

УДК:616-001.17:576.535.5-538

Яценко А.А.^{1,2}, Борозда И.В.¹, Кушнарв В.А.^{2,3},
Леонов Д.В.¹, Кислицкий В.М.¹, Устинов Е.М.¹**ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЖЕЛАТИН-ГЛУТАРОВЫХ СКАФФОЛДОВ
ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ В ЦЕЛЯХ
ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОЖОГОВЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ**¹ *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Амурская государственная медицинская академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации; 675006 Амурская область,
г. Благовещенск, ул. Горького, д.95*² *IQ Biofabric; 143026, г. Москва, тер. Сколково инновационного центра,
Большой б-р, д. 42, стр. 1,*³ *Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова;
197758, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, дом 68*

Цель исследования. Изучить возможности культивирования фибробластов на 3D скаффолде из желатина с добавлением дегидрокверцетина.

Материал и методы. В работе был использован и описан метод наливного моделирования желатин-глутарового скаффолда, а также исследованы его адгезионные свойства для культур дермальных фибробластов крысы.

Результаты. Фибробласты кожи крыс показали удовлетворительные адгезионные свойства к полученным скаффолдам. Мы охарактеризовали морфологические характеристики культивируемых фибробластов на скаффолде, а также изменение матрикса скаффолда, с появлением на поверхности белков, которые являются продуктом служащим основой для ремоделирования микроокружения.

Заключение. Разработан метод получения желатин-глутаровых скаффолдов для культивирования дермальных фибробластов в целях тканевой инженерии, в том числе для восстановления кожного покрова после ожоговых повреждений.

Ключевые слова: фибробласты, скаффолд, тканевая инженерия, пористость, желатин, дегидрокверцетин

Yacenko A.A.^{1,2}, Borozda I.V.¹, Kushnarev V.A.^{2,3}, Leonov D.V.¹, Kislickij V.M.¹, Ustinov E.M.¹**POSSIBILITIES OF GELATIN-GLUTAR SCAFFOLDES USING FOR CULTIVATION
OF DERMAL FIBROBLASTS FOR TISSUE ENGINEERING FOR TREATMENT
OF BURN INJURIES**¹ *Amur State Medical Academy; 675006 Amur Region, Blagoveshchensk, 95 Gorky str*² *IQ Biofabric; 143026, Moscow, Skolkovo Territory of the Innovation Center, 42 Bolshoy Blvd, building 1*³ *Research Center of Oncology named after N.N. Petrov; 197758, Russia, St. Petersburg,
pos. Sand, 68 Leningradskaya str.*

The aim of the research. To study the possibilities of fibroblasts cultivation on a 3D-gelatin scaffold with addition of dihydroquercetin.

Materials and methods. We described a method of salt leaching of a gelatin-glutar scaffold, and its adhesive properties for cultures of dermal fibroblasts.

Results. Rats' skin fibroblasts showed high adhesion to the resulting scaffolds. We have demonstrated the morphological characteristics of cultured fibroblasts on a scaffold, as well as the ability to modify the matrix, with the appearance on the surface of scaffolds of proteins, which are the product serving as the basis for remodeling of the microenvironment.

Conclusion. A method has been developed for the production of gelatin-glutar scaffolds for the cultivation of dermal fibroblasts for tissue engineering, including the reparation of the skin after burn injuries.

Key words: fibroblasts, scaffold, tissue engineering, porosity, gelatin, dihydroquercetin.

Всемирная организация здравоохранения отмечает более 300 000 случаев смертей, связанных с ожоговой травмой и другими видами повреждения кожи (радиационное, электрическое и др.) [1]. Этому способствует прогрессирующая индустриализация стран, разра-

ботка новых источников энергии и широкое внедрение созданных на их основе устройств в повседневную бытовую жизнь. В современной медицине для лечения ожогов II-III степени тяжести используют биологические раневые покрытия, создаваемые на основе различных биологических полимеров, например, хитозана и коллагена. Подобные покрытия снижают риски инфицированности раны, а также улучшают местную регенерацию тканей. Однако, проведенные клинические исследования показывают их несостоятельность при контроле с использованием аутографтов. На место раневым покрытиям приходит регенеративная медицина с использованием клеточных технологий.

В 1955 г. была произведена первая трансплантация почки между людьми. С этого времени трансплантология постоянно развивается [2]. В 1960 г. появляется термин «тканевая инженерия» в связи с активным клиническим применением тканей и их клеток в сочетании с различными материалами. Под этим понятием понималась «междисциплинарная наука, сочетающая в себе принципы инженерии и биологических дисциплин, направленная на воссоздание живых тканей, используемых для замены, поддержания и улучшения функций органов» [3].

В составе тканеинженерных продуктов обычно выделяют 3 основных части: клеточных элементов, скаффолда или матрикса и факторов роста. Скаффолд – это синтетический или природный материал, структурированный для поддержания межклеточных контактов и самоорганизации клеток. В качестве него могут использоваться различные полимеры: коллаген, хитозан, желатин, гиалуроновая кислота, полилактид и многие другие [4]. Важное свойство материалов – воссоздавать механические и биологические свойства живой ткани. Помимо этого, скаффолд должен иметь определенную трехмерную структуру – гистоархитектонику, позволяющую клеткам адгезироваться, пролиферировать и активно взаимодействовать друг с другом, создавая микроокружение.

«Идеальный» скаффолд должен обладать следующими свойствами: быть биосовместимым и не вызывать иммунный ответ, биоразлагаться без образования токсичных продуктов и создавать для клеток оптимальные физико-химические и биологические условия для пролиферации и дифференцировки [5]. Одним из ключевых признаков, влияющий на физико-химические условия культивирования клеток, является пористость. Принято выражать пористость скаффолда в числе пор на квадратный миллиметр площади

Желатин – природный белковый полимер, который может быть получен из кожи, костей и сухожилий животных. Он широко используется в пищевой промышленности, косметологии и медицине. Желатин состоит из 19 аминокислот, с преобладанием глицина, пролина, аланина и гидроксипролина. Скаффолды на основе желатина могут быть созданы с помощью различных технологий: электроспиннинг [6], самосборка [7], выщелачивание [8], фазовая сепарация [9], биопечать. Основным недостатком желатина – термолабильность, требующая сшивки молекул. Последняя может проводиться с помощью химических и физических методов. Наиболее часто проводится фотополимеризация желатина. Метод имеет ряд недостатков: добавление токсичных для клеток компонентов (метакриловая кислота и другие) [10], необходимость использования дополнительных технических устройств для проведения УФ-воздействия для полимеризации. Альтернативным методом является химическая сшивка глутаровым альдегидом и его аналогами [11, 12]. Для повышения термостабильности желатина предлагается использовать природные флавоноиды и алкалоиды, обладающие сшивающим действием на аминокислоты. Подобными свойствами обладает дигидрокверцетин [13]. Также, являясь антиоксидантом, дигидрокверцетин может повышать выживаемость клеток после их внесения на скаффолд.

Материал и методы.

Получение культуры дермальных фибробластов. Культура дермальных фибробластов была выращена по стандартной методике первичных эксплантов из кожи боковой поверхности спины лабораторных крыс, полученной при хирургическом иссечении кожного лоскута 0,5 см x 0,5 см. Забор материала проводили с соблюдением санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) № 1045-73 от 06.03.1973 г., Конвенцией по защите животных, используемых в экспери-

менте и других научных целях (принятой Советом Европы в 1986 г.), и Директивой Совета 86/609/ЕЕС от 24.11.86 г. по согласованию законов, правил и административных распоряжений стран-участниц в отношении защиты животных, используемых в экспериментальных и других научных целях.

Полученные образцы кожи помещали в однократный фосфатно-солевой буфер (ФСБ) («Биолот», г. Санкт-Петербург) со 100 МЕ/мл Бензилпенициллина («Биолот», г. Санкт-Петербург) и 2 мг/мл Гентамицина («Биолот», г. Санкт-Петербург) и доставляли в лабораторию клеточных технологий. Образцы хранились в течение 1 суток в холодильнике при +4 °С. После суточного карантина для исключения контаминированных образцов производили их обработку. Кожу помещали на 20 секунд в 70% раствор этилового спирта, после чего дважды промывали в стерильном растворе ФСБ. Образцы разрезали с помощью хирургических скальпелей на небольшие фрагменты до 1 мм² и дважды отмывали ФСБ. После центрифугирования при 400 об/мин в течение 3 минут, фрагменты помещали в чашки Петри диаметром 2 см («Thermo Fisher Scientific», Германия). Добавляли 300 мкл питательной среды DMEM («Биолот», г. Санкт-Петербург) с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота («Биолот», г. Санкт-Петербург), 100 МЕ/мл Бензилпенициллина и 2 мг/мл Гентамицина и помещали в СО₂-инкубатор при 37 °С и 5% концентрации СО₂. В течение 2, 3 и 4 дня к образцам добавляли по 300 мкл питательной среды DMEM с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота («Биолот», г. Санкт-Петербург), 100 МЕ/мл Бензилпенициллина и 2 мг/мл Гентамицина. На 5 день наблюдали выход фибробластов из образцов. На 10 день кусочки кожи удалялись из чашки Петри. Культуру пассировали 3 раза для удаления других типов клеток.

Подготовка скаффолдов. Скаффолды были изготовлены из пищевого желатина (ЗАО «Компания Проксима» Россия). Для создания пористой структуры использовали хлорид натрия (ООО «АО РЕАХИМ», Россия). В качестве антиоксиданта – сшивающего агента, использовался препарат Лавитол Б (АО «Аметис», Россия), который является смесью дигидрокверцетина и арабиногалактана.

Химическая фиксация желатина производилась глутаровым альдегидом (Sigma Aldrich, Германия). Для исследования ферментативной стабильности мы использовали 0,25% трипсин (Sigma Aldrich, Германия) и коллагеназу I типа (≥ 125 CDU/мг) (Sigma Aldrich, Германия).

Нами было приготовлены стандартизированные по площади образцы порогенных желатиновых скаффолдов методом выщелачивания хлорида натрия с модификацией Лавитолом Б. Скаффолды получали путем нанесения разогретого до 56 °С 20% раствора желатина на поверхность слоя хлорида натрия с размером кристаллов от 4 до 50 мкм в чашке Петри, в весовом соотношении 1:9. Для получения скаффолдов с лавитолом Б, при приготовлении 20% раствора желатина добавляли 0,5% лавитола Б, от общей массы раствора. Чашка Петри помещалась в термостат при 37 °С на 24 часа. После чего производилась химическая сшивка образца 2,5% раствором глутарового альдегида, приготовленного на фосфатно-солевом буфере (PBS) при pH = 7,4, путем добавления его в чашку Петри. Выщелачивание хлорида натрия проводилось с помощью последовательной инкубации образцов в деионизированной воде на протяжении 48 часов со сменой растворов каждые 24 часов. Размер готового скаффолда — 5x5x2 мм. Скаффолды перед заселением клеточной культурой подвергали паровой стерилизации на протяжении 20 мин. при 121 °С и 2 атмосферах.

Заселение скаффолдов культурами фибробластов. Снятие дермальных фибробластов с чашки Петри проводили по стандартному протоколу. После удаления среды с помощью вакуумного отсоса к чашкам добавляли по 2 мл раствора Версена («Биолот», г. Санкт-Петербург) и оставляли на 10 секунд. Удалив раствор Версена, добавляли по 1 мл 0,25% раствора трипсина («Биолот», г. Санкт-Петербург) и инкубировали 5 минут при 37 °С в термостате. Нейтрализацию трипсина производили добавлением аналогичного объема трипсин-нейтрализующего раствора («Thermo Fisher Scientific», Германия). После ресуспендирования, жидкость из чашки Петри переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали 5 минут при 400 об/мин. Удалив супернатант в пробирку добавляли 1 мл питательной среды

DMEM с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота («Биолот», г. Санкт-Петербург), 100 МЕ/мл Бензилпенициллина и 2 мг/мл Гентамицина. После ресуспендирования клеточную суспензию переносили на подготовленный скаффолд.

Скаффолд с дермальными фибробластами культивировали в клеточных планшетах на 96 лунок («Thermo Fisher Scientific», Германия) в CO₂-инкубаторе при 37 °С и 5% концентрации CO₂. Каждый день анализировалось состояние культуральной среды и морфология клеток на скаффолде. Смена культуральной среды проводилась каждые 5 дней.

Количество образцов – 20. Скаффолды с фибробластами культивировались в течение 28 дней. Морфологическое изучение скаффолдов проводилось на 1, 2, 3 и 4 неделю. Для этого, по 3 образца скаффолда разделялись на 2 части и фиксировались в 10% забуференном формалине («Биовитрум», Россия) и 1% растворе глутарового альдегида, приготовленного на фосфатно-солевом буфере с добавлением сахарозы.

Исследование морфологической структуры скаффолда с фибробластами. Структура полученных скаффолдов оценивалась с помощью сканирующего электронного микроскопа (Hitachi-S3400N, Япония). Пробоподготовка для сканирующей электронной микроскопии осуществлялась последовательной дегидратацией и напылением золота на образцы скаффолдов по стандартному протоколу. Исследование проходило при высоком вакууме, в стандартном режиме работы сканирующего электронного микроскопа. Проводилась оценка структуры, количества и размеров пор, перемычек в скаффолде.

Результаты исследования.

Морфологическое исследование скаффолда. Полученные с помощью метода выщелачивания образцы скаффолдов при гистологическом исследовании имеют высокую пористость, с размером пор от 1 до 100 мкм. Поры занимают от 35% до 45% площади скаффолда. При исследовании образцов с помощью сканирующей электронной микроскопии, нативный желатин имеет монолитную структуру без пор (см. Рисунок 2). Скаффолд, полученный методом выщелачивания, характеризуется большим количеством пор различного размера и соединяющих их каналов (см. Рисунок 1). Мы не нашли значительных отличий в морфологической структуре порогенных скаффолдов с лавитолом Б в сравнении с порогенными скаффолдами без лавитола Б.

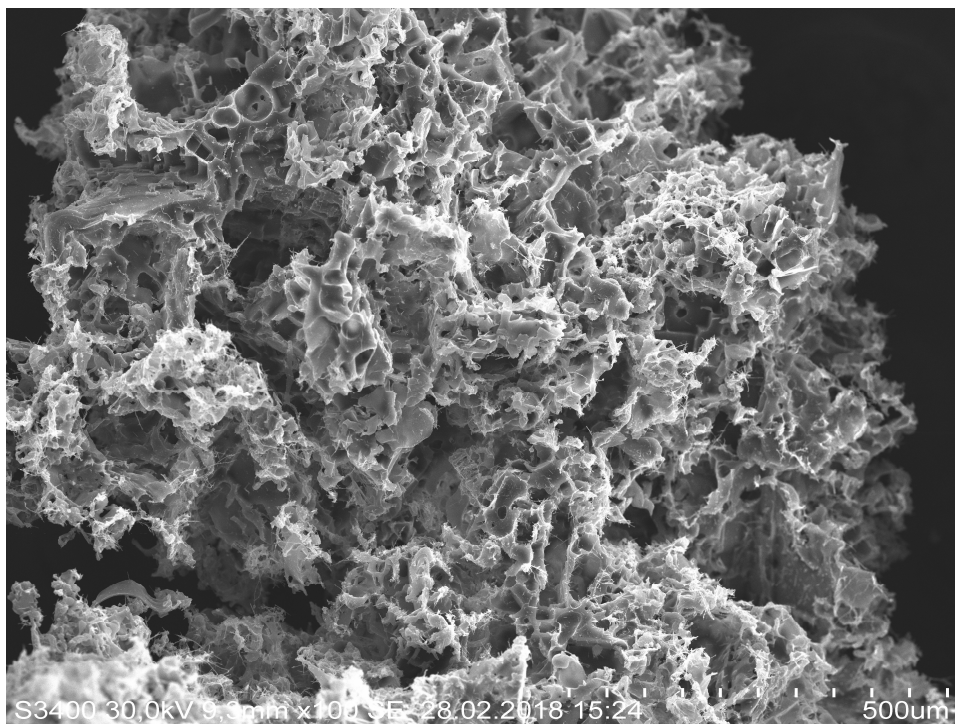


Рис. 1. Пористый скаффолд на основе 20% раствора желатина, полученный методом выщелачивания. Сканирующая электронная микроскопия, напряжение 30 кВ, увеличение 100.

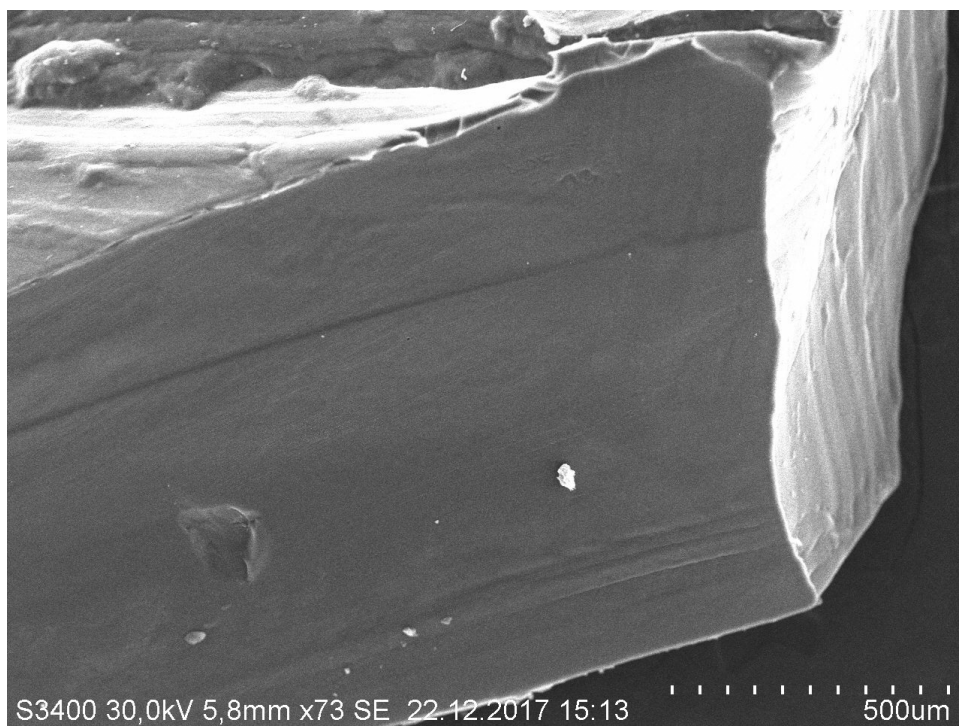


Рис. 2. Нативный скаффолд на основе 20% раствора желатина. Сканирующая электронная микроскопия, напряжение 30 кВ, увеличение 75.

Морфологическое исследование скаффолда, заселенного дермальными фибробластами. Полученные образцы скаффолда, заселенные дермальными крысиными фибробластами, при гистологическом исследовании имели вид высокопористой структуры с хаотично расположенными клеточными элементами (см. Рисунок 3). При исследовании с помощью сканирующей электронной микроскопии скаффолд имеет большое количество пор и соединяющих их каналов. Дермальные фибробласты расположены группами по 5-10 клеток и адгезированы к поверхности желатинового скаффолда (см. Рисунок 4).

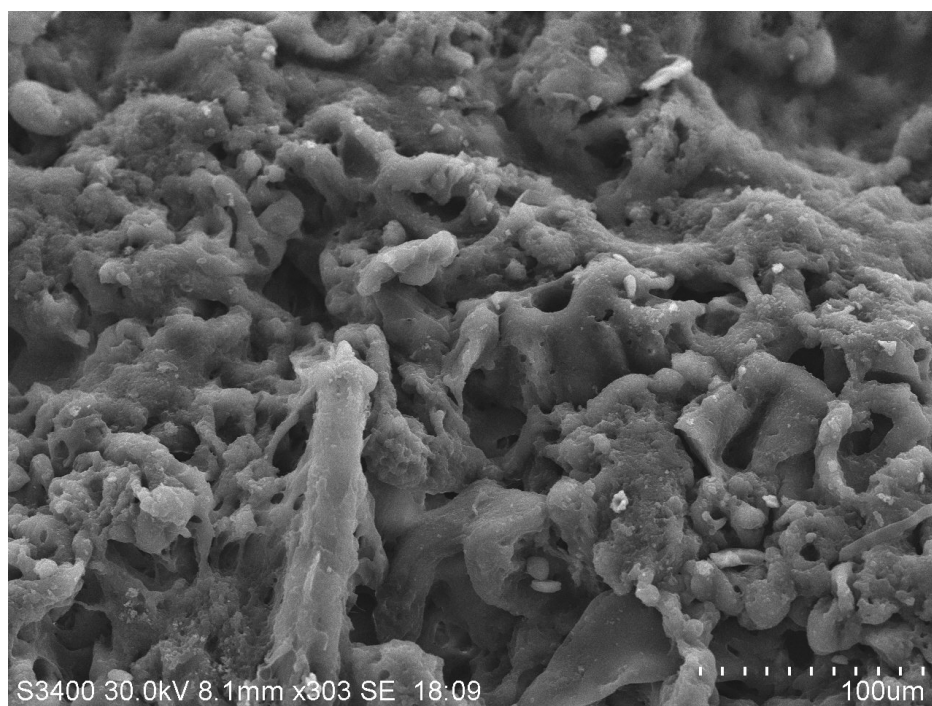


Рис. 3. Пористый скаффолд на основе 20% раствора желатина, заселенный дермальными фибробластами, 21 день культивирования. Сканирующая электронная микроскопия, напряжение 30 кВ, увеличение 303.

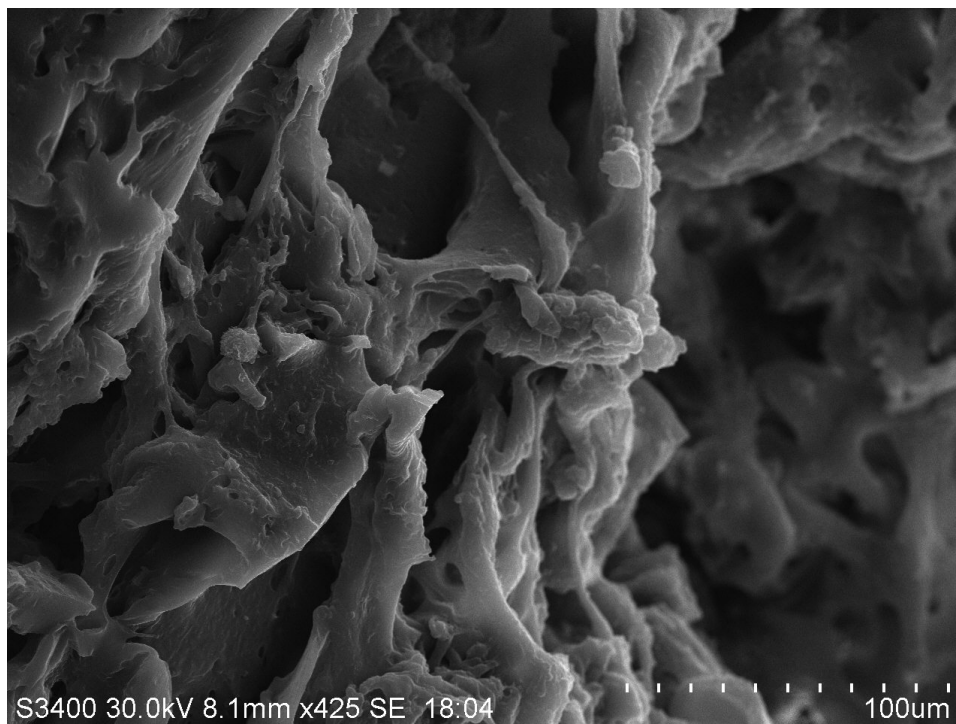


Рис. 4. Пористый скаффолд на основе 20% раствора желатина, заселенный дермальными фибробластами, 21 день культивирования. Сканирующая электронная микроскопия, напряжение 30 кВ, увеличение 100.

Обсуждение полученных результатов. Желатин – широко используемый в тканевой инженерии биологический полимер. Его биологические и физико-химические свойства обеспечивают высокие показатели выживаемости, адгезии и пролиферации клеток различного типа. Однако имеющееся количество вариантов модификации желатина для получения трехмерных структур, свидетельствует о наличии недостатков данных способов. Добавление к модифицированному желатин-глутаровому скаффолду дигидрокверцетина позволяет повысить количество химических сшивок волокон и увеличить выживаемость клеток. Однако требуется проведение дополнительных исследований для определения влияния дигидрокверцетина на выживаемость и пролиферацию дермальных фибробластов.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о возможности использования желатиновых скаффолдов, модифицированных глутаровым альдегидом и дигидрокверцетином для тканевой инженерии и 3D-клеточного культивирования за счет высоких показателей пористости скаффолда, его трехмерной структуры и наличия адгезионных сайтов для фибробластов кожи позволяют применять его для научных исследований.

Литература:

1. Mock C., Peck M., Peden M., Krug E, eds. A WHO plan for burn prevention and care. Geneva, World Health Organization, 2008.
2. H. S. Adenwalla, S. Bhattacharya. Dr. Joseph E. Murray. Indian J Plast Surg. 2012 Sep-Dec. 45(3). 596-597.
3. Atala A, Lanza RP. Preface. In: Atala A, Lanza RP, editors. Methods of tissue engineering. San Diego: Academic Press; 2001.
4. Iqbal N., Khan A.S. Recent concepts in biodegradable polymers for tissue engineering paradigms: a critical review. Journal International Materials Reviews. 2019. 64 (2). 91-126;
5. Eltom A., Zhong G. Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. 2019: 1-13.
6. Ghosala K., Agatemor C., Špitálský Z., Thomas S., Kny E. Electrospinning tissue engineering and wound dressing scaffolds from polymer-titanium dioxide nanocomposites. Chemical Engineering Journal. 2019 (358). 1262-1278.

7. Lee J.K., Link J.M. et al. The self-assembling process and applications in tissue engineering. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017 Nov 1. 7(11). a025668.
8. Chocholata P., Kulda V., Babuska K. Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. *Materials.* 2019. 12 (568). 1-25.
9. Holzwarth J.M., Ma P.X.: 3D nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *J. Mater. Chem.* 2011. 21, 10243-10251.
10. Monteiro N., Thirivikraman G., Athirasala A. et al. Photopolymerization of cell-laden gelatin methacryloyl hydrogels using a dental curing light for regenerative dentistry. *Dental Materials.* 2018. 34 (3). 389-399.
11. Lukas Kessler, Sandra Gehrke et al. Methacrylated gelatin/hyaluronan-based hydrogels for soft tissue engineering, *J Tissue Eng.* 2017 Jan-Dec. 8: 2041731417744157.
12. Zhang Y.Z., Venugopal J., Huang Z.M., Lim C.T., Ramakrishna S.: Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. *Polymer.* 2006. 47. 2911-2917.
13. Baranov I.A., Dzhons D.Yu. et al. Long-acting bioactive composition based on chitosan and taxifolin. *Inorganic Materials: Applied Research.* 2015. 6(5). 479-484.

References:

1. Mock C, Peck M, Peden M, Krug E, eds. A WHO plan for burn prevention and care. Geneva, World Health Organization, 2008.
2. H. S. Adenwalla, S. Bhattacharya. Dr. Joseph E. Murray. *Indian J Plast Surg.* 2012 Sep-Dec. 45 (3). 596-597.
3. Atala A, Lanza RP. Preface. In: Atala A, Lanza RP, editors. *Methods of tissue engineering.* San Diego: Academic Press; 2001.
4. Iqbal N., Khan A.S. Recent concepts in biodegradable polymers for tissue engineering paradigms: a critical review. *Journal International Materials Reviews.* 2019. 64 (2). 91-126;
5. Eltom A., Zhong G. Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. 2019: 1-13.
6. Ghosala K., Agatemor C., Špitálský Z., Thomas S., Kny E. Electrospinning tissue engineering and wound dressing scaffolds from polymer-titanium dioxide nanocomposites. *Chemical Engineering Journal.* 2019 (358). 1262-1278.
7. Lee J.K., Link J.M. et al. The self-assembling process and applications in tissue engineering. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017 Nov 1. 7(11). a025668.
8. Chocholata P., Kulda V., Babuska K. Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. *Materials.* 2019. 12 (568). 1-25.
9. Holzwarth J.M., Ma P.X.: 3D nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *J. Mater. Chem.* 2011. 21, 10243-10251.
10. Monteiro N., Thirivikraman G., Athirasala A. et al. Photopolymerization of cell-laden gelatin methacryloyl hydrogels using a dental curing light for regenerative dentistry. *Dental Materials.* 2018. 34 (3). 389-399.
11. Lukas Kessler, Sandra Gehrke et al. Methacrylated gelatin/hyaluronan-based hydrogels for soft tissue engineering, *J Tissue Eng.* 2017 Jan-Dec. 8: 2041731417744157.
12. Zhang Y.Z., Venugopal J., Huang Z.M., Lim C.T., Ramakrishna S.: Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. *Polymer.* 2006. 47. 2911-2917.
13. Baranov I.A., Dzhons D.Yu. et al. Long-acting bioactive composition based on chitosan and taxifolin. *Inorganic Materials: Applied Research.* 2015. 6 (5). 479-484.