы Беркитта линии Raji. Регистрация ионных токов в конфигурации cell-attached позволила обнаружить механочувствительные кальций-проницаемые каналы (SAC-каналы), активирующиеся в ответ на растяжение участка клеточной мембраны. При анализе записей токов через одиночные каналы выявлено потенциальное участие SAC-каналов в транспорте ионов кальция в клетках Raji. Мы показали, что локальный вход ионов кальция через каналы SAC контролирует активность кальций-зависимых калиевых каналов двух типов – BK и SK, не обладающих собственной механочувствительностью. Полученные результаты впервые демонстрируют участие механоправляемых каналов SAC в формировании физиологически значимых путей транспорта кальция, регулирующих активность кальций-зависимых молекул в клетках лимфомы Беркитта.

**Ключевые слова:** клеточная мембрана, патч-кламп, механочувствительные каналы, локальная кальциевая сигнализация, лимфома человека, клетки Raji, кальций-зависимые калиевые каналы

DOI: 10.31857/S004137712103010X

Лимфома Беркитта (Burkitt's Lymphoma) — это агрессивная и быстрорастущая не-Ходжкинская В-клеточная лимфома. Встречаемость лимфомы Беркитта составляет примерно 1–5% от всех неходжкинских лимфом, но при этом диагностируется примерно в 30% случаев детских лимфом в США (Allen et al., 2015). Для лимфомы Беркитта характерен повышенный уровень пролиферативной активности и самый высокий инвазивный потенциал среди всех лимфом (Xiong et al., 2012). Известно, что ионы кальция являются одними из основных внутриклеточных сигнальных мессенджеров, которые контролируют инвазию, миграцию и метастазирование раковых клеток (Iamshanova et al., 2017). В то же время физиологические пути, которые могут обеспечивать регулируемое поступление кальция в цитоплазму клеток лимфомы, в настоящее время практически не

изучены, несмотря на очевидную важность данной проблемы для понимания особенностей малигнизации лимфоидных клеток.

Поступление кальция в цитоплазму из внеклеточной среды опосредуется катионными кальций-проницаемыми каналами плазматической мембраны, как высокоселективными по отношению к кальцию (например, семейством ионных каналов STIM/Orai и кальциевыми потенциал-зависимыми каналами Cav), так и неселективными (ионными каналами семейства TRP, Piezo).

В наших работах было выявлено, что механочувствительные кальций-проницаемые ионные каналы, которые активируются при растяжении мембраны (stretch-activated channels или каналы SAC), обеспечивают эффективный путь для высококалолизованного поступления ионов кальция в цитоплазму клеток различного происхождения, включая мезенхимные стволовые клетки человека (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2017), нормальные и трансформированные фиброб-

**Принять сокращения:** КСа — кальций-зависимые калиевые каналы.

ласты мыши (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2014, 2018, 2020) и клетки миелоидной лейкемии человека (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2019a).

Задача настоящей работы заключалась в электрофизиологическом исследовании ионных каналов, участвующих в клеточном ответе на механическую стимуляцию клеток лимфомы Беркитта линии Raji. Мы применили апробированный ранее подход для проверки предположений о присутствии механоуправляемых SAC-каналов и определения их потенциального участия в транспорте ионов кальция в клетках лимфомы Беркитта. В этой работе нами впервые показана и проанализирована механо-зависимая активация ионных токов в мембране культивируемых клеток лимфомы Беркитта линии Raji.

Результаты демонстрируют, что SAC-опосредованное высоколокализованное поступление кальция стимулирует активность различных типов кальций-зависимых калиевых каналов (KCa; высокой и низкой проводимости, BK и SK).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Клетки.** Культивируемая клеточная линия лимфомы Беркитта Raji была получена из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали на среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки для суспензионных клеточных культур (Sus-Biol, Биолот, Россия) и 80 мкг/мл гентамицина при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки пересевали 3 раза в неделю в соотношении 1 : 3. За 1 ч до экспериментов клетки высевали на покровные стекла (4 × 4 мм), предварительно покрытые поли-DL-лизином (Sigma-Aldrich, США).

**Метод локальной фиксации потенциала.** Установка для регистрации ионных токов состоит из операционного усилителя Axon 200B (Molecular Devices, США) с регистрирующей головкой Axon CV203BU (Molecular Devices, США), аналогово-цифрового преобразователя Digidata 1550A (Molecular Devices, США) и персонального компьютера под управлением ОС Windows 7 (Microsoft, США). Управление экспериментом, регистрацию и запись данных осуществляли с помощью специализированного пакета программного обеспечения pClamp 10.7 (Molecular Devices, США). При регистрации ионных токов частота дискретизации сигнала составляла 10 кГц, фильтр нижних частот – 0.3 кГц. Стекла с клетками помещали в экспериментальную камеру, заполненную стандартным наружным раствором (состав см. ниже). Оптические наблюдения осуществляли с помощью инвертированного микроскопа с дифференциальным контрастом по Номарскому (объектив PlanAprochromat 16×/0.25, Carl Zeiss, Германия, окуляр 16×).

Стекланные микропипетки изготавливали из боросиликатных заготовок со стандартной толщиной

капилляра (внешний/внутренний диаметр капилляра 1.5/0.86 мм, кат. № BF-150-86-10, Molecular Devices, США) на горизонтальной автоматизированной микрокузнице Флеминга-Брауна (Flaming/Brown Puller, модель P-97, Sutter Instruments, США) и заполняли стандартным наружным раствором (состав см. ниже), контактирующим с внеклеточной стороной участка мембраны. Электрическое сопротивление пипеток составляло 5–8 МОм. Стекланную микропипетку подвели к клетке с помощью микроманипулятора, касание микропипеткой клеточной поверхности наблюдали в микроскоп. Для формирования сверхплотного гигаомного контакта с плазматической мембраной (Giga-seal) через стекланную микропипетку подавали и запасали в системе “отрицательное” давление (suction, около 70–80 мм. рт. ст.). При подаче отрицательного давления наблюдали быстрое увеличение электрического сопротивления ( $R$ ) контакта между микропипеткой и плазматической мембраной клетки. При достижении значений  $R > 200$  МОм давление в системе сбрасывали, что приводило к дальнейшему повышению  $R$  до значений 3–5 ГОм и стабилизации гигаомного контакта, после чего приступали к регистрации ионных токов. Все эксперименты проводили при комнатной температуре (22–23°C).

**Растворы.** В электрофизиологических экспериментах стандартный наружный раствор в регистрирующей микропипетке содержал (в mM): 145 NaCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES/TrisOH. В режиме отведения токов cell-attached раствор в камере был аналогичен стандартному наружному раствору с эквивалентной заменой ионов Na<sup>+</sup> на K<sup>+</sup> для установления потенциала покоя мембраны клетки близким к нулю. Величину pH всех растворов поддерживали на уровне 7.2–7.3.

**Регистрация ионных токов и анализ данных.** После образования гигаомного контакта в условиях отведения токов от участка плазматической мембраны неповрежденной клетки (вариант cell-attached, «калиевый» наружный раствор) в начале эксперимента в течение 1–2 мин регистрировали фоновую активность ионных каналов в контрольных условиях при различных уровнях поддерживаемого трансмембранного потенциала в диапазоне от –70 до 30 мВ (непрерывная регистрация с ручной установкой значения потенциала, протокол gap-free). Далее эксперименты проводили по стандартному протоколу, состоящему из следующих последовательных этапов:

- 1) установка трансмембранного потенциала ( $E$ ) на заданный уровень;
- 2) регистрация фоновой активности каналов при заданном значении  $E$ ;
- 3) подача механического стимула (отрицательного давления) и регистрация ответа;
- 4) снятие давления, регистрация активности после прекращения стимуляции;
- 5) повторение этапов 1, 2 и др.

Использовали широко распространенный способ механической стимуляции участка плазматической мембраны нативных клеток, который состоял в натяжении (деформации) мембраны посредством снижения гидростатического давления  $P$  ( $\Delta P < 0$ , suction) или его повышения ( $\Delta P > 0$ , pressure) в регистрирующей пипетке. Упрощенная схема активации механозависимых ионных токов в ответ на растяжение плазматической мембраны представлена в наших ранних публикациях (например: Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2018). Контроль и регистрацию уровня стимула, необходимого для активации каналов, осуществляли по манометру.

Обработку и анализ записей токов проводили в программном обеспечении Clampfit 10.7. Для фильтрации записей использовали фильтр Гаусса нижних частот с частотой среза 170 Гц ( $-3$  dB cut off frequency); кроме того, записи дополнительно фильтровали от электрических помех с опорной частотой 50 Гц (частота переменного тока в электрической сети). Из записей токов при различных уровнях мембранного потенциала получали характеристики одиночных каналов и идентифицировали их по проводимости и селективности. Амплитуды токов рассчитывали из амплитудных гистограмм, описанных функцией Гаусса, или измеряли вручную с помощью программы Clampfit 10.7. Для проверки корректности значений определяемых амплитуд в некоторых случаях использовали опцию “Single-channel search”, встроенную в программное обеспечение.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

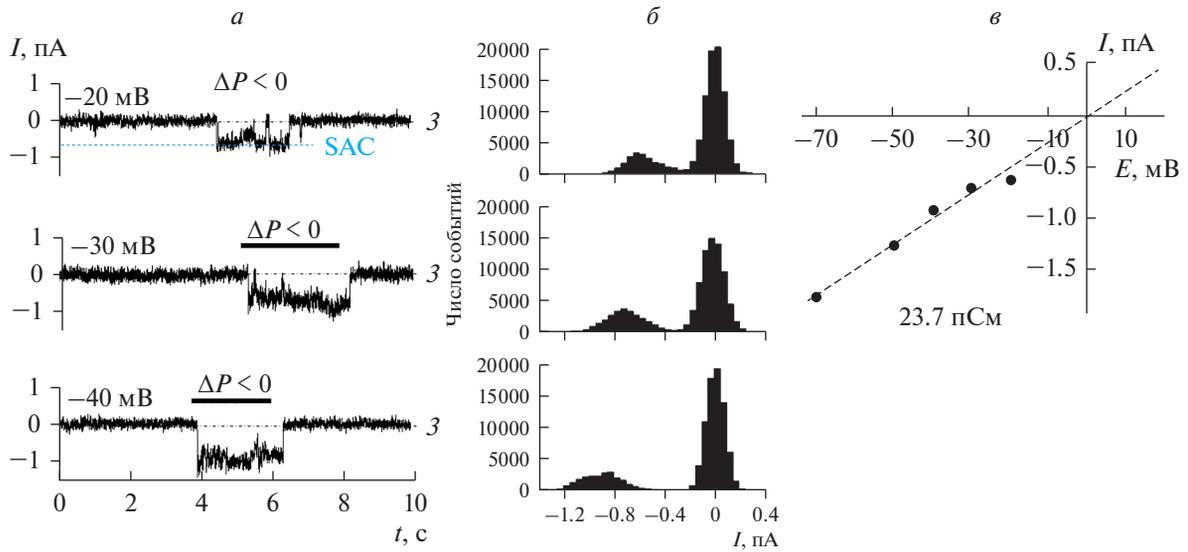
**Механочувствительные ионные каналы в клетках лимфомы Беркитта линии Raji.** В наших предыдущих исследованиях была описана активность механочувствительных SAC-каналов в различных клеточных типах, включая трансформированные клетки крови. Нами были разработаны и апробированы протоколы для регистрации и анализа одиночных механозависимых ионных токов, которые мы и использовали в настоящей работе для проверки предположений о функциональной активности SAC-каналов в клетках лимфомы Беркитта линии Raji. Действительно, подача механического стимула (отрицательного или положительного давления) приводила к активации механочувствительных каналов в 30 экспериментах (из 49 стабильных патчей, что составляет около 60%) при отведении от участка плазматической мембраны нативных клеток (конфигурация cell-attached). При этом в остальных 19 экспериментах мы не наблюдали активации механозависимых токов, и фоновая активность каких-либо других ионных каналов была крайне незначительна или совсем отсутствовала.

На рис. 1а представлена запись тока, демонстрирующая активность SAC-каналов в плазматической мембране клеток лимфомы при различных уровнях поддерживаемого потенциала. Амплитудные гистограммы, соответствующие представленным записям

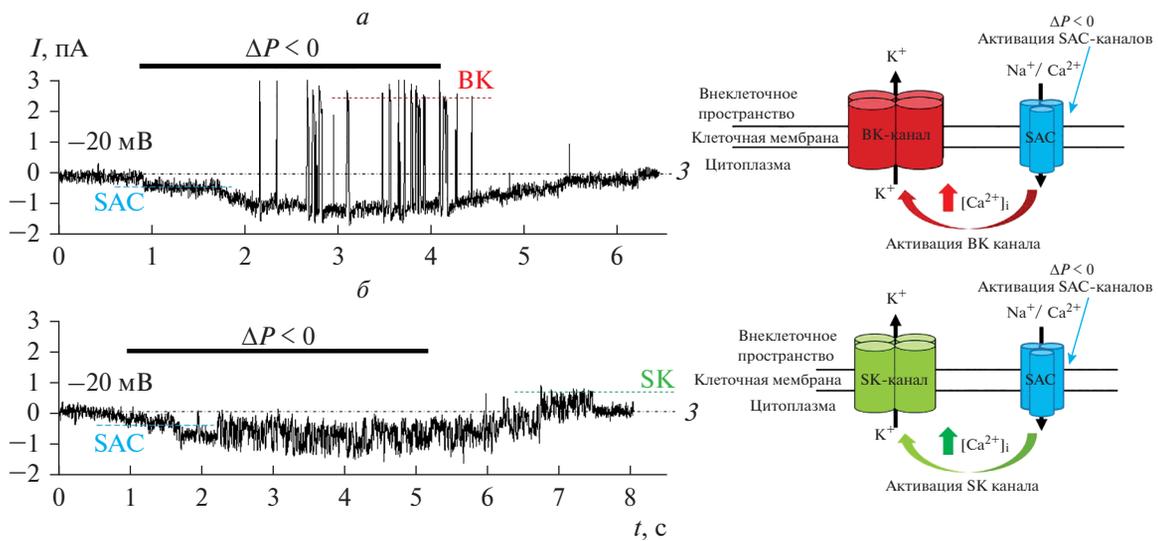
токов, приведены на рис. 1б. Вольтамперная характеристика зарегистрированных SAC-каналов, полученная на основании измеренных значений амплитуд в диапазоне от  $-20$  до  $-70$  мВ, аппроксимирована линейной зависимостью; унитарная проводимость составляет 23.7 пСм (рис. 1в). Потенциал реверсии близок к нулю, что означает отсутствие натрий-калиевой избирательности и является характерной особенностью SAC-каналов в клетках млекопитающих. Активация SAC-каналов развивалась без видимой задержки, и после снятия стимула уровень активности каналов возвращался к фоновому значению, близкому к нулю (рис. 1а). На рис. 1 приведен эксперимент, в котором регистрировали активность одного SAC-канала в участке мембраны нативной клетки. В большинстве случаев наблюдали несколько кратных уровней тока, отражающих одновременные открывания пор нескольких независимых канальных молекул (см. рис. 2, 3).

**Сопряженная механозависимая активация каналов SAC и KCa в клетках лимфомы Беркитта линии Raji.** Ранее нами был продемонстрирован феномен кальций-зависимого функционального сопряжения между каналами SAC и KCa в различных типах клеток (см. вводную часть). Возник вопрос о том, может ли присутствовать феномен сопряженной активации каналов SAC и KCa в клетках лимфомы Беркитта линии Raji. Это предположение опирается, прежде всего, на данные мРНК-скрининга на микрочипах, представленного в транскриптомной базе данных: так, в клетках Raji наблюдаются высокие уровни экспрессии мРНК некоторых типов KCa-каналов (например, KCa2.3, ген *KCNN3*; Wu et al., 2016).

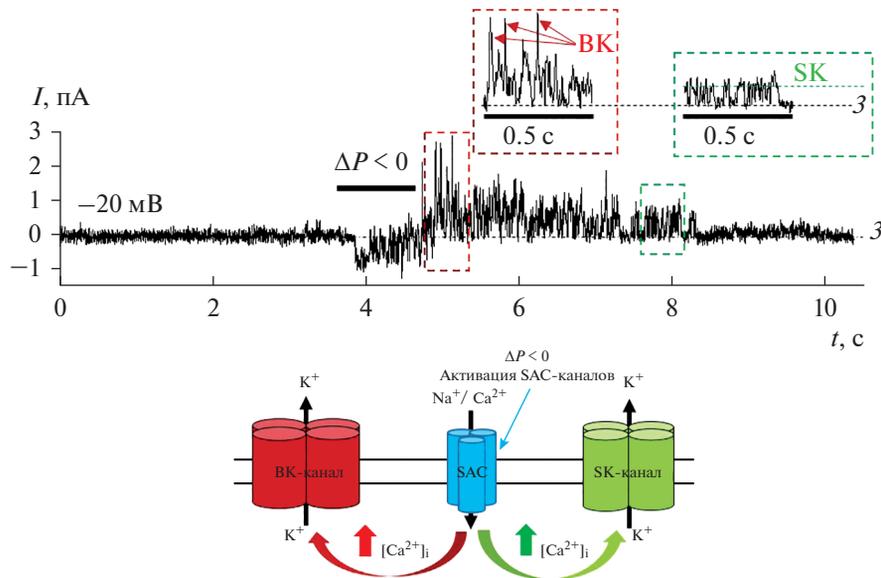
Результаты наших электрофизиологических экспериментов по регистрации одиночных ионных токов позволили документировать феномен сопряженной активации в клетках лимфомы Беркитта линии Raji (рис. 2 и 3). В результате проведенного анализа механозависимых токов в 18 экспериментах (из 30 стабильных патчей с SAC-каналами) была выявлена сопряженная активация колокализированных  $Ca^{2+}$ -транспортирующих SAC-каналов и  $Ca^{2+}$ -управляемых KCa-каналов. Важно отметить, что в клетках Raji мы наблюдали сопряженную активацию SAC-каналов и KCa-каналов различных типов, значительно различающихся по значениям амплитуд открываний одиночных каналов и, соответственно, по унитарной проводимости. Так, на основании амплитуд мы можем четко разделить наблюдаемые KCa-каналы на два типа: калиевые каналы высокой проводимости (BK, рис. 2а) и калиевые каналы низкой проводимости (SK, рис. 2б). Близкие значения амплитуд и проводимости для BK-каналов мы регистрировали ранее в стволовых клетках эндометрия человека (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2017, 2019b), а каналы SK, имеющие сходные характеристики, были описаны нами в клетках миелоидной лейкемии человека линии K562 (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2019a) и



**Рис. 1.** Активация механочувствительных SAC-каналов в плазматической мембране клеток лимфомы Беркитта линии Raji. *a* – Репрезентативные записи токов  $I$  (конфигурация cell-attached), демонстрирующие активацию SAC-каналов в ответ на приложение механического стимула (отрицательного давления,  $\Delta P < 0$ , около 40 мм рт. ст.). Значения поддерживаемого мембранного потенциала указаны над записями токов. *б* – Амплитудные гистограммы, построенные по представленным записям токов; расстояние между пиками соответствует амплитуде одиночного открывания канала при соответствующем мембранном потенциале. *в* – Вольтамперная характеристика SAC-каналов, соответствует унитарной проводимости 23.7 пСм. Здесь и на рис. 2, 3: з – закрытое состояние каналов (уровень нулевого тока); открывание SAC-каналов (входящие токи) отмечено нижней штриховой линией.



**Рис. 2.** Активация кальций-зависимых калиевых каналов (КСа) различной проводимости, вызванная высоколокализованным входом ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через SAC-каналы. Показаны результаты двух независимых репрезентативных экспериментов. Поддерживаемый мембранный потенциал –20 мВ. *a* – Функциональное сопряжение кальций-проницаемых SAC-каналов и каналов КСа большой проводимости (ВК). *б* – Сопряженная активация кальций-проницаемых каналов SAC и КСа малой проводимости (СК). Здесь и на рис. 3, открывания ВК- и СК-каналов обозначены красной и зеленой штриховыми линиями соответственно. Предполагаемые модели сопряжения между SAC- и КСа-каналами представлены *справа от записей токов*.  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  – внутриклеточная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Рис. 3.** Сопряженная активация кальций-проводящих SAC-каналов с калиевыми каналами BK и SK в одном мембранном патче. Поддерживаемый потенциал  $-20$  мВ. Активность BK- и SK-каналов показана в расширенном масштабе времени на врезках вверху. Схема регуляции активности каналов BK и SK локальным входом ионов кальция через механочувствительные SAC-каналы показана под записью токов.

фибробластах мыши (клеточные линии BALB/3T3 и 3T3B-SV40; Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2014, 2018).

Сопряженную активацию каналов SAC и SK наблюдали в 7 экспериментах, а сопряжение между SAC- и BK-каналами наблюдали в 6 экспериментах из 18. На рис. 2 показаны типичные записи ионных токов, представляющих последовательное развитие активности SAC-каналов и функционально солокализованных с ними каналов BK (рис. 2а) или SK (рис. 2б). Механическая стимуляция вызывала стретч-активацию токов входящего направления через  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящие SAC-каналы в клетках Raji (см. также рис. 1: активация токов через SAC-каналы). Далее, в том же патче наблюдали развитие токов выходящего направления, отражающих опосредованную активацию KCa-каналов, не имеющих собственной механочувствительности. Имеющиеся данные (рис. 2) согласуются с результатами наших предшествующих работ и позволяют заключить, что активация KCa-каналов в клетках лимфомы человека, наблюдаемая через 1–2 с после подачи стимула, и активации  $\text{Ca}^{2+}$ -проницаемых SAC-каналов, обусловлена кратковременным локальным повышением уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в околочелювной зоне кластеризации SAC- и KCa-каналов.

В 5 из 18 экспериментов на клетках Raji активация SAC-каналов сопровождалась развитием активности как BK-, так и SK-каналов в одном фрагменте клеточной мембраны (рис. 3). Важно отметить (рис. 3), что снятие механического стимула, приводящее к инактивации SAC-каналов (а, следовательно, прекращению локального входа кальция), приводило к постепенному исчезновению активности сначала

BK-, а затем и SK-каналов. Это хорошо коррелирует с различной степенью кальциевой чувствительности каналов BK (активация при уровне внутриклеточного свободного ионизированного кальция  $>1$  мкМ) и SK (активация при концентрациях  $>0.1$  мкМ: Fakler, Adelman, 2008). Соответственно SK-каналы, активирующиеся при более низких значениях уровня внутриклеточного кальция, работают дольше и инактивируются позже каналов BK в условиях прекращения локального входа кальция через SAC-каналы.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В клетках лимфомы Беркитта впервые выявлены механочувствительные катионные каналы, активирующиеся при растяжении участка плазматической мембраны (стретч-активация, SAC-каналы). В ионных условиях, близких к физиологическим, было продемонстрировано функциональное сопряжение между SAC-каналами и KCa-каналами различных типов: высоколокализованный вход кальция через SAC-каналы стимулирует активность калиевых каналов SK и BK в плазматической мембране. Таким образом, SAC-каналы, по-видимому, формируют один из физиологически значимых путей для эффективного входа ионов кальция в клетках Raji.

Учитывая высокие пролиферативную и инвазивную способности лимфомы Беркитта (Xiong et al., 2012), в которых очевидна важная роль кальций-зависимых сигнальных путей и молекул, SAC-каналы могут являться определяющими регуляторами поведения клеток лимфомы. Следует отдельно отметить, что ионные механизмы транспорта кальция в клет-

ках различных лимфом практически не изучены. Теперь, после выявленного нами присутствия и активности кальций-проницаемых SAC-каналов, важным вопросом является идентификация их потенциальных молекулярных коррелятов в клетках данного типа. По значению унитарной проводимости (около 25 пСм), которая является важной биофизической характеристикой одиночного канала, SAC-каналы в клетках Raji близки к каналам, идентифицированным нами ранее в стволовых клетках эндометрия человека (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2017) и трансформированных фибробластах мышцы линии 3T3B-SV40 (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2014, 2018, 2019c). В клетках 3T3B-SV40 мы показали, что наиболее вероятным коррелятом SAC-каналов являются белки Piezo1: мы обнаружили соответствие биофизических характеристик каналов, активируемых в ответ на растяжение мембраны и в присутствии селективного активатора каналов Piezo1 низкомолекулярного гетероциклического соединения Yodal (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2019c). Анализ баз данных транскриптом (Wu et al., 2019) позволил обнаружить крайне высокий уровень экспрессии мРНК *PIEZO1* в клетках Raji: он находится на втором месте среди более 80 образцов различных клеток и тканей, использованных в тесте (oligonucleotide array). Таким образом, весьма вероятно, что белки Piezo1 формируют кальций-проницаемые SAC-каналы в клетках лимфомы Беркитта. Это предположение может быть использовано для формирования отдельного направления исследований.

Ранее детально были изучены SAC-каналы в клетках другого рака (крови) – клетках миелоидной лейкемии человека линии K562 (Staruschenko, Vedernikova, 2002; Staruschenko et al., 2005, 2006), показана их проницаемость для ионов кальция, исследованы некоторые механизмы регуляции их активности мембранными липидами и актиновым цитоскелетом (Morachevskaya et al., 2007; Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2011). С помощью анализа записей одиночных ионных токов в участке клеточной мембраны нативных клеток K562 нами было показано, что кальциевый вход через SAC-каналы в клетках K562 вызывает активацию кальций-зависимых калиевых каналов SK. Напротив, в мезенхимных стволовых клетках эндометрия человека SAC-каналы стимулируют активность калиевых каналов BK, но не SK, которые, несмотря на их присутствие в том же мембранном фрагменте, не активируются SAC-опосредованным локальным входом кальция (Chubinskiy-Nadezhdin et al., 2017).

В представленной работе на клетках лимфомы Беркитта мы обнаружили, что активация SAC-каналов может стимулировать активность как каналов BK или SK по отдельности, так и одновременно двух типов KCa-каналов в одном мембранном фрагменте. Феномен SAC-зависимой стимуляции активности одновременно каналов SK и BK может быть интерпретирован двумя предположениями.

Первая гипотеза – в мембране присутствуют два независимых типа канальных кластеров – SAC/SK и SAC/BK, и их случайное попадание в один фрагмент плазматической мембраны в эксперименте приводит к наблюдениям сопряжения SAC-каналов одновременно с двумя типами KCa-каналов. В таком случае, активация разных SAC-каналов внутри независимых кластеров управляет активностью своих, локализованных с ними, SK- или BK-каналов.

Альтернативная гипотеза – присутствие канальных кластеров, состоящих из функционально локализованных каналов трех типов – SAC + BK + SK. Наши результаты свидетельствуют в пользу альтернативной гипотезы – совместной локализации 3-х типов каналов в плазматической мембране клеток Raji. Этот вывод может быть сделан нами на основании записей токов с активностью трех типов ионных каналов: во всех 5 экспериментах после снятия механического стимула (и постепенного снижения активности SAC-каналов) вначале мы наблюдали инактивацию каналов BK, а только затем – каналов SK. Учитывая известную разницу в чувствительности каналов BK и SK к уровню внутриклеточного кальция (см. раздел Результаты и Fakler, Adelman, 2008), при прекращении локального входа кальция через каналы SAC каналы BK должны инактивироваться раньше, чем SK. В случае первой гипотезы (присутствия независимых кластеров каналов SAC/BK и SAC/SK) феномен последовательного снижения активности KCa каналов не наблюдали, а временные рамки процессов инактивации BK- и SK-каналов имели бы случайный характер. В совокупности, наши данные в очередной раз демонстрируют уникальность метода патч-кламп для анализа и оценки взаимодействий одиночных канальных белков в плазматической мембране живых клеток, в частности анализа механизмов передачи локального кальциевого сигнала.

Связь функций калий-селективных ионных каналов с различными патофизиологическими процессами и реакциями в трансформированных клетках различного происхождения являются актуальным и перспективным направлением исследований. Калиевые каналы предлагаются как терапевтическая мишень в персонифицированной онкотерапии (Huang, Jan, 2014). Мы впервые идентифицировали функциональную активность KCa-каналов BK и SK в клетках лимфомы Беркитта линии Raji. С учетом наличия высокоселективных ингибиторов для данных каналов, в дальнейших исследованиях может быть оценена перспектива использования BK- и SK-каналов как молекулярных мишеней для снижения агрессивных патофизиологических свойств лимфом.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность и признательность Е. А. Морачевской за полезное обсуждение результатов и критические замечания в процессе подготовки рукописи.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-75-00046).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей в качестве объектов исследований авторы не проводили.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Allen C.E., Kelly K.M., Bollard C.M. 2015. Pediatric lymphomas and histiocytic disorders of childhood. *Pediatr. Clin. North. Am.* V. 62. P. 139.
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Efremova T.N., Negulyaev Y.A., Morachevskaya E.A. 2018. Coupled activation of mechanosensitive and calcium-dependent potassium channels in 3T3 and 3T3-SV40 cells. *Cell Tiss. Biol.* V. 12. P. 231.
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Negulyaev Y.A., Morachevskaya E.A. 2011. Cholesterol depletion-induced inhibition of stretch-activated channels is mediated via actin rearrangement. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 412. P. 80.
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Negulyaev Y.A., Morachevskaya E.A. 2014. Functional coupling of ion channels in cellular mechanotransduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 451. P. 421.
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Negulyaev Y.A., Morachevskaya E.A. 2019a. Functional coupling of ion channels in the process of mechano-dependent activation in the membrane of K562 Cells. *Cell Tiss. Biol.* V. 13. P. 470.
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Sudarikova A.V., Shilina M.A., Vasileva V.Y., Grinchuk T.M., Lyublinskaya O.G., Nikolsky N.N., Negulyaev Y.A. 2019b. Cell cycle-dependent expression of BK channels in human mesenchymal endometrial stem cells. *Sci. Rep.* V. 9. P. 4595.
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Vasileva V.Y., Negulyaev Y.A., Morachevskaya E.A. 2020. Functional clustering and coupling of ion channels in cellular mechanosensing is independent on lipid raft integrity in plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.* V. 1867. P. 118764.
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Vasileva V.Y., Pugovkina N.A., Vassilieva I.O., Morachevskaya E.A., Nikolsky N.N., Negulyaev Y.A. 2017. Local calcium signalling is mediated by mechanosensitive ion channels in mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 482. P. 563.
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Vasileva V.Y., Vassilieva I.O., Sudarikova A.V., Morachevskaya E.A., Negulyaev Y.A. 2019c. Agonist-induced Piezo1 activation suppresses migration of transformed fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 514. P. 173.
- Fakler B., Adelman J.P. 2008. Control of K(Ca) channels by calcium nano/microdomains. *Neuron.* V. 59 P. 873.
- Huang X., Jan L.Y. 2014. Targeting potassium channels in cancer. *J. Cell. Biol.* V. 206. P. 151.
- Iamshanova O., Fiorio Pla A., Prevarskaya N. 2017. Molecular mechanisms of tumour invasion: Regulation by calcium signals. *J. Physiol.* V. 595. P. 3063.
- Morachevskaya E., Sudarikova A., Negulyaev Y. 2007. Mechanosensitive channel activity and F-actin organization in cholesterol-depleted human leukaemia cells. *Cell. Biol. Int.* V. 31. P. 374.
- Staruschenko A.V., Negulyaev Y.A., Morachevskaya E.A. 2005. Actin cytoskeleton disassembly affects conductive properties of stretch-activated cation channels in leukaemia cells. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1669. P. 53.
- Staruschenko A.V., Sudarikova A.V., Negulyaev Y.A., Morachevskaya E.A. 2006. Magnesium permeation through mechanosensitive channels: single-current measurements. *Cell Res.* V. 16. P. 723.
- Staruschenko A.V., Vedernikova E.A. 2002. Mechanosensitive cation channels in human leukaemia cells: calcium permeation and blocking effect. *J. Physiol.* V. 541. P. 81.
- Wu C., Jin X., Tsueng G., Afrasiabi C., Su A.I. 2016. BioGPS: Building your own mash-up of gene annotations and expression profiles. *Nucleic Acids Res.* V. 44. P. 313.
- Xiong J., Qin J., Zheng Y., Peng X., Luo Y., Meng X. 2012. PEG10 promotes the migration of human Burkitt's lymphoma cells by up-regulating the expression of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Clin. Invest. Med.* V. 35. P. 117.

## Local Mechano-Dependent Calcium Influx Controls the Activity of Calcium-Dependent Potassium Channels of Big and Small Conductance in Human Lymphoma Cells

V. Yu. Vasileva<sup>a</sup> and V. I. Chubinskiy-Nadezhdin<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Cytology Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia

\*e-mail: vchubinskiy@gmail.com

Burkitt's lymphoma is an aggressive and fast-growing form of non-Hodgkin's lymphoma with the highest invasive potential of all types of lymphomas. Calcium ions are one of the main intracellular signaling messengers that control the dissemination of cancer cells in the body. Burkitt's lymphoma is a common cell model for research aimed at understanding the pathophysiology and mechanisms of treatment of lymphomas, but little is known about the physiological pathways that provide calcium influx from the extracellular environment to the cytoplasm of these cells. In current work, we performed, for the first time, electrophysiological studies of native calcium-permeable ion channels involved in the cellular response to mechanical stimulation of Burkitt's lymphoma Raji cells. Registration of ion currents in the cell-attached configuration allowed us to detect mechanosensitive calcium-permeable channels (SAC-channels), which are activated in response to stretching of fragment of the cell membrane. Analysis of record-

ings of single ionic currents revealed the potential involvement of SAC channels in the transport of calcium ions in Raji cells. We have shown that the local entry of calcium via the SAC channels controls the activity of two types of calcium-dependent potassium channels – BK and SK, which do not have their own mechanosensitivity. The results demonstrate, for the first time, the participation of SAC channels in the formation of physiologically significant calcium transport pathways that regulate the activity of calcium-dependent molecules in Burkitt's lymphoma cells.

**Keywords:** cell membrane, patch-clamp, mechanosensitive channels, local calcium signaling, human lymphoma, Raji cells, calcium-dependent potassium channels

УДК 57.033

## СОСТОЯНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ В ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИЙ ПЕРИОД ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ У КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ЦИТОФЛАВИНА. ОЦЕНКА МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2021 г. А. В. Дерюгина<sup>1</sup>, А. В. Полозова<sup>1,2, \*</sup>, М. Н. Иващенко<sup>1</sup>, П. С. Игнатъев<sup>3</sup>, В. Б. Метелин<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603950 Россия

<sup>2</sup>Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава РФ, Нижний Новгород, 603005 Россия

<sup>3</sup>Производственное объединение Уральский оптико-механический завод им. Э.С. Яламова, Екатеринбург, 620100 Россия

<sup>4</sup>Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина, Москва, 117997 Россия

<sup>5</sup>Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, 129110 Россия

\*E-mail: shumilowanastya@gmail.com

Поступила в редакцию 02.02.2021 г.

После доработки 06.03.2021 г.

Принята к публикации 06.03.2021 г.

В работе проведена комплексная фазовая микроморфометрия эритроцитов крыс при черепно-мозговой травме (ЧМТ) и действии цитофлавина (ЦФ) в посттравматическом периоде. У животных моделировали закрытую ЧМТ путем свободного падения груза на теменно-затылочную область черепа. Через 1 ч после нанесения травмы и затем в течение 10 сут крысам ежедневно внутривенно вводили ЦФ в дозе 0.2 мл/кг. Контрольным животным вводили изотонический раствор хлорида натрия в том же объеме. Анализ крови проводили через 1, 3, 7 и 12 сут после нанесения травмы. ЧМТ вызывала увеличение фазовой высоты и фазового диаметра, объема, площади и среднего диаметра эритроцитов на 1–7 сут относительно значений интактной группы, что сочеталось с эхиоцитарной и сфероэхиоцитарной трансформацией эритроцитов, а также смещением спектра длин волн фазовых портретов в сторону 650 нм. Влияние ЦФ на морфометрические показатели эритроцитов в посттравматическом периоде проявлялось в восстановлении фазовой высоты, фазового диаметра, площади, объема и периметра эритроцитов. Начиная с 3–7-х сут действия ЦФ наблюдали уменьшение количества эхиоцитов, сферичности клеток, длины волны фазовых портретов до 600 нм. Оценены возможности лазерной интерференционной микроскопии при неинвазивном исследовании эритроцитов при ЧМТ и действии ЦФ в посттравматическом периоде. Анализ интерференционных изображений эритроцитов свидетельствует о снижении окислительных процессов в клетках, восстановлении состояния гемоглобина, улучшении метаболизма эритроцитов при действии ЦФ в посттравматический период.

**Ключевые слова:** лазерная интерференционная микроскопия, эритроциты, цитофлавин, черепно-мозговая травма

**DOI:** 10.31857/S0041377121030020

При черепно-мозговой травме (ЧМТ) повреждение головного мозга определяется степенью выключения тканевого кровотока в момент ишемии и длительностью самого ишемического периода (Царёв, 2018). Доставку кислорода тканям затрудняют нарушения микрореологических свойств крови. Ключевая роль в формировании микрореологического поведения крови принадлежит эритроцитам, нарушение формы и структуры мембран которых может приводить к снижению их деформируемости, нарушению газотранспортной функции, ухудшению

реологических свойств крови (Ciccoli et.al., 2012). При этом использование препаратов, обладающих антигипоксическим действием, предполагает исследование их влияния на морфометрические показатели эритроцитов. Комбинированным антигипоксантом является цитофлавин (ЦФ) – комплексный цитопротектор, состоящий из двух метаболитов (янтарной кислоты и рибоксина) и двух коферментов витаминов (рибофлавинмононуклеотида (витамин В<sub>2</sub>) и никотиамида (витамин РР)). Установлено, что ЦФ улучшает окислительный метаболизм в условиях ишемии, препятствуя резкому снижению уровня АТФ в клетках любого типа (Джумагазиев и др., 2015).

**Принятые сокращения:** ЦФ – цитофлавин; ЧМТ – черепно-мозговая травма.

Для оценки состояния живых клеток целесообразно использование неинвазивных методик, вносящих наименьшее количество повреждений и уменьшающих таким образом погрешность метода измерений. В качестве такого метода используется метод лазерной интерференционной микроскопии, способной создавать высококонтрастные изображения живых объектов без их модификации красителями (Василенко и др., 2018). Проведение комплексной фазовой микроморфометрии позволяет визуализировать модификацию клеток в режиме реального времени и исследовать динамику процессов, протекающих на мембране и примембранной областях клеток.

Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния ЦФ на морфометрические показатели эритроцитов в посттравматическом периоде с использованием лазерной интерференционной микроскопии.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Животные.** Работу проводили на 30 белых нелинейных красках-самках массой  $180 \pm 20$  г в возрасте 14 нед. (из питомника г. Крюково). Животных содержали в индивидуальных боксах с естественной 12-часовой сменой света и темноты, при влажности воздуха 60% и температуре  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , со свободным доступом к воде и пище. Содержание животных и проводимые с ними манипуляции осуществляли в соответствии с нормативными документами, представленными в руководстве “Guide for care and use of laboratory animals” и требованиями приказа Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики”.

**Моделирование закрытой ЧМТ.** Животным нанесли ЧМТ путем свободного падения груза массой 100 г с высоты 80 см на теменно-затылочную область черепа. Падение груза направлялось при помощи цилиндрической трубы с внутренним диаметром 20 мм, которая была жестко закреплена на штативе двумя держателями и центрирована над головкой крысы. Голова животного при этом была не зафиксирована. Травму наносили без анестезии на неповрежденный череп без предварительных манипуляций. Приложение такой механической энергии обеспечивает моделирование сотрясения головного мозга, очаговые повреждения, в том числе ушиб мозга, который сопровождается формированием эпидуральных и субдуральных гематом (Цымбалюк, Кочин, 2008). После нанесения травмы животных переносили в специальную пластиковую клетку и вели за ними наблюдение вплоть до восстановления нормальных поведенческих реакций. Летальность при падении груза составила 0–10%, а время рефлекторного выпрямления 2–4 мин. Это указывает на развитие легкой ЧМТ. Сразу после травмы у крыс наблюдали асфиксию, судороги, кровотечения и пр. Через 30–40 мин отмечали восстановление и возврат к нормальному режиму жизни и питания.

Через 1 ч после нанесения ЧМТ, а затем в течение 10 сут крысам ежедневно вводили внутривенно либо ЦФ (ООО “НТФФ “ПОЛИСАН”, Санкт-Петербург) в дозе 0.2 мл/кг (группа ЧМТ + ЦФ,  $n = 10$ ), либо изотонический раствор хлористого натрия в том же объеме (группа ЧМТ,  $n = 10$ ) для контроля действия ЦФ в посттравматическом периоде. Уровень физиологической нормы исследуемых показателей определяли у интактных (контрольных) животных ( $n = 10$ ). Образцы крови брали из подъязычной вены в 1, 3, 7 и 12 сут после нанесения травмы.

**Лазерная модуляционная интерференционная микроскопия.** Для комплексной фазометрии эритроцитов использовали микроскоп МИМ-340 (Уральский оптико-механический завод им. Э.С. Яламова, Россия), лазер с длиной волны 650 нм и объектив с увеличением  $30\times$  ( $NA = 0.65$ ), разрешение по поверхности – до 15 нм, разрешение по вертикали – 0.1 нм, возможность контроля изделий с глубиной рельефа – до 600 нм. Для захвата изображений применяли CCD-видеокамеру VS-415U (НПК “Видеоскан”, Россия) с разрешением  $782 \times 582$  пикселей. Регистрация морфологии нативных клеток без предварительной фиксации позволяла визуализировать модификацию клеток в режиме реального времени, изучать их морфологию и динамику внутриклеточных процессов.

В ходе работы биологические объекты размещали на зеркальной подложке, от которой отражается проходящий через клетку свет. В результате фиксируется двойной сдвиг фазы луча когерентного источника света в каждой точке объекта, а с помощью дополнительной волны от того же источника формируется интерференционное изображение клетки. Для исследования получали изображения 10 участков с монослойным расположением клеток в интерференционном канале и отраженном свете в каждой пробе. Состояние эритроцитов человека оценивали, регистрируя среднюю величину оптической разности хода и площадь фазового изображения эритроцита. Для получения достоверного результата показатели рассчитывали, используя не менее 100 клеток от каждого образца.

Полученные данные были обработаны с помощью пакетов прикладных программ BIostat (Analystsoft, США) и Microsoft Excel (Microsoft, США) с использованием методов одномерной статистики. Результаты представлены в виде средних арифметических значений и их стандартной ошибки. Достоверность различий средних определяли по  $t$ -критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По данным анализа фазово-интерференционной микроскопии у животных после ЧМТ на 1–7 сут статистически значимо были увеличены значения фа-

**Таблица 1.** Влияние цитофлавина (ЦФ, 0.2 мл/кг ежедневно, внутрибрюшинно) на морфометрические показатели эритроцитов при моделировании ЧМТ у крыс

Показатель	Интактные	Группа	Время после ЧМТ, сут			
			1	3	7	12
Фазовый диаметр, мкм	6.28 ± 0.07	ЧМТ	6.65 ± 0.05 <sup>а</sup>	6.92 ± 0.07 <sup>а</sup>	6.52 ± 0.08 <sup>а</sup>	6.31 ± 0.08
		ЧМТ + ЦФ	6.69 ± 0.06 <sup>а</sup>	6.54 ± 0.07 <sup>а</sup>	6.24 ± 0.08	6.02 ± 0.08 <sup>а</sup>
Площадь, мкм <sup>2</sup>	2.88 ± 0.06	ЧМТ	3.26 ± 0.08 <sup>а</sup>	3.16 ± 0.12 <sup>а</sup>	3.14 ± 0.10 <sup>а</sup>	2.93 ± 0.10
		ЧМТ + ЦФ	3.29 ± 0.03 <sup>а</sup>	3.19 ± 0.09 <sup>а</sup>	3.39 ± 0.13 <sup>а,б</sup>	2.92 ± 0.09
Объем, мкм <sup>3</sup>	4.03 ± 0.11	ЧМТ	4.92 ± 0.12 <sup>а</sup>	5.41 ± 0.11 <sup>а</sup>	4.66 ± 0.12 <sup>а</sup>	4.22 ± 0.14
		ЧМТ + ЦФ	4.62 ± 0.14 <sup>а,б</sup>	4.34 ± 0.18	4.23 ± 0.21	3.92 ± 0.17
Периметр, мкм	21.97 ± 0.31	ЧМТ	21.56 ± 0.36	23.82 ± 0.39 <sup>а</sup>	21.84 ± 0.53	20.98 ± 0.49 <sup>а</sup>
		ЧМТ + ЦФ	22.64 ± 0.32	21.36 ± 0.4 <sup>б</sup>	22.32 ± 0.51	20.07 ± 0.45 <sup>а,б</sup>
Фазовая высота, мкм	8.83 ± 0.16	ЧМТ	10.13 ± 0.1 <sup>а</sup>	9.56 ± 0.02 <sup>а</sup>	9.63 ± 1.19 <sup>а</sup>	9.43 ± 0.12 <sup>а</sup>
		ЧМТ + ЦФ	9.68 ± 0.13 <sup>а,б</sup>	9.28 ± 0.15 <sup>а</sup>	8.87 ± 0.14 <sup>б</sup>	9.62 ± 0.16 <sup>б</sup>

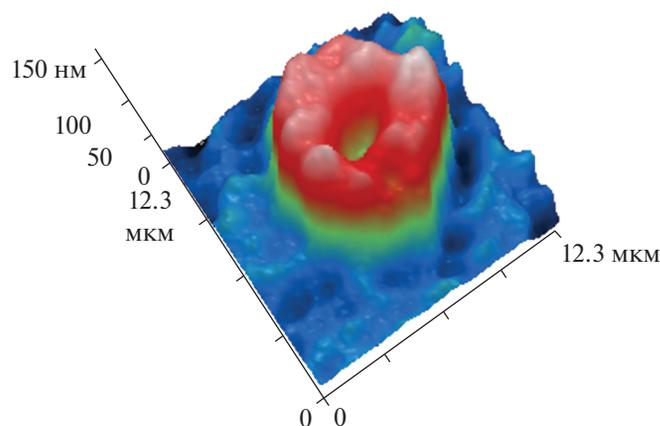
Примечание. Различия статистически значимы по сравнению с интактными животными (<sup>а</sup>) и с животными в группе ЧМТ (физиологический раствор после ЧМТ) (<sup>б</sup>) при  $p < 0.05$  ( $t$ -критерий Стьюдента). Даны средние и их ошибки.

зовой высоты и фазового диаметра, объема, площади и периметра эритроцитов относительно значений этих же показателей у интактной группы животных (табл. 1). Наиболее выраженные изменения значений фазовой высоты и площади эритроцитов в группе ЧМТ регистрировали в 1-е сут посттравматического периода, которые составили 14 и 13% от значений интактной группы соответственно. На 3-и сут максимально увеличивались фазовый диаметр (на 10%), объем (на 34%) и периметр клеток (на 8%) в группе ЧМТ относительно значений интактной группы.

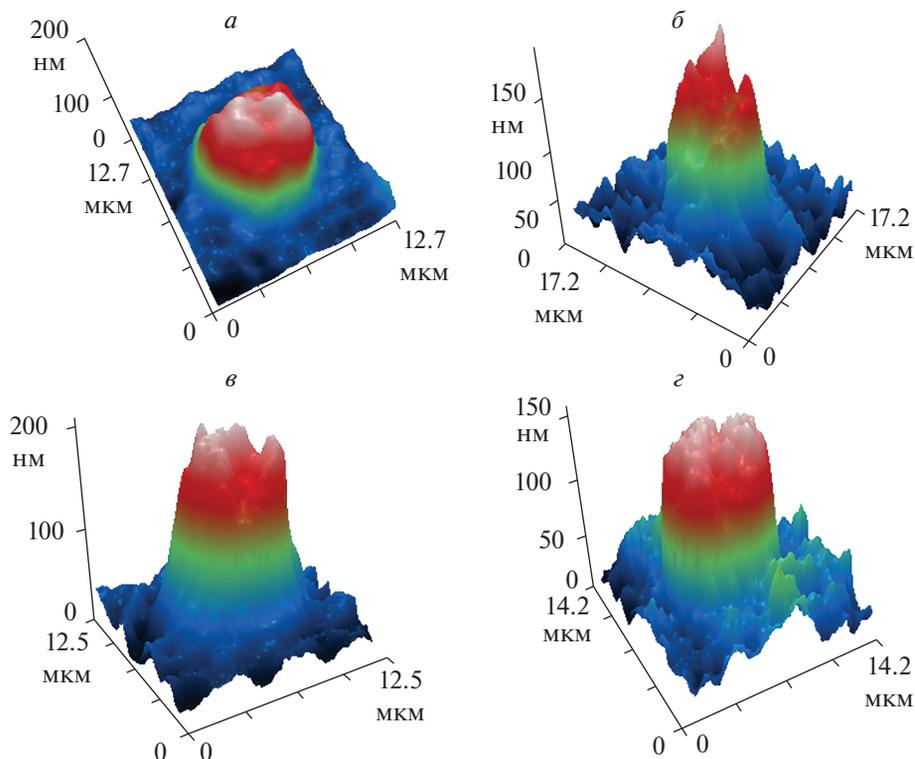
При действии ЦФ в посттравматический период у крыс (в группе ЧМТ + ЦФ) фазовый объем и периметр эритроцитов уменьшились соответственно на 20 и 10.3% по сравнению с показателями в группе ЧМТ на 3-и сут. При этом фазовый диаметр эритроцитов через 3 сут уменьшался на 5.7% относительно группы ЧМТ, а через 7 сут восстановился до показателей интактной группы. Начиная с 7-х сут, в группе ЧМТ + ЦФ регистрировали снижение фазовой высоты и объема клеток соответственно на 6 и 8.65% и увеличение фазовой площади на 4% по сравнению с этими параметрами в 1-е сут после травмы.

При сравнении фазового портрета эритроцитов в группах ЧМТ и ЧМТ + ЦФ были выявлены изменения топографии и рельефа поверхности мембраны эритроцитов по сравнению с интактной (контрольной) группой. Фазовый портрет интактного эритроцита показан на рис. 1. У крыс с ЧМТ (в отсутствие

ЦФ) диаметр клеток и толщина в области краев уменьшались, а размер центральной зоны увеличивался, имела неравномерность распределения уровня гемоглобина в примембранных слоях. К 1 сут преобладали сфероэритроцитарные формы (рис. 2а), тогда как через 3 и 7 сут на поверхности клеток отмечали появление большого количества шипов и спикул (рис. 2б, в соответственно), которые сохранялись у клеток к 12-м сут посттравматического периода (рис. 2г). Наблюдали значительное количество эритроцитов и сфероэритроцитов. Регистрировали сме-



**Рис. 1.** Фазовый портрет эритроцита у интактных крыс. Лазерная интерференционная микроскопия.



**Рис. 2.** Фазовые портреты нефиксированных эритроцитов крыс после черепно-мозговой травмы (ЧМТ) на 1-е, 3-и, 7-е и 12-е сут посттравматического периода.

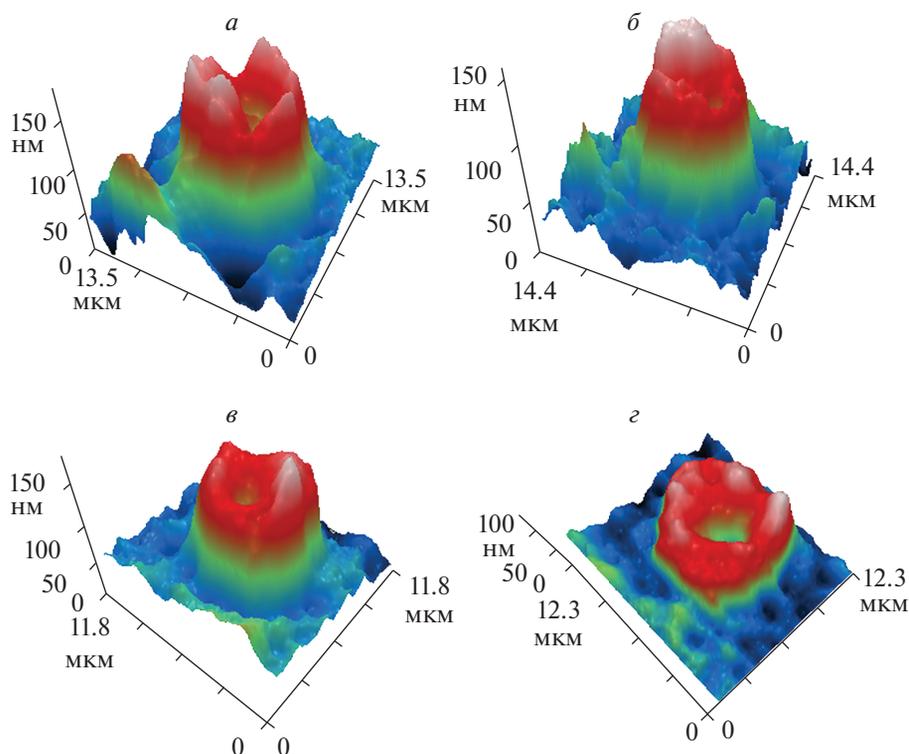
щение спектра длин волн фазовых портретов в сторону 650 нм.

Фазовые портреты эритроцитов при действии ЦФ в посттравматический период на начальном этапе характеризовались появлением значительного количества эхиноцитов (рис. 3а). Начиная с 3–7 сут, наблюдали восстановление формы эритроцитов, уменьшение количества эхиноцитов и сферичности клеток в экспериментальной группе ЧМТ + ЦФ (рис. 3б, в). При этом дискоциты имели различную степень двояковогнутости с сохранением шипов (рис. 3в). Длины волн фазовых портретов находились в области 600 нм. К 12-м сут посттравматического периода в группе ЧМТ + ЦФ фазовые портреты эритроцитов (рис. 3г) были сопоставимы с группой интактных (контрольных) животных (рис. 1).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при ЧМТ увеличиваются морфометрические показатели клеток, что сочетается с увеличением сфероэхиноцитов. Показано, что чем интенсивнее развивается патологический процесс, тем сильнее проявляется стресс, что обуславливает рост патологически измененных эритроцитов с сфероэхиноцитарной трансформацией (Дерюгина и др., 2019). Очевидно, что выявленные эффекты при ЧМТ определяются изменением их метаболических показателей. Сме-

щение спектра длин волн фазовых портретов свидетельствует об усилении окислительного метаболизма и снижении энергетических показателей клеток (Дерюгина и др., 2018). Интенсификация процессов перекисного окисления липидов сопряжена с увеличением количества гемина и опосредует образование спикул и формирование эхиноцитов (Сергунова и др., 2016; Дерюгина и др., 2021). При этом увеличение фазовой высоты может быть обусловлено уменьшением в клетках воды (Загубиженко и др., 2011), что оказывает негативное воздействие на протекающие биохимические процессы в эритроцитах. Кроме того, показано, что в ответ на снижение оксигенации компенсаторно увеличивается объем эритроцитов. Однако отдача кислорода в ткани при этом замедляется (Mohanty et al., 2014). Следует отметить, что при ухудшении морфологических показателей эритроцитов не только снижается скорость доставки кислорода к тканям в системе эритроцит–капилляр, но и уменьшается количество функционирующих капилляров (Hogan et al., 2019). Эритроциты с измененной структурой и морфологией способствуют закупорке сосудов (Kviatkovsky et al., 2017).

Внутрибрюшинное введение ЦФ способствовало восстановлению фазовых портретов эритроцитов, что, исходя из вышесказанного, свидетельствует о



**Рис. 3.** Фазовые портреты нефиксированных эритроцитов крыс после ЧМТ на 1-е, 3-и, 7-е и 12-е сут посттравматического периода в присутствии цитофлавина (группа ЧМТ + ЦФ).

снижении окислительных процессов, восстановлении состояния гемоглобина, улучшении метаболизма эритроцитов. Обсуждая выявленные эффекты сукцинатсодержащего препарата ЦФ, следует отметить, что антигипоксическое действие сукцината пролонгируется его влиянием на стабильность и активность чувствительного к гипоксии фактора HIF-1 $\alpha$ . Этот фактор является кислород-чувствительным протеиновым комплексом и запускает экспрессию целого ряда пептидов, в том числе эритропоэтина (EPO), белков-транспортеров глюкозы (GLUT 1, 3), ферментов гликолиза (Liu et al., 2020). Кроме того, выявлено наличие сукцинатных рецепторов на эритроидных клетках-предшественниках, действие которых сопряжено с G-белками и определяет повышение концентрации внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> (Grimolizzi, 2018). По всей видимости, введение ЦФ у крыс в послеоперационном периоде стимулирует эритропоэз и метаболизм клеток, что отражается на динамике фазово-интерференционных показателей эритроцитов.

Таким образом, полученные интерференционные изображения эритроцитов с детализацией морфологических параметров позволяют использовать их для качественной оценки морфофункциональной активности клеток и свидетельствуют, что при использовании ЦФ происходит восстановление со-

стояния гемоглобина, энергетического и окислительного метаболизма эритроцитов. На основании проведенной работы можно сделать следующие выводы.

1) Применение лазерной интерференционной микроскопии позволяет выявить существенные изменения фазовых изображений эритроцитов при ЧМТ.

2) Влияние ЦФ на морфометрические показатели эритроцитов в посттравматическом периоде проявляется в восстановлении фазовой высоты, фазового диаметра, площади, объема, периметра эритроцитов, начиная с 3–7 сут после травмы, что сочетается с уменьшением количества эхиноцитов и длин волн фазовых портретов клеток.

3) Анализ интерференционных изображений эритроцитов позволяет провести качественную оценку функциональной активности клеток, свидетельствуя о ее снижении при ЧМТ и восстановлении при действии ЦФ.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты выполнены в соответствии с требованиями этического комитета Института биологии и биомедицины Национального исследовательского Нижегород-

родского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-34-90081).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Василенко И.А., Метелин В.Б., Игнатъев П.С., Кардашова З.З., Лифенко Р.А.* 2018. Диалог с клеткой: диагностическая real-time технология на основе лазерной интерферометрии. Альманах клинической медицины Т. 46. № 8. С. 748. (*Vasilenko I.A., Metelin V.B., Ignat'ev P.S., Kardashova Z.Z., Lifenko R.A.* 2018. A dialogue with the cell: diagnostic real-time technology based on laser interferometry. *Almanac Clinical Med.* V. 46. № 8. P. 748.)
- Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатъев П.С., Белов А.А., Петров В.А.* 2021. Диагностические возможности анализа эритроцитов методом лазерной интерференционной микроскопии. Клиническая лабораторная диагностика. Т. 66. № 1. С. 22. (*Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Ignatiev P.S., Belov A.A., Petrov V.A.* 2021. Diagnostics possibilities of erythrocytes analysis by the method of laser interference microscopy. *Russ. Clinical Laboratory Diagnostics.* V. 66. № 1. P. 22.)
- Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатъев П.С., Лодяной М.С., Самodelкин А.Г.* 2019. Изменение фазового портрета и электрофоретической подвижности эритроцитов при различных видах заболеваний. Современные технологии в медицине. Т. 11. № 2. С. 63. (*Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Ignatiev P.S., Lodyanoy M.S., Samodelkin A.G.* 2019. Alterations in the phase portrait and electrophoretic mobility of erythrocytes in various diseases. *Modern Technol. Med.* V. 11. № 2. P. 63.)
- Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатъев П.С., Таламанова М.Н., Самodelкин А.Г.* 2018. Возможности интерференционной микроскопии в изучении прижизненного состояния эритроцитов при воздействии на них низкоинтенсивным лазером для коррекции стресса. Современные технологии в медицине. Т. 10. № 4. С. 78. (*Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Ignatiev P.S., Talamanova M.N., Samodelkin A.G.* 2018. The capabilities of interference microscopy in studying the in vitro state of erythrocytes exposed to low-intensity laser radiation for stress correction. *Modern Technol. Med.* V. 10. № 4. P. 78.)
- Джумагазиев А.А., Рахимова Л.Р.* 2015. Применение метаболических препаратов для реабилитации новорожденных с церебральной ишемией. Доктор. Ру. Т. 106–107. № 5–6. С. 63. (*Dzhumagaziev A.A., Rakhimova L.R.* 2015. Use of Metabolic Agents in Rehabilitation of Newborns with Cerebral Ischemia. *Doctor. Ru.* V. 106–107. № 5–6. P. 63.)
- Загубиженко М.В., Юсипович А.И., Пирутин С.К., Минаев В.Л., Кудряшов Ю.Б.* 2011. Использование метода лазерной интерференционной микроскопии для исследования состояния перитонеальных макрофагов мыши, облученных ультрафиолетовым светом. Радиационная биология. Радиоэкология. Т. 51. № 6. С. 715. (*Zagubizhenko M.V., Yusipovich A.I., Pirutin S.K., Minaev V.L., Kudryashov Yu.B.* 2011. Using the method of laser interference microscopy to study the state of mouse peritoneal macrophages irradiated with ultraviolet light. *Radiat. Biol. Radioecol.* V. 51. № 6. P. 715.)
- Сергунова В.А., Черняев А.П., Козлов А.П., Ближнюк У.А., Борщеговская П.Ю., Козлова Е.К., Черныш А.М.* 2016. Наноструктура мембран эритроцитов при интоксикации крови. Исследование с помощью атомной силовой микроскопии. Альманах клинической медицины. Т. 44. № 2. С. 234. (*Sergunova V.A., Chernyaev A.P., Kozlov A.P., Bliznyuk U.A., Borshchegovskaya P.Yu., Kozlova E.K., Chernysh A.M.* 2016. The nanostructure of erythrocyte membranes under blood intoxication: an atomic force microscopy study. *Almanac Clinical Med.* V. 44. № 2. P. 234.)
- Царёв А.В.* 2018. Состояние гемодинамики при проведении терапевтической гипотермии в комплексе интенсивной терапии тяжелой черепно-мозговой травмы. Вестник проблем биологии и медицины. Т. 142. № 1. С. 213. (*Tsarev A.V.* 2018. The state of hemodynamics in the carrying out therapeutic hypothermia in the of intensive care of severy trauma brain injury. *Bulletin of Problems, Boil. Med.* V. 142. P. 213.)
- Цымбалюк В.И., Кочин О.В.* 2008. Экспериментальное моделирование черепно-мозговой травмы. Украинский нейрохирургический журн. № 2. С. 10–12. (*Tsybalyuk V.I., Kochin O.V.* 2008. Eksperimental'noe modelirovanie cherepno-mozgovoј travmy. *Ukrainskij Neirokhirurgicheskij J.* № 2. P. 10.)
- Ciccoli L., De Felice C., Paccagnini E.* 2012. Morphological changes and oxidative damage in Rett Syndrome erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* V. 1820. P. 511.
- Grimolizzi F., Arranz L.* 2018. Multiple faces of succinate beyond metabolism in blood. *Haematologica.* V. 103. P. 1586.
- Hogan B., Shen Z., Zhang H, Misbah Ch., Barakat Al.* 2019. Shear stress in the microvasculature: influence of red blood cell morphology and endothelial wall undulation. *Bio-mech. Model Mechanobiol.* V. 18. P. 1095.
- Kviatkovsky I., Zeidan A, Yeheskely-Hayon D., Shabad E.L., Dann E.J., Yelin D.* 2017. Measuring sickle cell morphology during blood flow. *Biomed. Opt. Express.* V. 8. P. 1996.
- Liu Z., Wu Z., Fan Y., Fang Y.* 2020. An overview of biological research on hypoxia-inducible factors (HIFs). *Endokrynol. Pol.* V. 71. P. 432.
- Mohanty J.G., Nagababu E., Rifkind J.M.* 2014. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front. Physiol.* V. 84. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00084>

## Erythrocyte Condition in the Post-Traumatic Period of Craniocerebral Trauma under the Action of Cytoflavin. Assessment by Laser Interference Microscopy

A. V. Deryugina<sup>a</sup>, A. V. Polozova<sup>a, b, \*</sup>, M. N. Ivashchenko<sup>a</sup>, P. S. Ignatiev<sup>c</sup>, and V. B. Metelin<sup>d, e</sup>

<sup>a</sup>Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

<sup>b</sup>Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, 603005 Russia

<sup>c</sup>Yalamov Ural Optical and Mechanical Plant, Ekaterinburg, 620100 Russia

<sup>d</sup>Kosygin Russian State University, Moscow, 117997 Russia

<sup>e</sup>Vladimirsky Moscow Regional Clinical Research Institute, Moscow, 129110 Russia

\*e-mail: shumilowanastya@gmail.com

In this study, we considered complex phase micromorphometry of red blood cells in traumatic brain injury (TBI) and in response to therapy with cytoflavin in the post-traumatic period. TBI was simulated by free fall of a weight on the parietal-occipital region of the skull. The animals of experimental group was intraperitoneally injected daily with cytoflavin (LLC "NTFF "POLISAN", St. Petersburg) in the dose 0.2 mL/kg, the control animals were injected with isotonic sodium chloride solution in the same volume for 10 days. Blood tests were performed out 1, 3, 7 and 12 days after injury. TBI caused an increase in the phase height and phase diameter, volume, area, and average diameter of red blood cells on the 1st–7th days relative to the values of the intact group. These changes were combined with echinocytic and spherocytic transformation of red blood cells and a shift in the wavelength spectrum of phase portraits towards 650 nm. The effect of cytoflavin on the morphometric parameters of red blood cells in the post-traumatic period was manifested in the restoration of the phase height, phase diameter, area, volume, perimeter of red blood cells. Restoration of erythrocyte shape, reduction of echinocyte number, sphericity of cells, wavelength of phase portraits up to 600 nm were observed from 3–7 days under cytoflavin action. The potential of laser interference microscopy for non-invasive examination of erythrocytes in traumatic brain injury and the effects of cytoflavin in the post-traumatic period has been evaluated. Analysis of interference images of red blood cells demonstrates a decrease in the oxidative processes in cells, restoration of hemoglobin state, improvement of erythrocyte metabolism of red blood cells under the action of cytoflavin in the post-traumatic period of TBI.

**Keywords:** laser interference microscopy, erythrocytes, cytoflavin, traumatic brain injury