

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-2-83-93

КРИОГЕННО-СТРУКТУРИРОВАННЫЙ ГИДРОГЕЛЬ НА ОСНОВЕ ЖЕЛАТИНА КАК РЕЗОРБИРУЕМАЯ МАКРОПОРИСТАЯ МАТРИЦА ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ

А.М. Григорьев¹, Ю.Б. Басок¹, А.Д. Кириллова¹, В.А. Сургученко¹, Н.П. Шмерко¹,
В.К. Кулакова², Р.В. Иванов², В.И. Лозинский², А.М. Суббот³, В.И. Севастьянов¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГБУН «Институт элементоорганических соединений имени А.Н. Несмеянова»

Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

³ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней», Москва, Российская Федерация

Цель: исследование биологических свойств матрицы из криогенно-структурированного гидрогеля в форме макропористой желатиновой губки, а также возможности создания на ее основе клеточно-инженерных конструкций. **Материалы и методы.** Основными компонентами криогенно-структурированного гидрогеля были желатин (тип А), полученный из коллагена свиной кожи, N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид, (ЭДК) и мочевины (все – Sigma-Aldrich, США). Морфологию поверхности исследовали с использованием сканирующей электронной микроскопии. Степень набухания в воде образцов определяли гравиметрическим методом. Цитотоксичность исследовали на фибробластах мыши линии NIH 3T3 и мезенхимальных стромальных клетках жировой ткани человека (МСК ЖТч) с использованием IncuCyte ZOOM (EssenBioscience, США). Метаболическую активность МСК ЖТч оценивали с помощью реагентов PrestoBlue™ (Invitrogen™, США). Для создания клеточно-инженерных конструкций (КИК) использовали МСК ЖТч, клетки гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 или эндотелиальные клетки пупочной вены человека линии EA.hy926. Содержание альбумина в культуральной среде определяли методом иммуноферментного анализа. Скорость метаболизма аммиака оценивали после 90 минут инкубации с 1 mM хлоридом аммония (Sigma-Aldrich, США), разведенным в культуральной среде на 15-е сутки эксперимента. **Результаты.** Получение матрицы из криогенно-структурированного гидрогеля в форме макропористой желатиновой губки включало замораживание водного раствора смеси желатина и мочевины, удаление поликристаллов замерзшего растворителя лиофилизацией, экстракцию мочевины этанолом и обработку криоструктурата этанольным раствором ЭДК. Сканирующая электронная микроскопия позволила выделить три типа пор на поверхности носителя: крупные (109 ± 17 мкм), средние (39 ± 10 мкм) и малые (16 ± 6 мкм). Степень набухания в воде образцов матрицы составила $3,8 \pm 0,2$ г H₂O на 1 г сухого полимера. Установлена способность макропористой желатиновой губки в составе КИК поддерживать адгезию и пролиферацию МСК ЖТч, эндотелиальных клеток пупочной вены человека линии EA.hy926 и HepG2 в течение 28, 15 и 9 суток соответственно. Доказано наличие секреции альбумина и метаболизма аммиака при культивировании клеток HepG2 на желатиновой губке. **Заключение.** На примере клеточно-инженерной конструкции печени показана перспективность использования матрицы из макропористого криогенно-структурированного гидрогеля на основе желатина для создания продуктов тканевой инженерии.

Ключевые слова: криогенно-структурированный гидрогель, желатин, макропористая губка, тканевая инженерия, печень.

Для корреспонденции: Григорьев Алексей Михайлович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел. (499) 193-86-62. E-mail: bear-38@yandex.ru

Corresponding author: Alexey Grigoryev. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.
Phone: (499) 193-86-62. E-mail: bear-38@yandex.ru

CRYOGENICALLY STRUCTURED GELATIN-BASED HYDROGEL AS A RESORBABLE MACROPOROUS MATRIX FOR BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

A.M. Grigoriev¹, Yu.B. Basok¹, A.D. Kirillova¹, V.A. Surguchenko¹, N.P. Shmerko¹, V.K. Kulakova², R.V. Ivanov², V.I. Lozinsky², A.M. Subbot³, V.I. Sevastianov¹

¹ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

² Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Moscow, Russian Federation

³ Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Objective: to investigate the biological properties of a matrix made of cryogenically structured hydrogel in the form of a macroporous gelatin sponge, as well as the possibility of creating cell-engineered constructs (CECs) on its basis. **Materials and methods.** The main components of the cryogenically structured hydrogel were gelatin (type A) obtained from porcine skin collagen, N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, (EDC) and urea (all from Sigma-Aldrich, USA). Surface morphology was examined using scanning electron microscopy (SEM). The degree of swelling in water of the samples was determined by gravimetric method. Cytotoxicity was studied on NIH3T3, a fibroblast cell line isolated from a mouse, and on human adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells (hAMSCs) using IncuCyte ZOOM (EssenBioscience, USA). The metabolic activity of hAMSCs was assessed using PrestoBlue™ reagents (Invitrogen™, USA). To create CECs, we used hAMSCs, human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 or human umbilical vein endothelial cell lines EA.hy926. Albumin content in the culture medium was determined by enzyme immunoassay. Ammonia metabolism rate was assessed after 90 minutes of incubation with 1 mM ammonium chloride (Sigma-Aldrich, USA) diluted in a culture medium on day 15 of the experiment. **Results.** Obtaining a cryogenically structured hydrogel scaffold in the form of macroporous gelatin sponge included freezing an aqueous solution of a gelatin+urea mixture, removal of polycrystals of frozen solvent by lyophilization, extraction of urea with ethanol and treatment of the cryostructure with an ethanol solution of EDC. Scanning electron microscopy identified three types of pores on the carrier surface: large ($109 \pm 17 \mu\text{m}$), medium ($39 \pm 10 \mu\text{m}$), and small ($16 \pm 6 \mu\text{m}$). The degree of swelling in water of the matrix samples was $3.8 \pm 0.2 \text{ g H}_2\text{O per 1 g of dry polymer}$. The macroporous gelatin sponge as a part of CEC was found to have the ability to support adhesion and proliferation of hAMSCs, EA.hy926 and HepG2 for 28, 15 and 9 days, respectively. Albumin secretion and ammonia metabolism when HepG2 cells were cultured on the gelatin sponge were detected. **Conclusion.** The use of a matrix made from macroporous cryogenically structured gelatin-based hydrogel for tissue engineering products is shown to be promising using a cell-engineered liver construct as a case.

Keywords: cryogenically structured hydrogel, gelatin, macroporous sponge, tissue engineering, liver.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно прогнозам на ближайшие годы, острый дефицит донорских органов будет только расти, что стимулирует поиск альтернативных способов компенсации или замены функций поврежденных жизненно важных органов. Для этих целей наряду с использованием медикаментозных методов и искусственных органов перспективными представляются технологии, основанные на имплантации клеточно-инженерных конструкций (КИК), включающих матрицы-носители, нагруженные стволовыми и/или специализированными клетками [1].

В независимых исследованиях ряда научных групп показано, что создание КИК на основе резорбируемых матриц из биологических полимеров позволяет обеспечить близкое к природному внеклеточному матриксу микроокружение для обеспечения процессов адгезии, пролиферации, дифференцировки и функциональной активности клеток [2, 3]. Желатин, являющийся продуктом денатурации коллагена,

из которого наиболее часто формируют матрицы в виде губок, сеток и гидрогелей [4, 5], не только менее иммуногенен, но и подобно коллагену содержит аминокислотную последовательность Arg-Gly-Asp (RGD), обуславливающую его адгезивные свойства [6, 7]. Носители лекарственных веществ и клеток на основе желатина или в комбинации с другими природными или синтетическими полимерами достаточно широко применяются в различной форме, включая капсулы и микрокапсулы, микро- и наночастицы, микро- и нановолокна, гидрогели [8–10].

При создании КИК предпочтительными формами матриц являются макропористые системы, включая твердотельные полимерные каркасы и губки [11]. Открытая сеть взаимосвязанных макропор (от 100 до 350 мкм) обеспечивает беспрепятственное проникновение клеток и транспорт кислорода, продуктов жизнедеятельности и питательных веществ [12].

При этом функциональные свойства таких матриц в составе КИК зависят не только от пористости, размера и степени взаимосвязанности пор [13], но и от вида посеянных на них клеток. Так, например, для хондроцитов [14] и остеобластов [15] наилучшие результаты по адгезии и миграции для внутренней поверхности гидрогелевого матрикса достигнуты при наличии открытых пор размером 250–325 мкм, а для фибробластов – при размере открытых пор не более 100–160 мкм [16, 17].

Одним из технологических подходов к формированию 3D-носителей в виде губок является криогенное структурирование полимерных систем [18–21]. Когда в замороженном образце происходит формирование ковалентных или нековалентных узлов трехмерной сетки, сам такой процесс называют криотропным гелеобразованием, а получающиеся полимерные объекты – *криогелями*, если же гелеобразование отсутствует, то конечными продуктами (обычно после удаления замороженного растворителя) являются полимерные объекты, называемые *криоструктуратами* [22]. Макропористость и криогелей, и криоструктуратов является их характерной морфологической особенностью; она формируется поликристаллами замороженного растворителя, выполняющими функцию порогена [23].

Целью данной работы было исследование биологических свойств матрицы из криогенно-структурированного гидрогеля в форме макропористой желатиновой губки, а также возможности создания на ее основе клеточно-инженерных конструкций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение криогенно-структурированного гидрогеля на основе желатина

Для получения макропористых желатиновых губок [24] были использованы без дополнительной очистки желатин (тип А), полученный из коллагена свиной кожи, N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид (ЭДК) (все – Sigma-Aldrich Inc., США), мочевины (о. с. ч.) и 96% этанол (Реахим, РФ).

Сухой желатин диспергировали в рассчитанном объеме деионизированной воды и затем растворяли с перемешиванием при 60 °С. В приготовленном 6% растворе полимера растворяли мочевины для получения ее концентрации 1 моль/л. Далее этот раствор разливали по 2 мл в пластиковые чашки Петри (диаметр 40 мм), которые помещали на строго горизонтальную металлическую плиту в камере жидкостного криостата F-32 (Julabo, Германия) с заранее установленной отрицательной температурой, равной –20 °С. Образцы замораживали и выдерживали в течение 18 ч, а затем высушивали лиофильно с помощью сублимационной установки ALPHA 1-2 LD plus (Martin Christ, Германия). Сухие диски промывали этанолом

для растворения и удаления мочевины до ее отсутствия в промывной жидкости, а затем переносили в 0,05 М этанольный раствор ЭДК, где инкубировали с периодическим перемешиванием в течение 48 ч, и далее промывали диски 3 раза по 30 мин чистым этанолом, под слоем которого хранили полученные образцы при 4 °С.

Физико-химические свойства и микроструктура криогенно-структурированного желатинового носителя

Степень набухания в воде образцов макропористых желатиновых матриц определяли гравиметрическим методом. Для этого из набухшего в воде губчатого образца под нагрузкой 145 г на стеклянном фильтре под вакуумом (водоструйный насос) в течение 5 мин удаляли свободную жидкость. Полученный образец взвешивали и далее сушили (воздушный термостат SNOL 24/200, AB Utenos Elektrotechnika, Литва) при 105 °С до постоянного веса.

Величину степени набухания (S – swelling), являющуюся показателем плотности шивки 3D-полимерной сетки материала, вычисляли по формуле:

$$S = \frac{m_{\text{вл}} - m_{\text{сух}}}{m_{\text{сух}}} (\text{г H}_2\text{O} / \text{г полимера}),$$

где $m_{\text{вл}}$ – масса влажного образца, $m_{\text{сух}}$ – масса высушенного образца.

Морфологию поверхности и ближайшего подповерхностного слоя образцов изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с использованием лантаноидного контрастирования. Протокол обработки включал первичную промывку, выдержку 45 мин в контрастирующем растворе BioREE-A (ООО «Глаукон», Россия) и финальную промывку дистиллированной водой. После этого с поверхности образца удаляли избыток влаги воздушной кистью и размещали его на предметном столике микроскопа EVO LS10 (Zeiss, Германия). Наблюдения проводились в режиме низкого вакуума (EP, 70 Па), при ускоряющем напряжении 20–25 кВ. Изображения захватывались с помощью детектора обратно-рассеянных электронов (режим BSE). Размер пор криоструктурированного носителя определяли путем измерения 90 случайно выбранных пор на изображениях СЭМ с использованием программного обеспечения Image J (National Institutes of Health, USA).

Культуры клеток

Культуры фибробластов мыши линии NIH 3T3 (ATCC®CRL-1658™) и эндотелиальных клеток пупочной вены человека линии EA.hy926 (The human umbilical vein cell line EA.hy926, ATCC®CRL-2922™)

из коллекции ATCC (American Type Culture Collection) перед использованием хранили в жидком азоте при температуре $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. После разморозки фибробласты NIH 3T3 и ЭК EA.hy926 высевали в стандартные культуральные флаконы площадью 25 см^2 (CELLSTAR® Greiner Bio-One, Германия) и культивировали в соответствующей полной ростовой среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% телячьей сыворотки (ТС, Biosera, Германия) или эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), соответственно антибиотика и антимикотика Anti-Anti (Gibco® by Life Technologies™, СК) и 2 мМ аланил-глутамин (ПанЭко, Россия) в CO_2 инкубаторе при стандартных условиях: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, во влажной атмосфере, содержащей $(5 \pm 1)\% \text{ CO}_2$.

Культура мезенхимальных стромальных клеток, изолированных из жировой ткани человека (МСК ЖТч), была получена в ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России по ранее разработанной методике [25]. Культура клеток гепатоцеллюлярной карциномы линии HepG2 была взята из коллекции клеточных культур ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России. Перед использованием МСК ЖТч и HepG2 хранили в жидком азоте при температуре $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. После разморозки МСК ЖТч и HepG2 высевали в стандартные культуральные флаконы площадью 25 см^2 (CELLSTAR® Greiner Bio-One, Германия) и культивировали в полной ростовой среде DMEM/F12 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 10 мкг/мл основного фактора роста фибробластов человека (FGF-2, Peprotech, AF-100-18B, США), антибиотика и антимикотика Anti-Anti (Gibco® by Life Technologies™, СК), 1 мМ HEPES (Gibco® by Life Technologies™, СК) и 2 мМ аланил-глутамин (ПанЭко, Россия) в CO_2 -инкубаторе при стандартных условиях: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, во влажной атмосфере, содержащей $5 \pm 1\% \text{ CO}_2$. В экспериментах использовали МСК ЖТч V–VI пассажей.

Перед экспериментом клетки удаляли с поверхности культурального пластика с помощью диссоциирующего реагента TrypLE™ Express Enzyme (Gibco® by Life Technologies™, СК) и готовили суспензию с необходимой концентрацией клеток.

Исходное количество клеток в суспензии определяли на автоматическом счетчике клеток (TC20™ Automated Cell Counter, BIORAD, Сингапур) с одновременным анализом жизнеспособности по исключению красителя трипанового синего (BIORAD, # 145-0013, Сингапур).

Оценка цитотоксичности носителя

Для определения цитотоксичности образцов желатиновых губок фибробласты мыши линии NIH 3T3

высевали в культуральные плоскодонные 6-луночные планшеты (CELLSTAR® Greiner Bio-One, Германия) в концентрации 5×10^5 клеток на лунку и инкубировали в течение 24 ч при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ во влажной атмосфере, содержащей $5 \pm 1\% \text{ CO}_2$, до образования $80 \pm 10\%$ монослоя, после чего на поверхность клеточного монослоя помещали исследуемые образцы желатиновых губок в виде дисков диаметром 6 мм и толщиной 2 мм, которые предварительно подвергали тщательной отмывке от остатков этанола двумя порциями стерильной дистиллированной воды и оставляли на сутки в полной ростовой среде при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Отрицательным контрольным образцом служила полная ростовая среда, положительным контрольным образцом – стандарт цинка одноэлементный водный 10 мг/мл (Sigma-Aldrich, США).

Для более детальной оценки динамики роста использовали дополнительные планшеты, в которых клетки с момента внесения инкубировали в присутствии образцов губки с использованием системы IncuCyte ZOOM (EssenBioscience, США), позволяющей оценивать плотность монослоя в автоматическом режиме каждые 2 ч на протяжении всего эксперимента с одновременным построением кривых роста. Длительность эксперимента составила 90 ч.

Оценка поддержки адгезии и пролиферации клеток

Для сравнительного исследования влияния гидрогелевых матриц на параметры роста МСК ЖТч использовали образцы желатиновых губок (цилиндры диаметром 6 мм и толщиной 2 мм) и биополимерный микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ, АО «БИОМИР сервис», Россия) (0,2 мл) со следующими характеристиками: средний размер микрочастиц – $145,79 \pm 0,09\text{ мкм}$; модуль упругости – $1170 \pm 12\text{ Па}$; модуль вязкости – $62,9 \pm 7,9\text{ Па}$; время резорбции – до 9 месяцев. Ранее была показана эффективность использования БМКГ в качестве матрицы для создания различных медико-биологических продуктов [1, 26].

Для оценки способности исследуемых образцов поддерживать адгезию и пролиферацию культур МСК ЖТч на поверхность образца, предварительно насыщенного полной ростовой средой в течение 24 ч при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, капельно наносили по 1 мл клеточной суспензии с концентрацией 1×10^5 кл/мл. Образцы помещали в 50-мл центрифужные пробирки и оставляли в CO_2 -инкубаторе на 1 ч для прикрепления клеток, после чего уровень полной ростовой среды в пробирках доводили до 5 мл и продолжали культивирование при стандартных условиях. Для сохранения газообмена крышки пробирок закрывали неплотно. На 1, 3, 6, 9 и 14-е сутки культивирования отбирали по три порции полной ростовой среды для проведе-

ния теста на метаболическую активность с реагентом PrestoBlue™ HS Cell Viability Reagent (Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу, рекомендуемому производителем. Спектрофотометрический анализ выполняли с использованием ридера для микропланшетов Spark 10M (Tecan, Австрия) с программным обеспечением Spark Control™ Magellan V1.2.20 на длинах волн 570 и 600 нм. Данные измерения оптического поглощения использовали для расчета коэффициента метаболической активности (K) по формуле:

$$K = \frac{117,216 \times Abs_{570} - 80,586 \times Abs_{600}}{155,677 \times Abs_{600} - 14,652 \times Abs_{570}} \times 100\%,$$

где Abs_{570} – оптическое поглощение при длине волны 570 нм; Abs_{600} – оптическое поглощение при длине волны 600 нм.

Количество клеток, соответствующее значению полученного коэффициента K, определяли по калибровочному графику, который строили по значениям коэффициентов метаболической активности, соответствующих известным количествам клеток.

Клеточно-инженерные конструкции на основе криогенно-структурированной желатиновой матрицы и разных типов клеток

Для создания клеточно-инженерных конструкций (КИК) на основе макропористых желатиновых губок и МСК ЖТч, клеток линии HerG2 либо эндотелиальных клеток пупочной вены человека линии EA.hy926 готовили суспензии соответствующих культур с концентрацией 1×10^6 кл/мл. Образцы губки в виде дисков площадью 1 см^2 и толщиной 2 мм погружали в суспензию и обрабатывали в течение 1 ч с применением лабораторного шейкера в орбитальном режиме перемешивания при частоте вращения 40 об/мин для улучшения проникновения клеток вглубь губчатой структуры образца. Полученные КИК культивировали в стандартных условиях в течение 9, 15 и 28 суток в случае использования HerG2, эндотелиальных клеток пупочной вены человека линии EA.hy926 и МСК ЖТч соответственно.

Характер распределения клеток по объему образца, жизнеспособность, морфологию и пролиферативную активность оценивали методами прижизненной микроскопии с флуоресцентными красителями комплекса Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes® by Life Technologies™, США) согласно протоколу, рекомендуемому производителем.

Функциональные свойства клеток гепатоцеллюлярной карциномы HerG2 при их культивировании на макропористой желатиновой губке

Клетки линии HerG2 наносили в количестве 5×10^5 на фрагмент желатиновой губки размером $10 \times 10 \times 2$ мм. Полученные КИК культивировали в полной ростовой среде в стандартных условиях в течение 15 суток. На 15-е сутки определяли содержание альбумина в культуральной среде методом иммуноферментного анализа с использованием Human Albumin ELISA Kit (Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific, США). В качестве контроля использовали культуральную среду от клеток, которые в таком же количестве культивировали на пластике.

Скорость метаболизма аммиака определяли после 90 минут инкубации с 1 mM хлоридом аммония (Sigma-Aldrich, США), разведенным в культуральной среде на 15-е сутки эксперимента. Количество мочевины в среде оценивали на биохимическом анализаторе KonelabPrime 60i (ThermoFisher Scientific, Финляндия).

Достоверность различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента (стандартный программный пакет Microsoft Excel 2007). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1, а, показан внешний вид образца криогенно-структурированного гидрогеля на основе желатина в виде макропористой губки. Сканирующая электронная микроскопия позволила выделить три типа пор на поверхности носителя: крупные (109 ± 17 мкм), средние (39 ± 10 мкм) и малые (16 ± 6 мкм) (рис. 2, б).

Заметим, что крупные поры способны обеспечить миграцию клеток в толщу губки, тогда как значение пор среднего и малого размера заключается в поддержке эффективного массопереноса питательных веществ и газов.

Цитотоксичность криогенно-структурированной желатиновой матрицы

Оценка цитотоксичности полученных в работе желатиновых губок методом прямого контакта показала отсутствие какого-либо негативного действия на развитие клеток NIH 3T3. Как в первые часы, так и через 72 ч контакта клеток и носителя не наблюдали изменений морфологии клеток либо снижения их пролиферации.

Полученные данные подтверждают кривые роста клеток при культивировании на культуральном пластике в присутствии желатиновой губки, демонс-

трирующие увеличение конфлюэнтности монослоя клеток во всех вариантах эксперимента с динамикой, характерной для данной клеточной культуры (рис. 2). Отметим, что для корректного сопоставления данных двух представленных на рис. 2 кривых необходимо введение поправочного коэффициента для опытного варианта 1,12, учитывающего площадь лунки (9,6 см²), занятую образцом (1 см²) и исключаемую при автоматическом анализе изображений. С учетом поправки значимых различий в конфлюэнтности клеточного монослоя на плато в эксперименте выявлено не было (без образца конфлюэнтность монослоя составила 94 ± 5%, а с образцом 85 ± 6%).

Подтвержденная на клетках линии фибробластов мыши NIH 3T3 способность криогенно-структурированной желатиновой губки поддерживать клеточную адгезию и пролиферацию позволила перейти к созданию КИК – культивированию клеток человека (МСК ЖТч, ЭК EA.hy926 и Нер G2) на криогенно-структурированной желатиновой губке.

Метаболическая активность МСК ЖТч при культивировании

МСК выполняют различные биологические функции, что определяет их востребованность в тканевой инженерии. Во-первых, МСК обладают способностью дифференцироваться в различных направлениях,

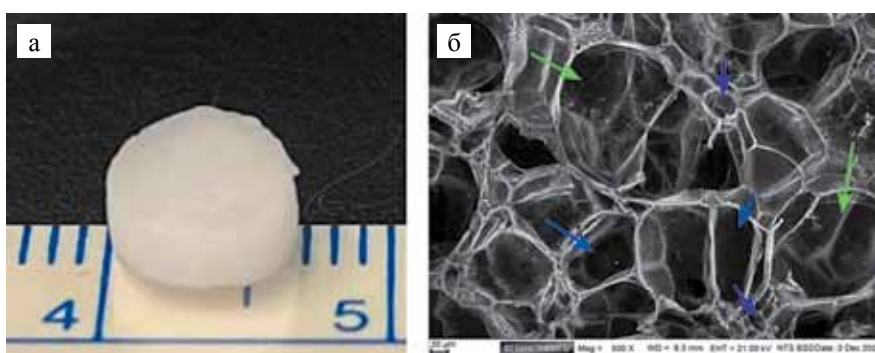


Рис. 1. Морфология макропористой губки на основе желатина: а – вид носителя; б – микрофотография структуры поверхности. СЭМ с использованием лантоноидного контрастирования BioREE. Размер масштабной линейки 20 мкм. Зеленые стрелки – крупные поры, синие стрелки – поры среднего размера, фиолетовые стрелки – мелкие поры

Fig. 1. Gelatin-based macroporous sponge morphology: а – view of the carrier; б – microphotograph of the surface structure. SEM using BioREE lanthanoid contrasting. Scale bar 20 µm. Green arrows, large pores; blue arrows, medium-sized pores; purple arrows, small pores

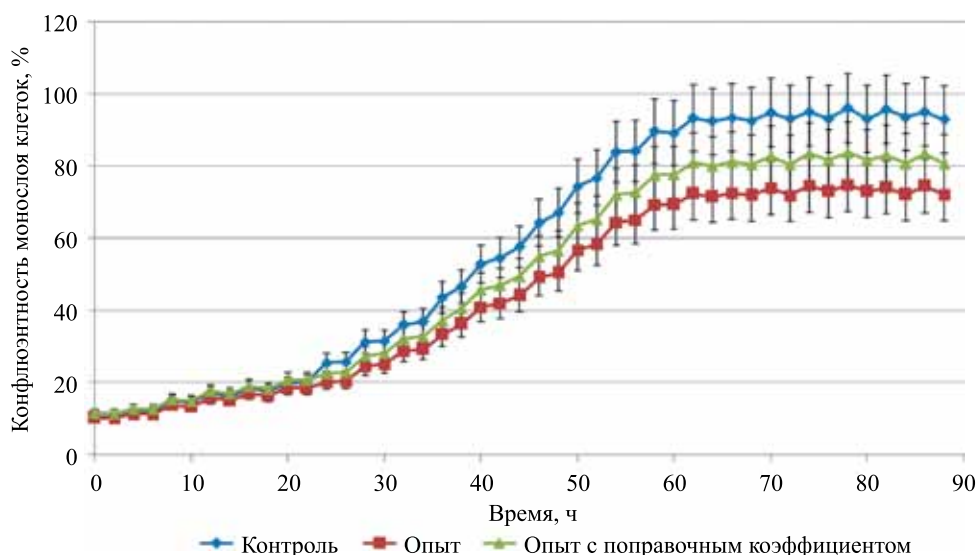


Рис. 2. Кривая роста клеток линии NIH 3T3 на культуральном пластике в присутствии криогенно-структурированной желатиновой губки (опыт) и без криогенно-структурированной желатиновой губки (контроль)

Fig. 2. Growth curve for NIH3T3 on culture plate in the presence of cryogenically structured gelatin sponge (experiment) and without cryogenically structured gelatin sponge (control)

включая хондрогенное, остеогенное, адипогенное, миогенное и нейрогенное [27]. Во-вторых, секретом МСК оказывает положительное влияние на терапию различных заболеваний [28].

Количество МСК ЖТч для исследования метаболической активности при культивировании на криогенно-структурированной желатиновой губке и БМКГ составляло 100 000 клеток/мл. По кривым роста видно, что адгезия клеток на поверхности составляет лишь 20–25% от внесенного количества (рис. 3). В случае желатиновой матрицы наблюдали лаг-фазу, необходимую для адаптации и расплывания клеток, после которой через 3 дня начинается активная пролиферация и к 6-м суткам эксперимента количество пролиферирующих клеток увеличивается в 4–5 раз, до 100 000 клеток. Далее, после небольшого плато, до 9-х суток идет дальнейший логарифмический рост клеточной популяции вплоть до конца эксперимента – 14 суток. Отсутствие роста пролиферативной активности в период 6–9-е сутки на криогенно-структурированной желатиновой матрице и продолжение логарифмического роста популяции после, видимо, связано с заселением клетками наиболее доступной поверхности макропор и миграцией клеток в объем образца. При культивировании с БМКГ адаптация клеток происходит значительно быстрее, о чем свидетельствует отсутствие выраженной лаг-фазы. Интенсивная пролиферация наблюдается практически с начала эксперимента, и уже к 3-м суткам число клеток вдвое превышает этот

показатель для желатиновой губки. Также наблюдали более быстрый и активный рост клеток с выходом на плато к 9-м суткам. При этом максимальные значения количества клеток на образец достигали около 280 000 для БМКГ на 9-е сутки и около 220 000 клеток для криогенно-структурированного желатинового гидрогеля на 14-е сутки эксперимента. Снижение количества клеток к 14-м суткам культивирования с БМКГ по сравнению с 9-ми сутками свидетельствует о наступлении фазы гибели клеток, связанной, вероятно, с отсутствием свободной поверхности носителя для заселения клетками. В целом МСК ЖТч при культивировании на исследуемых гидрогелях демонстрировали динамику роста, характерную для данного вида клеток на культуральном пластике [29].

Таким образом, более интенсивная пролиферативная активность МСК ЖТч наблюдается при их культивировании на БМКГ, в то время как в присутствии желатиновой матрицы прирост клеточной массы идет медленнее. Однако на 14-е сутки количество МСК ЖТч, обладающих метаболической активностью, в случае желатиновой губки выше, чем для БМКГ.

Культивирование клеток разных типов на криогенно-структурированной желатиновой губке

Показано, что мезенхимальные, эпителиальные и эндотелиальные клетки при внесении в количестве 500 000 на 1 см² проявляют высокий уровень адгезии



Рис. 3. Кривые роста МСК ЖТч на криогенно-структурированной желатиновой губке и биополимерном коллагенсодержащем гидрогеле

Fig. 3. Growth curves for hAMSCs in a cryogenically structured gelatin sponge and a collagen-containing biopolymer-based hydrogel

к поверхности матрицы, активно пролиферируют и заселяют поверхность носителя. Использование «стекинга», т. е. смещения точки фокуса объектива микроскопа вглубь образца на глубину около 100 мкм с последующей программной обработкой изображения показало, что клетки распространяются и во внутренний объем губки.

В случае культивирования МСК ЖТч на желатиновой губке наблюдали наиболее длительный рост клеток (рис. 4), а к 28-м суткам – формирование плотных 3D-структур с высокой плотностью клеток в объеме матрицы.

Как видно на рис. 4, б, ethidium homodimer-1, кроме мертвых клеток, окрашивает матрицу в красный цвет, позволяя визуализировать стенки пор.

Клетки гепатоцеллюлярной карциномы HepG2, которые используют, как правило, в качестве *in vitro* модели гепатоцитов, также активно пролиферировали на матрице (рис. 5).

На 3-и сутки эксперимента наблюдали активную пролиферацию и распространение клеток по площади носителя. На 7-е сутки в образцах происходило формирование клеточных скоплений, а к 9-м суткам поверхность макропор желатиновой губки практически полностью была заселена клетками (см. рис. 5).

Одним из условий создания тканевых эквивалентов является васкуляризация матриц [30]. Для создания моделей капиллярной системы в тканеинженерных конструкциях *in vitro* широко используют иммортализованные клеточные линии, в том чис-

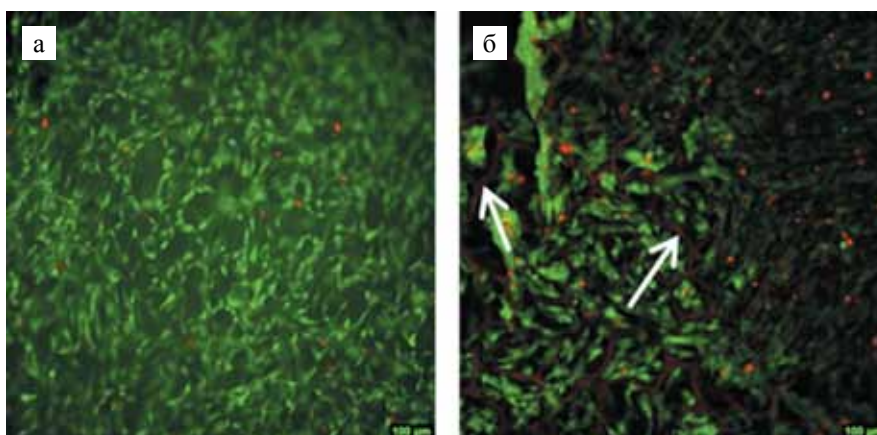


Рис. 4. Рост МСК ЖТч на криогенно-структурированной желатиновой губке: а – 9 суток культивирования; б – 28 суток. Окрашивание Live/Dead™, зеленым цветом окрашены живые клетки, красным цветом – мертвые клетки. Стрелками показаны стенки пор губки. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 4. Growth of hAMSCs in a cryogenically structured gelatin sponge: а – 9 days in culture; б – 28 days. Live/Dead™ staining, live cells are stained green, dead cells are stained red. Arrows show the walls of the sponge pores. Scale bar 100 μm

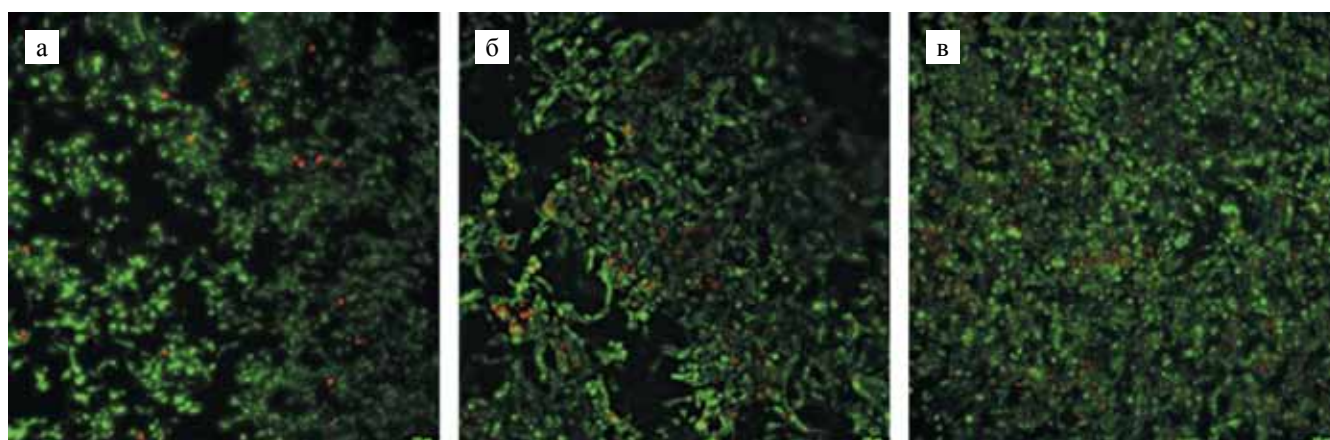


Рис. 5. Рост HepG2 на криогенно-структурированной желатиновой губке: а – 3 суток культивирования; б – 7 суток; в – 9 суток. Окрашивание Live/Dead™, зеленым цветом окрашены живые клетки, красным цветом – мертвые клетки. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 5. Growth of HepG2 in a cryogenically structured gelatin sponge: а – 3 days in culture; б – 7 days; в – 9 days. Live/Dead™ staining, live cells are stained green, dead cells are stained red. Scale bar 100 μm

ле линию EA.hy926, демонстрирующую сходство с первичными эндотелиальными клетками [31]. При культивировании EA.hy926 на макропористой желатиновой матрице происходило быстрое и равномерное заселение ее клетками (рис. 6).

К 15-м суткам культивирования на поверхности формировались плотные клеточные структуры с прорастанием клеток в объем губки. При этом доля живых клеток преобладала над мертвыми.

Оценка функциональных свойств клеток гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 при культивировании на криогенно-структурированном желатиновом носителе

Наличие функциональных свойств созданной КИК анализировали по синтезу альбумина и про-

дукции мочевины. В таблице представлены результаты оценки синтеза альбумина клетками HepG2 в суспензии и в составе КИК.

Полученные данные свидетельствуют о способности HepG2, посеянных на желатиновой губке, поддерживать свою секреторную функцию и метаболизм аммиака на 15-е сутки культивирования на более высоком уровне, чем в виде суспензии клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведены исследования биологических свойств криогенно-структурированного гидрогеля на основе желатина в виде резорбируемой макропористой губки.

Отсутствие цитотоксичности и наличие функциональных свойств образцов *in vitro* были доказаны на культурах фибробластов мыши NIH 3T3, МСК ЖТч, эндотелиальных клеток пупочной вены человека ли-

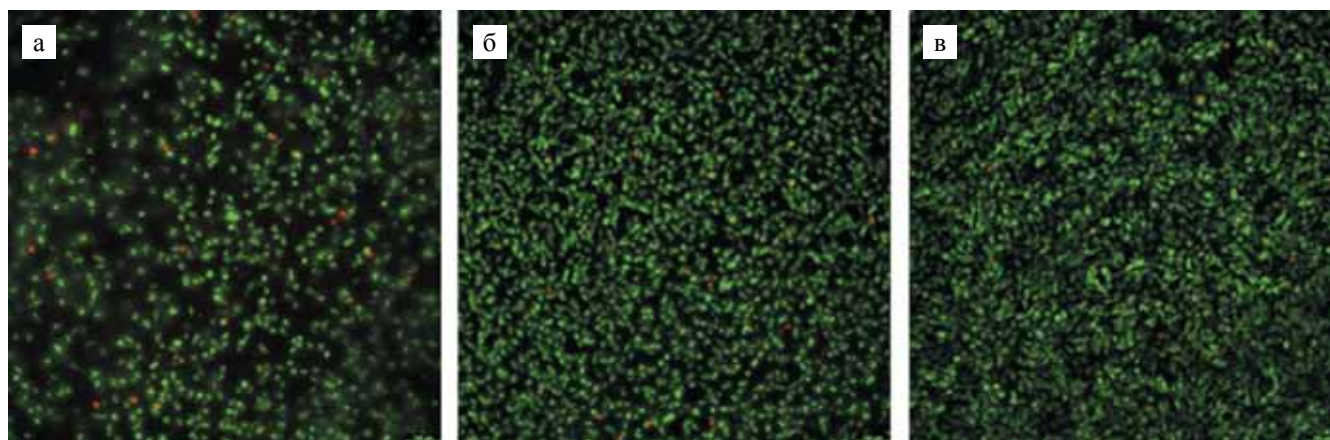


Рис. 6. Рост эндотелиальных клеток линии EA.hy926 на криогенно-структурированной желатиновой губке: а – 2 суток культивирования; б – 7 суток; в – 15 суток. Окрашивание Live/Dead™, зеленым цветом окрашены живые клетки, красным цветом – мертвые клетки. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 6. Growth of EA.hy926 in a cryogenically structured gelatin sponge: a – 2 days in culture; б – 7 days; в – 15 days. Live/Dead™ staining, live cells are stained green, dead cells are stained red. Scale bar 100 μm

Таблица

Содержание альбумина и уровень мочевины в образцах культуральной среды на 15-е сутки культивирования клеток HepG2 в суспензии (контроль) и на криогенно-структурированной желатиновой губке (опыт)

Albumin content and urea level in the culture medium samples on day 15 of HepG2 culturing in a suspension (control) and in cryogenically structured gelatin sponge (experiment)

	Альбумин, ммоль/мл	Мочевина, ммоль/л
Культивирование в суспензии	997 ± 139	1,1 ± 0,1
Культивирование на криогенно-структурированной желатиновой губке	1560 ± 312	1,8 ± 0,4

нии EA.hy926 и HepG2. На примере клеточно-инженерной конструкции печени показана перспективность использования матрицы из макропористого криогенно-структурированного гидрогеля на основе желатина для создания продуктов тканевой инженерии.

Работы, проводимые в части получения образцов криогенно-структурированного гидрогеля на основе желатина, выполнены при частичном финансировании Министерства науки и образования РФ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Трансплантология и искусственные органы: учебник / Под ред. акад. РАН СВ Готье. М.: Лаборатория знаний, 2018. 319 с.: ил. Transplantologija i iskusstvennye organy: uchebnik / Pod red. akad. RAN SV Gautier. M.: Laboratorija znaniy, 2018. 319 s.: il. (In Russ.).
2. Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. From Basic Concepts to State of the Art Approaches. В Bhaskar, PS Rao, N Kasoju, V Nagarjuna, RR Baadhe (Eds.). Springer Nature Singapore Pte Ltd.; 2021. 1039 p. ISBN 978-981-16-0001-2. doi: org/10.1007/978-981-16-0002-9.
3. Joyce K, Fabra GT, Bozkurt Y, Pandit A. Bioactive potential of natural biomaterials: identification, retention and assessment of biological properties. *Signal Transduct Target Ther*. 2021; 6 (1): 122. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00512-8>.
4. Dong C, Lv Y. Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives. *Polymers (Basel)*. 2016; 8 (2): 42. doi: 10.3390/polym8020042.
5. Sevastianov VI, Basok YB, Kirsanova LA, Grigoriev AM, Kirillova AD, Nemets EA et al. A Comparison of the Capacity of Mesenchymal Stromal Cells for Cartilage Regeneration Depending on Collagen-Based Injectable Biomimetic Scaffold Type. *Life (Basel)*. 2021; 11 (8): 756. doi: 10.3390/life11080756. PMID: 34440500; PMCID: PMC8400656.
6. Chang CH, Liu HC, Lin CC, Chou CH, Lin FH. Gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2003 Nov; 24 (26): 4853–4858. doi: 10.1016/s0142-9612(03)00383-1. PMID: 14530082.
7. Yin B, Ma P, Chen J, Wang H, Wu G, Li B et al. Hybrid Macro-Porous Titanium Ornamented by Degradable 3D Gel/nHA Micro-Scaffolds for Bone Tissue Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2016; 17 (4): 575. doi: 10.3390/ijms17040575. PMID: 27092492; PMCID: PMC4849031.
8. Echave MC, Saenz del Burgo L, Pedraz JL, Orive G. Gelatin as Biomaterial for Tissue Engineering. *Curr Pharm Des*. 2017; 23 (24): 3567–3584. doi: 10.2174/0929867324666170511123101. PMID: 28494717.
9. Kao HH, Kuo CY, Chen KS, Chen JP. Preparation of Gelatin and Gelatin/Hyaluronic Acid Cryogel Scaffolds for the 3D Culture of Mesothelial Cells and Mesothelium Tissue Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2019 Sep 12; 20 (18): 4527. doi: 10.3390/ijms20184527. PMID: 31547444; PMCID: PMC6770111.
10. Nemets EA, Belov VYu, Ilina TS, Surguchenko VA, Pankina AP, Sevastyanov VI Composite porous tubular biopolymer matrix of small diameter. *Inorganic Materials: Applied Research* 2019; 10 (2): 365–372. <https://doi.org/10.1134/S207511331902031X>.
11. Zhao P, Wang J, Li Y, Wang X, Chen C, Liu G. Microfluidic Technology for the Production of Well-Ordered Porous Polymer Scaffolds. *Polymers (Basel)*. 2020; 12 (9): 1863. doi: 10.3390/polym12091863. PMID: 32825098; PMCID: PMC7564514.
12. Chung C, Burdick JA. Engineering cartilage tissue. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008; 60 (2): 243–262. doi: 10.1016/j.addr.2007.08.027. PMID: 17976858; PMCID: PMC2230638.
13. Lutzweiler G, Ndreu Halili A, Engin Vrana N. The Overview of Porous, Bioactive Scaffolds as Instructive Biomaterials for Tissue Regeneration and Their Clinical Translation. *Pharmaceutics*. 2020; 12 (7): 602. doi: 10.3390/pharmaceutics12070602. PMID: 32610440; PMCID: PMC7407612.
14. Lien SM, Ko LY, Huang TJ. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomater*. 2009; 5 (2): 670–679. doi: 10.1016/j.actbio.2008.09.020.
15. Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2010; 31 (3): 461–466. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.063.
16. Yang J, Shi G, Bei J, Wang S, Cao Y, Shang Q et al. Fabrication and surface modification of macroporous poly(L-lactic acid) and poly(L-lactic-co-glycolic acid) (70/30) cell scaffolds for human skin fibroblast cell culture. *J Biomed Mater Res*. 2002; 62 (3): 438–446. doi: 10.1002/jbm.10318.
17. Harley BA, Kim HD, Zaman MH, Yannas IV, Lauffenburger DA, Gibson LJ. Microarchitecture of three-dimensional scaffolds influences cell migration behavior via junction interactions. *Biophys J*. 2008; 95 (8): 4013–4024. doi: 10.1529/biophysj.107.122598.
18. Wartenberg A, Weisser J, Schnabelrauch M. Glycosaminoglycan-Based Cryogels as Scaffolds for Cell Cultivation and Tissue Regeneration. *Molecules*. 2021; 26 (18): 5597. doi: 10.3390/molecules26185597.
19. Jones LO, Williams L, Boam T, Kalmet M, Oguike C, Hatton FL. Cryogels: recent applications in 3D-bioprinting, injectable cryogels, drug delivery, and wound healing. *Beilstein J Org Chem*. 2021; 17: 2553–2569. doi: 10.3762/bjoc.17.171.
20. He Y, Wang C, Wang C, Xiao Y, Lin W. An Overview on Collagen and Gelatin-Based Cryogels: Fabrication, Classification, Properties and Biomedical Applications. *Polymers (Basel)*. 2021; 13 (14): 2299. doi: 10.3390/polym13142299.
21. Savina IN, Zoughaib M, Yergeshov AA. Design and Assessment of Biodegradable Macroporous Cryogels as Advanced Tissue Engineering and Drug Carrying Materials. *Gels*. 2021; 7 (3): 79. doi: 10.3390/gels7030079.
22. Lozinsky VI. Cryostructuring of polymer systems. 50. Cryogels and cryotropic gel-formation: terms and definitions. *Gels*. 2018; 4 (3): 77. doi: 10.3390/gels4030077.
23. Lozinsky VI, Okay O. Basic principles of cryotropic gelation. *Adv Polym Sci*. 2014; 263: 49–101. doi: 10.1007/978-3-319-05846-7_2.
24. Лозинский ВИ, Кулакова ВК, Петренко АЮ, Петренко ЮА, Еришов АГ, Суханов ЮВ. Композиция для формирования макропористого носителя, используемого при трехмерном культивировании клеток животных или человека, и способ получения указанного носителя. Пат. РФ № 2594427 (2015); Б.И. № 23

- (2016). *Lozinskij VI, Kulakova VK, Petrenko AJu, Petrenko JuA, Ershov AG, Suhanov JuV*. Kompozicija dlja formirovaniya makroporistogo nositelja, ispol'zuemogo pri trehmernom kul'tivirovanii kletok zhivotnyh ili cheloveka, i sposob poluchenija ukazannogo nositelja. Pat. RF № 2594427 (2015); B.I. № 23 (2016). (In Russ).
25. *Tsvetkova AV, Vakhrushev IV, Basok YB, Grigor'ev AM, Kirsanova LA, Lupatov AY et al*. Chondrogenic Potential of MSC from Different Sources in Spheroid Culture. *Bull Exp Biol Med*. 2021; 170 (4): 528–536. doi: 10.1007/s10517-021-05101-x. PMID: 33725253.
26. *Севастьянов ВИ, Перова НВ*. Биополимерный гетерогенный гидрогель Сферо®ГЕЛЬ – инъекционный биодеградируемый имплантат для заместительной и регенеративной медицины. *Практическая медицина*. 2014; 8 (84): 120–126. *Sevast'yanov VI, Perova NV*. Biopolimernyj geterogennyj gidrogel' Sfero®GEL' – in'ekcionnyj biodegradiruemyj implantat dlya zamestitel'noj i regenerativnoj mediciny. *Prakticheskaya medicina*. 2014; 8 (84): 120–126.
27. *Urrutia DN, Caviedes P, Mardones R, Minguell JJ, Vega-Letter AM, Jofre CM*. Comparative study of the neural differentiation capacity of mesenchymal stromal cells from different tissue sources: An approach for their use in neural regeneration therapies. *PLoS One*. 2019; 14 (3): e0213032. doi: 10.1371/journal.pone.0213032.
28. *Giannasi C, Niada S, Della Morte E, Casati S, Orioli M, Gualerzi A et al*. Towards Secretome Standardization: Identifying Key Ingredients of MSC-Derived Therapeutic Cocktail. *Stem Cells Int*. 2021; 2021: 3086122. doi: 10.1155/2021/3086122.
29. *Фрешини РЯ*. Культура животных клеток: практическое руководство. М.: БИНОМ, 2010. 691. *Freshney RJ*. Kul'tura zhivotnyh kletok: prakticheskoe rukovodstvo. М.: BINOM, 2010. 691.
30. *Chuang CH, Lin RZ, Tien HW, Chu YC, Li YC, Melero-Martin JM, et.al*. Enzymatic regulation of functional vascular networks using gelatin hydrogels. *Acta Biomater*. 2015; 19: 85–99. doi: 10.1016/j.actbio.2015.02.024. PMID: 25749296; PMCID: PMC4589259.
31. *Blache U, Guerrero J, Güven S, Klar AS, Scherberich A*. Microvascular networks and models: in vitro formation. In: W. Holthöner, A. Banfi, J. Kirkpatrick, H. Redl, eds. Vascularization for tissue engineering and regenerative medicine. Reference series in biomedical engineering. *Springer; Cham*. 2021: 345–383. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54586-8>.

*Статья поступила в редакцию 20.05.2022 г.
The article was submitted to the journal on 20.05.2022*