

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-1-142-152

ОЦЕНКА АДГЕЗИИ, ПРОЛИФЕРАЦИИ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПУПОЧНОЙ ВЕНЫ ЧЕЛОВЕКА, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НА ПОВЕРХНОСТИ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ НЕТКАНЫХ МАТРИКСОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ RGD-ПЕПТИДАМИ

Л.В. Антонова¹, В.Н. Сильников², М.Ю. Ханова¹, Л.С. Королева², И.Ю. Серпокрылова²,
Е.А. Великанова¹, В.Г. Матвеева¹, Е.А. Сенокосова¹, А.В. Миронов¹, Е.О. Кривкина¹,
Ю.А. Кудрявцева¹, Л.С. Барбараш¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация

² ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН, Новосибирск, Российская Федерация

Тканевая инженерия является многообещающим направлением для изготовления сосудистых графтов малого диаметра. В последние годы разработан ряд стратегий для придания полимерным поверхностям сосудистых протезов способности селективно адгезировать эндотелиальные клетки. Перспективной для модифицирования является последовательность аргинин–глицин–аспарагиновая кислота (RGD) – сайт клеточной адгезии, присутствующий на многих белках внеклеточного матрикса. На эффективность прикрепления эндотелиальных клеток может влиять как структура RGD-пептида, так и протяженность линкерной группы. **Цель** – определить оптимальный способ модифицирования RGD-пептидами нетканых матриксов из полигидроксибутирата/валерата и поликапролактона (PHBV/PCL), повышающий адгезию, жизнеспособность и пролиферацию эндотелиальных клеток. **Материалы и методы.** Методом электроспиннинга изготовлены трубчатые полимерные матриксы диаметром 4 мм из PHBV/PCL. Для модифицирования поверхности полимерных каркасов использовали 4,7,10-триокса-1,13-тридекандиамин, гексаметилендиамин, глутаровый альдегид, нингидрин, аскорбиновую кислоту, циклический пептид с[RGDFK], RGDK, AhRGD. Качество проведенной модификации оценивали с помощью нингидринового теста и посредством определения аргинин-содержащего пептида. Структуру поверхности матриксов до и после модифицирования изучали методом сканирующей электронной микроскопии. Исследование адгезии, жизнеспособности и пролиферации эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVeC), культивируемых в течение 7 суток на поверхности матриксов с и без RGD, изучали с помощью флуоресцентной и сканирующей лазерной микроскопии после предварительного окрашивания клеток флуоресцентными ядерными красителями этидиумом бромидом и Hoechst 33342, а также набором на пролиферацию Click-iTTM Plus EdU Alexa Fluor™ 488 Imaging Kit. **Результаты.** Большой биодоступностью и активностью обладали RGD-пептиды, связанные с поверхностью матриксов посредством длинного линкера (4,7,10-триокса-1,13-тридекандиамин). Высокая клеточная адгезия, жизнеспособность и пролиферация отмечены на поверхности матриксов, модифицированных RGDK и с[RGDFK], тогда как их парные аналоги с коротким линкером (гексаметилендиамин) демонстрировали низкие результаты клеточной жизнеспособности даже на фоне удовлетворительной клеточной адгезии. **Заключение.** Нетканые матриксы на основе PHBV/PCL, модифицирование поверхности которых проведено с использованием 4,7,10-триокса-1,13-тридекандиамин, демонстрировали лучшие результаты в плане адгезии HUVeC и последующего сохранения клеточной жизнеспособности и пролиферации, а RGD-содержащие пептиды RGDK и с[RGDFK] были более тропны к рецепторам эндотелиальных клеток.

Ключевые слова: тканевая инженерия, биodeградируемые полимеры, сосудистый графт, модифицирование поверхности, RGD-пептиды, эндотелиальные клетки.

Для корреспонденции: Антонова Лариса Валерьевна. Адрес: 650002, Кемерово, Сосновый бульвар, 6. Тел. (3842) 64-38-02. E-mail: antonova.la@mail.ru

For correspondence: Antonova Larisa Valeryevna. Address: 6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation. Tel. (3842) 64-38-02. E-mail: antonova.la@mail.ru

ADHESION, PROLIFERATION AND VIABILITY OF HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS CULTURED ON THE SURFACE OF BIODEGRADABLE NON-WOVEN MATRICES MODIFIED WITH RGD PEPTIDES

L.V. Antonova¹, V.N. Silnikov², M.Yu. Khanova¹, L.S. Koroleva², I.Yu. Serpokrilova², E.A. Velikanova¹, V.G. Matveeva¹, E.A. Senokosova¹, A.V. Mironov¹, E.O. Krivkina¹, Yu.A. Kudryavtseva¹, L.S. Barbarash¹

¹ Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Tissue engineering is a promising area for the production of small-diameter vascular grafts. In recent years, a number of strategies have been developed to make the polymer surfaces of vascular prostheses capable to selectively adhesion of endothelial cells. The arginine–glycine–aspartic acid (RGD) sequence (a cell adhesion site that is present on many extracellular matrix proteins) is the promising target for modification. The efficiency of attachment of endothelial cells can be influenced both by the structure of RGD peptide and the extent of linker group. **Aim:** to determine the optimal method for modification of non-woven matrices of polyhydroxybutyrate/valerate and polycaprolactone (PHBV/PCL) by RGD-peptides leading to the increasing of adhesion, viability and proliferation of endothelial cells. **Materials and methods.** Electrospinning was used to produce 4 mm diameter tubular polymer matrices from PHBV/PCL. Modification of surface of polymer scaffolds was performed using 4,7,10-trioxa-1,13-tridekandiamin, hexamethylenediamine, glutaraldehyde, ninhydrin, ascorbic acid, a cyclic peptide c [RGDFK], RGDK, AhRGD. The quality of modification was assessed by ninhydrin test and determination of arginine-containing peptide. The structure of the surface of matrices before and after modification was studied by scanning electron microscopy. Adhesion, viability and proliferation of Human umbilical vein (HUVEC) endothelial cells cultured for 7 days on the surface of matrices in the presence of RGD and without one were examined using fluorescence and laser scanning microscopy after the cells were pre-stained with fluorescent nuclear dyes (ethidium bromide and Hoechst 33342), and also by special kits for proliferation assessment (Click-iTTM Plus EdU Alexa Fluor™ 488 Imaging Kit). **Results.** RGD peptides bound to the matrix surface via a long linker (4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine) were characterized by the increased bioavailability and activity. High level of cell adhesion, viability and proliferation were noted on the surface of RGDK and c[RGDFK] modified matrices, whereas their paired analogues with a short linker (hexamethylenediamine) showed low results of cellular viability even against satisfactory cell adhesion. **Discussion.** Non-woven matrices based on PHBV/PCL and modified using 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine showed better results in case of adhesion of HUVEC and subsequent preservation of cell viability and proliferation. RGD-containing peptides of RGDK and c [RGDFK] were more tropic to endothelial cell receptors.

Key words: tissue engineering, biodegradable polymers, vascular grafts, surface modification, RGD peptides, endothelial cells.

Высокая распространенность сердечно-сосудистых заболеваний обуславливает потребность в сосудистых протезах малого диаметра для хирургического лечения этих процессов в случае имеющих к тому показаний. На сегодняшний день клиническим стандартом для проведения шунтирующих операций и реконструкции сосудов малого диаметра являются аутологичные кровеносные сосуды. Но последние не всегда доступны для проведения операций. Синтетические протезы на основе Дагрон или ePTFE демонстрируют низкую проходимость при диаметре меньше 5 мм вследствие тромбоза и гиперплазии неоинтимы.

Тканевая инженерия является многообещающим направлением для изготовления сосудистых графтов малого диаметра [1]. Альтернативой сосудистого

аналога артерий и вен малого диаметра может стать функционально активный биodeградируемый сосудистый протез, обладающий пролонгированной резорбцией и способный замещаться во времени собственными клетками и тканями пациента, формируя на месте каркаса новый сосуд.

В последние годы разработан ряд стратегий для улучшения или придания полимерным поверхностям сосудистых протезов способности селективно адгезировать на своей внутренней поверхности эндотелиальные клетки. Большинство из них заключаются в иммобилизации на поверхность специфических белков клеточной адгезии и биоактивных пептидов [2].

Последовательность аргинин–глицин–аспарагиновая кислота (RGD) представляет собой сайт кле-

точной адгезии, присутствующий на многих белках внеклеточного матрикса (к примеру, фибронектин, ламинин, витронектин, фибриноген, фактор фон Виллебранда и остеопонтин) [3]. Данная последовательность является одним из ключевых лигандов для интегринов – рецепторов, которые ответственны за клеточную адгезию, миграцию, пролиферацию, дифференцировку и выживание [4]. В сравнении с белками биоактивные RGD-содержащие пептиды обладают более простой структурой и более высокой химической стабильностью [2].

Положительный эффект RGD-пептидов на жизнеспособность клеток на пленках из PCL был впервые показан Gabriel с соавторами [5]. Ковалентная иммобилизация RGD-пептидов на поверхностях PCL привела к 11-кратному повышению адгезии эндотелиальных клеток в сравнении с поверхностями, не содержащими RGD [5]. Данные результаты были далее подтверждены на других клеточных линиях [6]. В настоящее время в литературе описано использование широкого спектра пептидов, содержащих RGD-фрагмент [7], однако какое-либо обоснование большей предпочтительности к структуре того или иного пептида в литературе отсутствует.

Ранее было показано, что на эффективность прикрепления фибробластов Swiss 3T3 к поверхности золота, модифицированной гидрофобными молекулами, напрямую влияет длина линкерных групп, связывающих RGD-пептид с поверхностью. Лучшие результаты были получены при использовании наиболее протяженных линкерных групп (гексаэтиленгликоль, содержащий 21 атом в линкерной группе) [8]. Результаты проведенных исследований показали, что длина спейсерной группы (полиглициновая линкерная группа) достоверно влияет на адгезию и пролиферацию фибробластов в двухмерном и трехмерном матриксах на основе альгинатных гелей. Установлено, что эффективность адгезии значительно возрастает с увеличением длины линкерной группы до 6 глициновых звеньев (18 атомов в линкерной группе). Дальнейшее увеличение числа остатков глицина (6–20) практически не приводит к дальнейшему увеличению эффективности адгезии [9].

Таким образом, несмотря на ограниченное число литературных данных, можно предположить, что на биосовместимость полимерных матриксов может значимо влиять протяженность линкерной группы и структура RGD-пептида.

Цель работы – определить оптимальный способ модифицирования RGD-пептидами нетканых матриксов PNBV/PCL, повышающий адгезию, жизнеспособность и пролиферацию эндотелиальных клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление полимерных матриксов PNBV/PCL

Трубчатые полимерные матриксы диаметром 4 мм изготовлены методом электроспиннинга на приборе Nanon-01A (MECC CO, Япония) из композиции полимеров полигидроксибутирата/валерата (PNBV) с процентным содержанием валерата до 10% (Sigma Aldrich, США) и поликапролактона (PCL) молекулярной массой 80 000 kDa (Sigma Aldrich, США). В качестве растворителя использовали неполярный органический растворитель хлороформ ХЧ (Вектон, Россия). Соотношение полимеров в растворе 1:2.

Определение оптимального времени первичной модификации поверхности аминоклассами

В работе использовали: 4,7,10-триокса-1,13-тридекандиамин, гексаметилендиамин, глутаровый альдегид, нингидрин, аскорбиновую кислоту (Sigma Aldrich, США), циклический пептид c[RGDFK], RGDK, AhRGD (НаноТех-С, Россия).

Полимерные трубчатые каркасы PNBV/PCL обрабатывали 10% раствором амина (гексаметилендиамин (амин 1) или 4,7,10-триокса-1,13-тридекандиамина (амин 2) в смеси изопропанола и воды 1 : 1 при 37 °С в течение 10, 30 и 60 мин. Здесь и при дальнейших обработках каждый матрикс находился в отдельном реакторе объемом 15 мл в горизонтальном положении при постоянном покачивании.

Далее матриксы PNBV/PCL последовательно промывали 3-кратным объемом реактора смесью изопропанола и воды 1 : 1, водой, 0,1% раствором тритон X-100, водой.

Методика определения степени модифицирования трубчатых матриксов диаминами [10]

Образцы полученных графтов длиной 1 см помещали в пробирки на 1,5 мл и обрабатывали 1 мл 1% раствора нингидрина в этаноле в присутствии 20 мкл 0,05% аскорбиновой кислоты. Реакцию проводили при 80 °С в течение 30 мин, графты тщательно промывали этанолом, сушили, растворяли в 500 мкл хлороформа. К полученному раствору добавляли 500 мкл изопропанола и измеряли оптическую плотность ($L = 1$ см) при длине волны 568 нм.

Для обоих аминов был построен калибровочный график зависимости поглощения от концентрации. В результате проведенных измерений было рассчитано количество аминокласс на поверхности:

$$C = DV/\epsilon LS,$$

где C – количество (моль) аминокрупп на 1 см^2 ; D – усредненное значение оптической плотности, полученное из трех экспериментов; V – объем анализируемого раствора в литрах (10^{-3}); ϵ – молярный коэффициент поглощения, рассчитанный из калибровочных графиков, равный $9810 \text{ Л/Моль} \times \text{см}$; L – толщина оптической кюветы (1 см); S – площадь в см^2 образца, взятого для исследования (d графта $0,4 \text{ см}$, $l = 1 \text{ см}$, $S = 1,26$).

Модифицирование матриксов PNBV/PCL RGD-пептидами

Полимерные трубчатые каркасы PNBV/PCL обрабатывали 10% раствором амина 1 в течение 60 мин либо 10% раствором амина 2 в течение 30 мин, как описано выше. После последней промывки матрикс обрабатывали 2% раствором глутарового альдегида в воде в течение 3 ч при $24 \text{ }^\circ\text{C}$, промывали 3-кратным объемом воды, затем помещали в растворы $0,2 \text{ мг/мл}$ пептида (RGDK – пептид 1, AhRGD – пептид 2, циклический пептид c[RGDFK] – пептид 3) в 50 мМ карбонатном буфере ($\text{pH} = 8,5$), содержащем $2,5 \text{ мМ}$ цианоборгидрид натрия, и выдерживали в течение 4 ч при $24 \text{ }^\circ\text{C}$. После присоединения пептида графты промывали 3-кратным объемом реактора 0,1% раствором тритон X-100 и водой.

Методика определения наличия аргинин-содержащего пептида [11, 12]

К 1 см^2 образца графта добавляли раствор $0,5 \text{ мл}$ α -нафтола ($0,01\%$ раствор в 95% этиловом спирте, 5% мочевины). После равномерного смачивания образцов в раствор добавляли 50 мкл раствора NaOH в спирте. Через 5 минут в реакционные смеси было добавлено по $0,5 \text{ мл}$ раствора брома (2% раствор в 8% водном растворе NaOH). Образец инкубировали 12 ч при комнатной температуре. Окрашивание образца в оранжево-красный цвет свидетельствовало о наличии гуанидиниевой группы аргинина.

Сканирующая электронная микроскопия поверхности матриксов до и после модифицирования RGD-пептидами

Внутренняя поверхность нетканых трубчатых каркасов PNBV/PCL площадью $0,5 \times 0,5 \text{ мм}$, не модифицированных и модифицированных RGD-пептидами ($n = 5$ в каждой группе), была изучена на сканирующем электронном микроскопе Hitachi S-3400N (Hitachi, Япония) с напылением золотом и палладием (Quorum Technologies) и образованием проводящего покрытия 30 нм .

Исследование адгезии, жизнеспособности и пролиферации HUVEC, культивируемых на модифицированных RGD-матриксах PNBV/PCL

Для культивирования клеток на внутренней поверхности матриксов трубчатые каркасы переводили в формат 2D путем разрезания вдоль длины.

Эндотелиальные клетки из пупочной вены человека (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) выделяли согласно адаптированному протоколу Jaffe с соавторами [13]. Последующее культивирование клеток проводили с использованием наборов Endothelial Cell Culture Medium Kit (BD Bioscience). В эксперименте использовали культуру HUVEC 4-го пассажа. Образцы стерильных матриксов с и без RGD-пептидов ($n = 5$ для каждой группы в трех дублях) с помощью $0,6\%$ раствора агарозы (Helicon, США) фиксировали на дно стерильных 24-луночных культуральных планшетов. На образцы матриксов вносили по $2,5 \times 10^5$ клеток и культивировали в течение 7 суток.

Абсолютное количество клеток на 1 мм^2 поверхности и относительное содержание погибших клеток на матриксах оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии на инвертированном микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия), предварительно окрашивая клетки на матриксах ядерными красителями этидиумом бромидом (Sigma Aldrich, США) $0,03 \text{ мг/мл}$ (оранжевое окрашивание ядер погибших клеток) и Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, США) 2 мкг/мл (синее окрашивание ядер всех адгезированных клеток). Красители вносили на образцы за 3 минуты до микроскопии.

Оценку пролиферативной активности адгезированных клеток проводили с помощью набора Click-iTTM Plus EdU Alexa Fluor™ 488 Imaging Kit (№ C10637, Thermo Fisher Scientific Inc, США) согласно инструкции производителя. Анализ основан на включении EdU (5-этинил-2,-дезоксидеоксиридин) в состав ДНК во время активного синтеза и последующей реакции с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488. Оценка флуоресцентного сигнала проведена на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM 700 (Carl Zeiss, Германия). Ядра клеток, находящихся в стадии активного деления, приобретали зеленое свечение. Культуру докрасивали ядерным красителем Dapi (Sigma Aldrich, США) в количестве 10 мкг/мл (синее свечение ядер всех адгезированных клеток) для определения общего количества адгезированных к поверхности клеток. Подсчет клеток осуществляли с помощью программы Image J 1.38 software (National Institutes of Health, Bethesda, США) в 10 различных полях зрения при увеличении $\times 200$ с последующим пересчетом на 1 мм^2 изучаемой по-

верхности. Исследования проведены на 10 случайно выбранных полях зрения в образцах каждой группы.

Относительное количество пролиферирующих клеток высчитывали по формуле: абс. кол-во пролиферирующих клеток · 100% / абс. кол-во всех адгезированных клеток.

Статистическая обработка данных

Полученные данные обработаны с использованием программы STATISTICA 6.0. Достоверность различий определена с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни для несвязных пар. Различия между группами принимали статистически значимыми при $p < 0,05$. Также была применена поправка Бонферрони на множественные сравнения. Данные представлены в виде медианы (Me) и 25% и 75% перцентилей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Модифицирование поверхности нетканых матриц PNBV/PCL пептидами, содержащими RGD-фрагмент, проводили в два этапа, согласно схеме, приведенной на рис. 1. На первом этапе был осуществлен частичный аминолиз сложноэфирных связей материала графта под действием диаминов. На втором этапе проведено введение RGD-пептида посредством кросс-сшивающего реагента.

С целью увеличения доступности RGD-пептида для рецепторов клеток при модифицировании был использован протяженный гидрофильный 4,7,10-триокса-1,13-тридекандиамин (рис. 1, общее число ато-

мов в линкерной группе 20) и гексаметилендиамин, широко описанный в литературе (общее число атомов в линкерной группе 13). Структура пептидов, использованных в работе, также приведена на рис. 1.

Выявлено, что степень первичного модифицирования поверхности возрастала с увеличением времени обработки диаминами. Плотность модифицирования графтов составила 5,8–8,6 нМ/см² поверхности в зависимости от условий обработки. Полученные результаты согласуются с литературными данными ($7,9 \times 10^{-9}$ моль/см²), полученными для модифицирования поликапролактона [5]. В табл. 1 приведены значения количества аминогрупп на 1 см² поверхности в зависимости от времени обработки. На основании полученных результатов для дальнейших экспериментов было выбрано следующее время модифицирования: 60 мин – для гексаметилендиамина и 30 мин – для 4,7,10-триокса-1,13-тридекандиамина.

На второй стадии осуществляли модифицирование поверхности графтов RGD-пептидами посредством глутарового альдегида с последующей обработкой цианоборгидридом натрия. В случае пептидов 1 и 3 присоединение к полимеру происходило через ε-аминогруппу лизина, а в случае пептида 2 – через аминогруппу 6-аминогексановой кислоты.

Наличие пептидов на полимерной поверхности подтверждено с использованием теста Сакагучи на наличие аргинина [11, 12]. Окраска образца не исчезала после промывки, что свидетельствовало о ковалентной пришивке пептида. Контрольный образец, не содержащий RGD-пептида, окрашивался

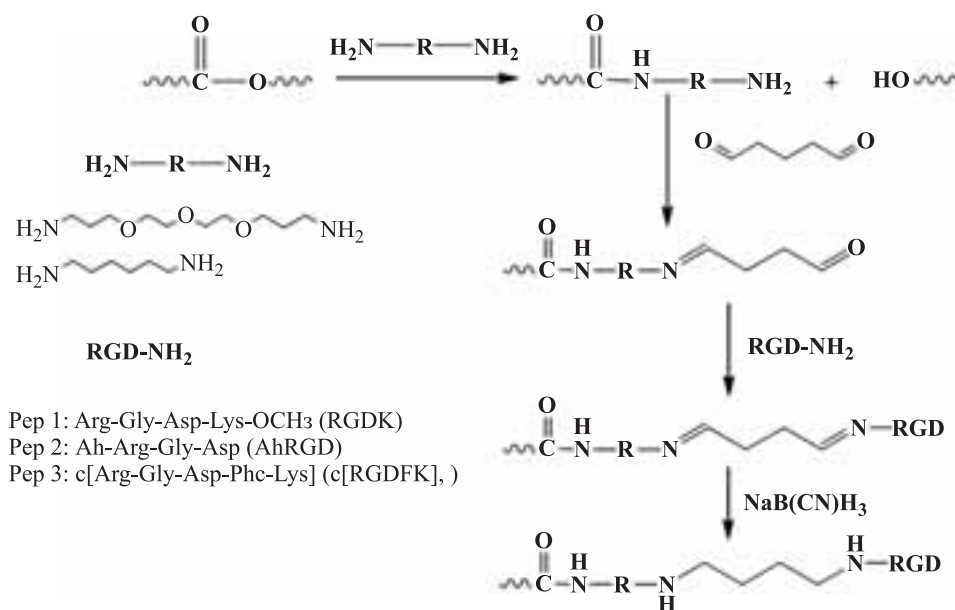


Рис. 1. Схема модифицирования нетканых матриц PNBV/PCL пептидами, содержащими RGD-фрагмент. Ah – 6-аминогексановая кислота

Fig. 1. A scheme for the modification of non-woven matrices of PNBV/PCL peptides containing the RGD fragment. Ah is 6-aminohexanoic acid

Таблица 1

Количество аминогрупп на 1 см² поверхности в зависимости от времени обработки полимерных каркасов PHBV/PCL**The number of amino groups per 1 cm² of surface, depending on the time of treatment of the polymeric scaffolds PHBV/PCL**

Время (мин)	Количество аминогрупп на см ²	
	Гексаметилендиамин	4,7,10-триокса-1,13-тридекандиамин
10	$5,0 \times 10^{-9}$	$5,8 \times 10^{-9}$
30	$6,2 \times 10^{-9}$	$8,2 \times 10^{-9}$
60	$8,9 \times 10^{-9}$	$8,0 \times 10^{-9}$

Таблица 2

Образцы полимерных графтов, полученные в ходе проведенного модифицирования**Samples of polymeric grafts obtained during the modification**

	Пептид 1 (RGDK)	Пептид 2 (AhRGD)	Пептид 3 (c[RGDFK])
4,7,10-триокса-1,13-тридекандиамин Амин 2	RGD 1	RGD 2	RGD 3
Гексаметилендиамин Амин 1	RGD 4	RGD 5	RGD 6

в светло-желтый цвет, окраска образца исчезала при промывках.

Таким образом, получено 6 образцов полимерных матриц, отличавшихся структурой пептида, содержащего RGD-фрагмент, и линкерной группой, соединяющей поверхность графта с пептидом (табл. 2).

При проведении сканирующей электронной микроскопии выявлено, что нетканые матрицы на основе PHBV/PCL, как не модифицированные, так и модифицированные RGD, обладали однородной высокопористой структурой, образованной хаотично расположенными изогнутыми нитями (рис. 2).

Модифицирование с использованием различных линкеров и RGD-пептидов не приводило к достоверным структурным изменениям поверхности матриц.

Однако в отличие от немодифицированных образцов матрицы, конъюгированные с RGD-пептидами, имели выпуклости на нитях полимера, хорошо заметные при большом увеличении. Данные неровности предположительно и являются RGD-пептидами, иммобилизованными на поверхности.

На немодифицированных нетканых матрицах отсутствовала адгезия и пролиферация HUVEC, что обусловлено отсутствием сайтов клеточной адгезии, являющихся обязательными для адгезии HUVEC.

Проведенное модифицирование матриц RGD-пептидами различной структуры обеспечило присутствие на полимерной поверхности сайтов клеточной адгезии. На всех представленных видах модифицированных матриц процесс адгезии HUVEC протекал со схожей динамикой (рис. 3).

По количеству адгезированных клеток в порядке убывания матрицы расположились следующим об-

разом: RGD3: 70,6 (41,2; 79,4) > RGD5: 64,7 (52,9; 94,1) > RGD6: 58,8 (38,2; 132,4) > RGD1: 50,0 (44,1; 88,3) > RGD4: 47,1 (20,6; 67,6) > RGD2: 41,2 (29,4; 100,0). Статистически значимых отличий по общему количеству клеток на 1 мм² между группами не установлено.

В соответствии с количеством погибших клеток на 1 мм² модифицированные матрицы выстроились иначе: RGD4: 29,4 (14,7; 52,9) > RGD6: 29,4 (17,6; 44,1) > RGD1: 23,5 (11,8; 70,6) > RGD3: 23,5 (17,6; 29,4) > RGD2: 11,8 (0,0; 20,6) > RGD5: 5,9 (0,0; 32,4). Абсолютное количество погибших клеток в группе RGD2 было статистически значимо ниже в сравнении с показателями групп RGD4 ($p = 0,04$) и RGD6 ($p = 0,02$).

При оценке относительного количества жизнеспособных и погибших клеток при различных вариантах модифицирования матриц RGD-пептидами выявлено, что по динамике данных показателей матрицы можно разделить на 2 группы (рис. 4).

В первой группе матриц (RGD1, RGD3, RGD5) отмечено более 50% жизнеспособных клеток (диапазон от 53 до 84%). Во второй группе (RGD2, RGD4, RGD6), наоборот, более 50% погибших клеток (диапазон от 54 до 77%).

На матрицах RGD1, RGD3 и RGD4 выявлено наибольшее относительное число пролиферирующих клеток: 10,0 (6,9; 12,5)%, 10,7 (0,0; 20,0)% и 11,1 (7,1; 23,1)% соответственно (рис. 5, 6).

Относительное число пролиферирующих клеток на поверхности модификации RGD6 составило 5,0 (0,0; 22,2)%. Наименьшее относительное число пролиферирующих клеток оказалось на матрицах

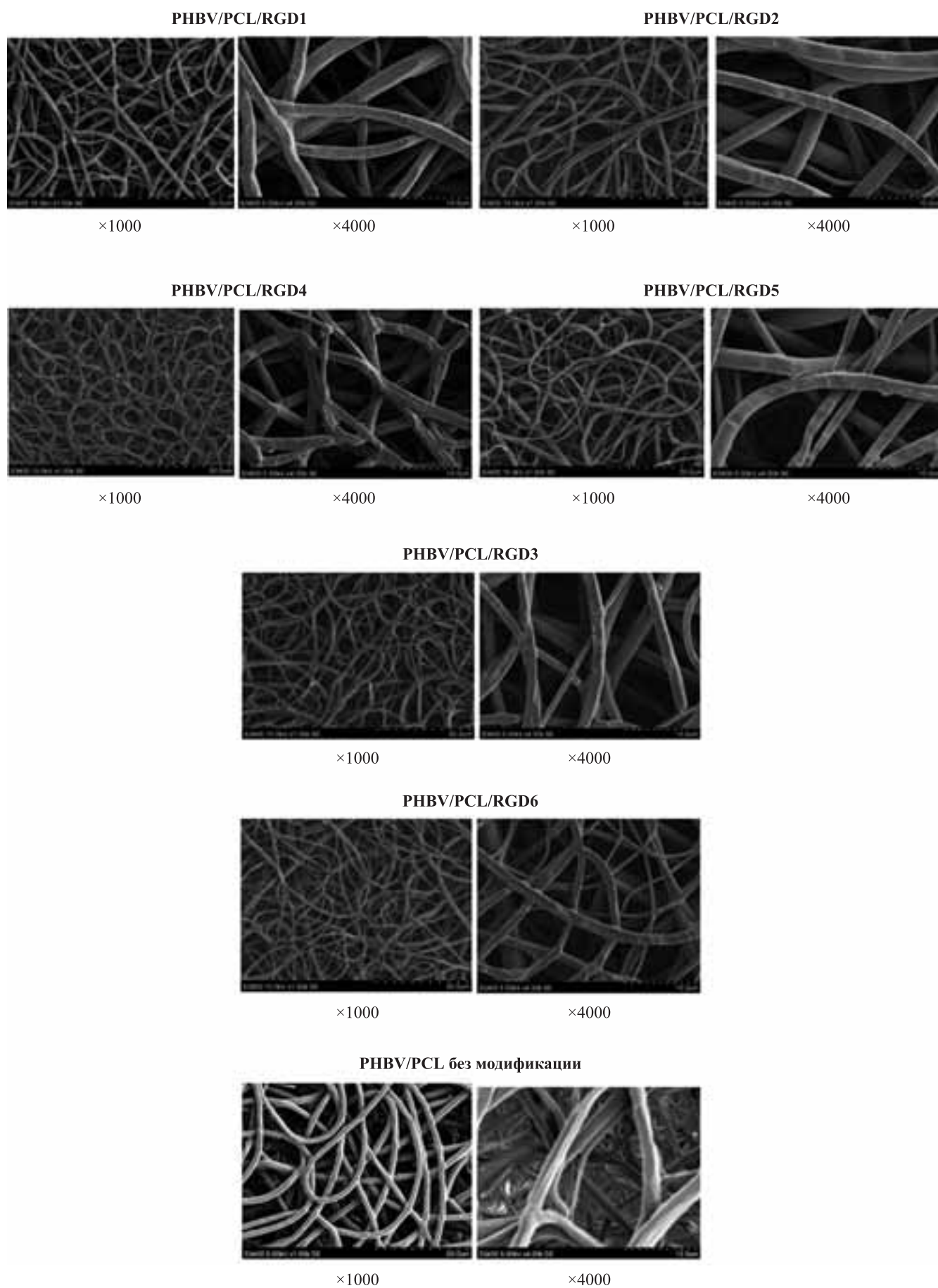


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия поверхности нетканых матриц PHBV/PCL с и без RGD
 Fig. 2. Scanning electron microscopy of the surface of non-woven matrices PHBV/PCL with and without RGD

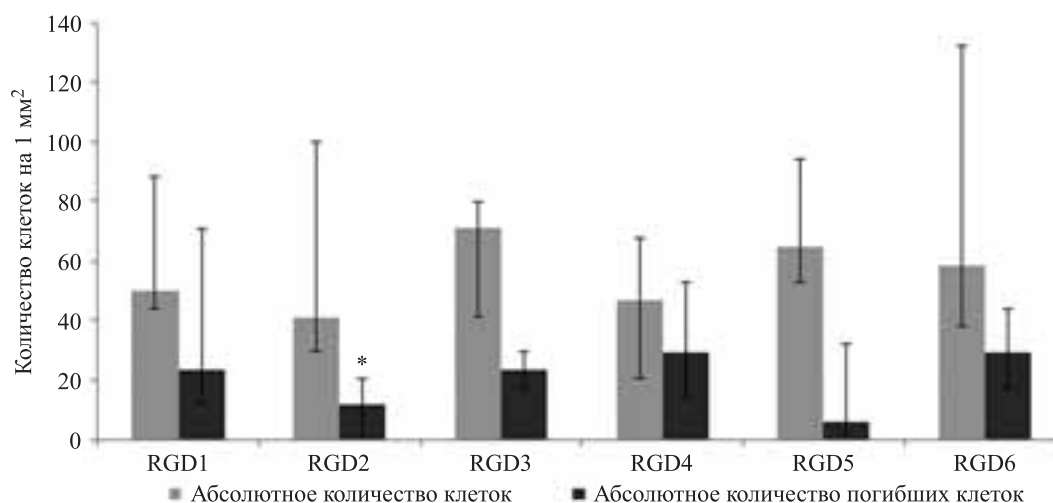


Рис. 3. Абсолютное количество адгезированных и погибших HUVEC на поверхности нетканых матриц PHBV/PCL/RGD. * – $p < 0,05$ относительно значений RGD4 и RGD6

Fig. 3. Absolute amount of adhesion and death of HUVEC on the surface of non-woven matrices PHBV/PCL/RGD. * – $p < 0.05$ with respect to the values of RGD4 and RGD6

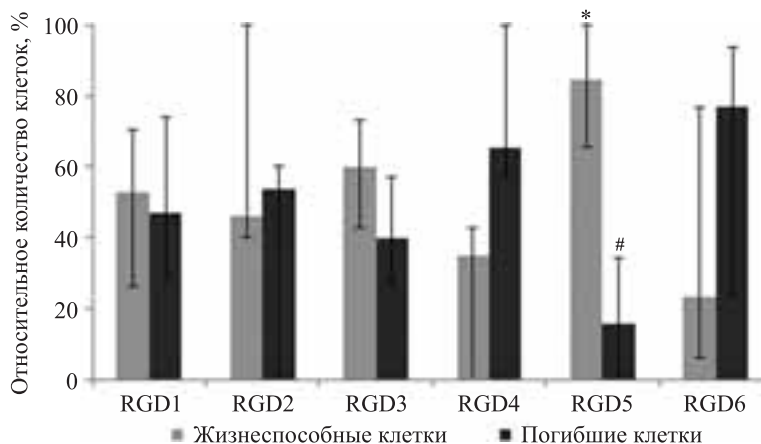


Рис. 4. Относительное количество жизнеспособных и погибших клеток на поверхности нетканых матриц PHBV/PCL/RGD. * – $p < 0,05$, # – $p < 0,05$ относительно значений RGD4

Fig. 4. The relative number of viable and dead cells on the surface of non-woven matrices PHBV/PCL/RGD. * – $p < 0.05$, # – $p < 0.05$ with respect to the values of RGD4

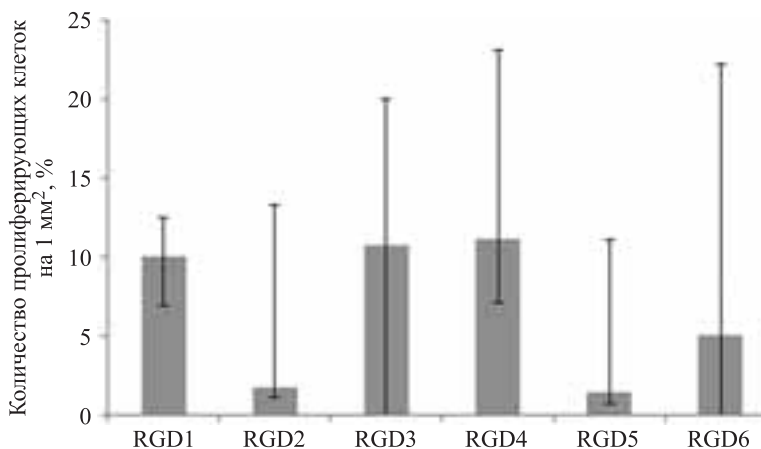


Рис. 5. Относительное число пролиферирующих клеток на поверхности нетканых матриц PHBV/PCL/RGD

Fig. 5. Relative number of proliferating cells on the surface of non-woven matrices PHBV/PCL/RGD

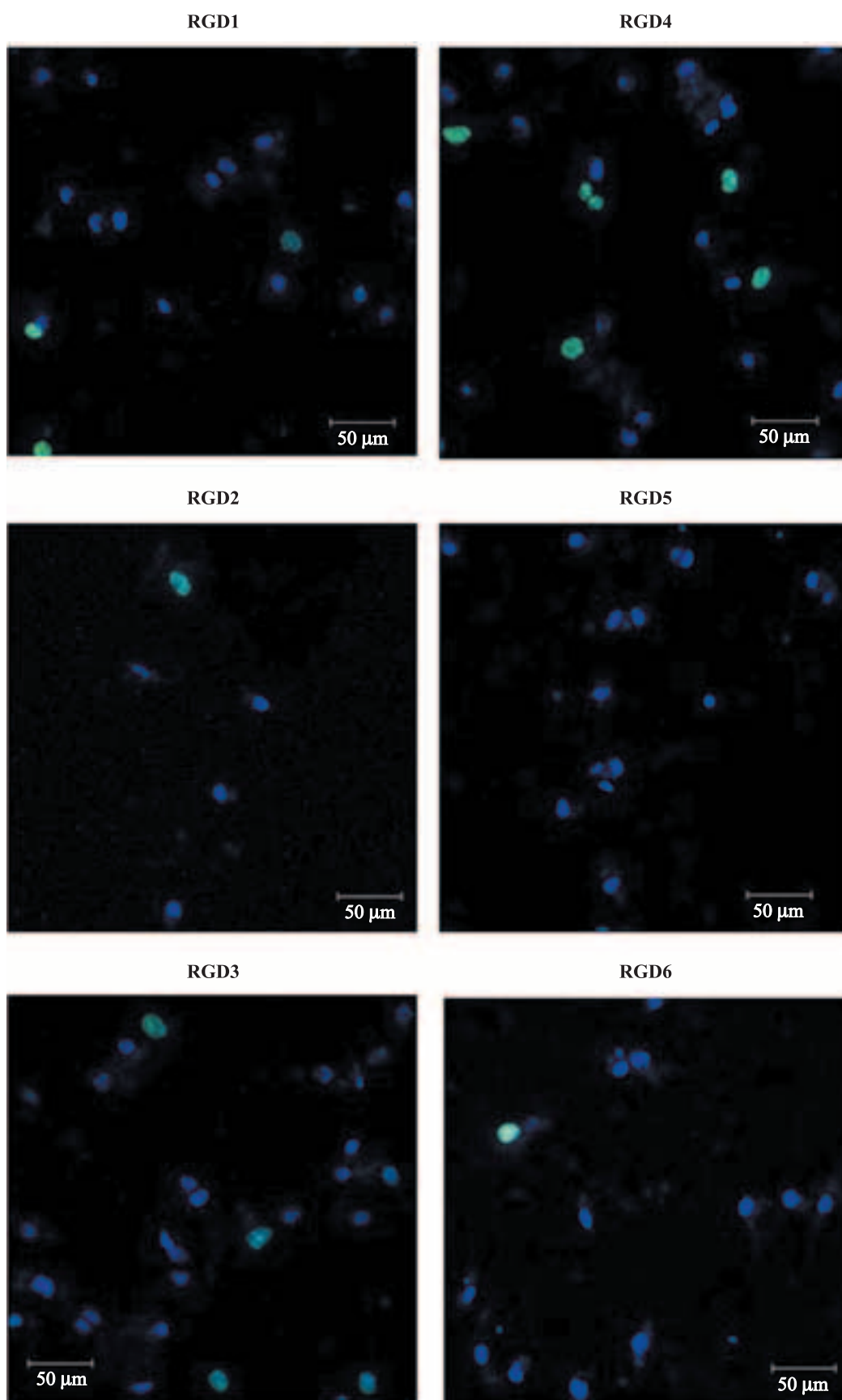


Рис. 6. Конфокальная лазерная микроскопия клеток на матриксах с RGD, предварительно окрашенных набором на пролиферацию Click-iTTM Plus EdU Alexa Fluor TM 488 Imaging Kit (синее свечение – ядра всех адгезированных клеток, зеленое свечение – ядра пролиферирующих клеток). ×200

Fig. 6. Confocal laser microscopy of cells on RGD matrices pre-stained with Click-iTTM Plus EdU Alexa Fluor TM 488 Imaging Kit (blue glow is the nuclei of all adherent cells, green glow is the nucleus of proliferating cells). ×200

RGD2 и RGD5: 1,7 (1,1; 13,3) % и 1,4 (0,6; 11,1) % соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании нетканые матрицы на основе PHBV/PCL, модифицированные различными пептидами, содержащими RGD-фрагмент, и линкерами, по сути, составляют пары, поверхность которых модифицирована одной разновидностью пептида, но с использованием разных линкеров (аминов). RGD1–RGD4: пептид RGDK, пришитый с использованием амина 2 или 1 соответственно. RGD2–RGD5: пептид AhRGD, пришитый с использованием амина 2 или 1 соответственно. RGD3–RGD6: циклический пептид с[RGDFK], пришитый с использованием амина 2 или 1. Предполагалось, что длинный линкер 4,7,10-триокса-1,13-тридекандиамин $H_2(CH_2)_3O(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_3NH_2$ (амин 2) будет лучше способствовать представлению сцепленного с ним RGD-пептида для взаимодействия с клеточными рецепторами.

Полученные результаты указали на большую биодоступность и активность содержащих RGD-фрагмент пептидов, связанных с полимерной поверхностью матриц PHBV/PCL посредством амина 2. Более высокая клеточная адгезия, жизнеспособность и пролиферация отмечены на поверхности матриц RGD1 и RGD3, тогда как их парные аналоги RGD4 и RGD6 с коротким линкером (амин 1) демонстрировали низкие результаты клеточной жизнеспособности даже на фоне удовлетворительной клеточной адгезии, что можно связать с недостаточной длиной амина 1. При этом высокая пролиферация эндотелиальных клеток на поверхности матриц RGD4 может быть обусловлена эффективной тропностью к эндотелиальным клеткам выбранной конфигурации самого пептида RGD. Таким образом, в паре RGD1–RGD4 эффективным явилось использование линкера 2, а выбранный RGD-пептид конфигурации RGDK обладал высокой тропностью к эндотелиальным клеткам. В паре RGD3–RGD6 клеточная адгезия, жизнеспособность и пролиферация были достоверно выше на RGD3, тогда как на поверхности RGD6 превалировали мертвые клетки и была снижена пролиферация эндотелиальных клеток.

Неудовлетворительные результаты клеточной адгезии, жизнеспособности и пролиферации получены в паре RGD2–RGD5. Использование пептида конфигурации AhRGD не приводило к пролиферации эндотелиальных клеток в процессе их жизнедеятельности на поверхности матриц RGD2 и RGD5, а смена линкера на амин 2 и вовсе способствовала клеточной гибели, и как следствие, значимому снижению числа адгезированных к поверхности RGD2 эндотелиоцитов спустя 7 суток культивирования.

Исходя из полученных данных, можно сделать однозначный вывод о влиянии других аминокислотных остатков в структуре RGD пептида на адгезию, жизнеспособность и пролиферацию клеток. В частности, выигрышные результаты наблюдали в случае наличия в структуре пептида молекулы лизина. При этом наилучшими оказались условия, когда остаток лизина (или точка присоединения пептида к линкерной группе) удален от остатка аргинина. Однако сравнению были подвергнуты всего три пептида, поэтому для определения оптимального строения пептида необходимы дальнейшие исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нетканые матрицы на основе PHBV/PCL, модифицирование поверхности которых проведено с использованием амина 2 (4,7,10-триокса-1,13-тридекандиамин $NH_2(CH_2)_3O(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_3NH_2$), демонстрировали лучшие результаты в плане адгезии HUVEC и последующего сохранения клеточной жизнеспособности и пролиферации, а RGD-содержащие пептиды RGDK и с[RGDFK] были более тропны к рецепторам эндотелиальных клеток.

Полученные результаты демонстрируют пригодность модифицирования пептидами RGDK или с[RGDFK] поверхности любых изделий, используемых для нужд сердечно-сосудистой хирургии, в случае необходимости их скорейшей эндотелизации.

Исследование выполнено в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» и в Институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН за счет средств интеграционного проекта «Биодеградируемый сосудистый графт малого диаметра, модифицированный функционально активными пептидами» комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН II.1 (№ 0546-2018-0001). Блок работ НИИ КПССЗ: «Разработка научных основ изготовления и модификации биодеградируемого сосудистого графта и его тестирования in vitro». Блок работ ИХБФМ СО РАН: «Модификация полимерного каркаса функционально активными пептидами и оценка качества проведенной модификации».

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Taggart DP. Current status of arterial grafts for coronary artery bypass grafting. *Ann Cardiothorac Surg.* 2013; 2 (4): 427–430.

2. Ren X, Feng Y, Guo J, Wang K, Li Q, Yang J et al. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chem Soc Rev.* 2015; 44 (15): 5680–5742.
3. Wang F, Li Y, Shen Y, Wang A, Wang S, Xie T. The functions and applications of RGD in tumor therapy and tissue engineering. *Int J Mol Sci.* 2013; 14 (7): 13447–13462.
4. Harburger DS, Calderwood DA. Integrinsignalling at a glance. *J Cell Sci.* 2009; (122): 159–163.
5. Gabriel M, van NieuwAmerongen GP, van Hinsbergh VW, Amerongen AV, Zentner A. Direct grafting of RGD-motif-containing peptide on the surface of polycaprolactone films. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2006; 17 (5): 567–577.
6. Gabriel M, Nazmi K, Dahm M, Zentner A, Vahl CF, Strand D. Covalent RGD modification of the inner pore surface of polycaprolactone scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2012; 23 (7): 941–953.
7. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials.* 2003; 24 (24): 4385–4415.
8. Houseman BT, Mrksich M. The microenvironment of immobilized Arg-Gly-Asp peptides is an important determinant of cell adhesion. *Biomaterials.* 2001; 22 (9): 943–955.
9. Lee JW, Park YJ, Lee SJ, Lee SK, Lee KY. The effect of spacer arm length of an adhesion ligand coupled to an alginate gel on the control of fibroblast phenotype. *Biomaterials.* 2010; 31: 5545–5551.
10. Santiago LY, Nowak RW, Rubin JP, Marra KG. Peptide-surface modification of poly(caprolactone) with laminin-derived sequences for adipose-derived stem cell applications. *Biomaterials.* 2006; 27: 2962–2969.
11. Lin HB, Sun W, Mosher DF, Garciaecheverria C, Schaufelberger K, Lelkes PI, Cooper SL. Synthesis, surface, and celladhesion properties of polyurethanes containing covalently grafted RGD-peptides. *J Biomed Mater Res.* 1994; 28: 329–342.
12. Parniak MA, Lange G, Viswanatha T. Quantitative determination of monosubstituted guanidines: a comparative study of different procedures. *J Biochem Biophys Methods.* 1983; 7: 267–276.
13. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *Clin Invest.* 1973; 52: 2745–2756.

*Статья поступила в редакцию 12.07.2018 г.
The article was submitted to the journal on 12.07.2018*