

УДК 615.036.8
ББК P52.817.19

Д.И. РЯБКИН, А.И. СОКОЛОВ, С.С. ДЫДЫКИН, Д.С. БЛИНОВ,
У.Е. КУРИЛОВА, Е.В. БЛИНОВА, С.П. ТИМОШКИН, А.Ю. ГЕРАСИМЕНКО

БИОЛОГИЧЕСКАЯ СОВМЕСТИМОСТЬ И ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ФИБРОБЛАСТОВ, ЗАСЕЛЕННЫХ НА БИОКОМПОЗИТ, СФОРМИРОВАННЫЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И ПРИПОЕВ*

Ключевые слова: фибробласты, пролиферация, адгезия, крысы, биокompозит, припои.

Цель работы заключалась в определении жизнеспособности, пролиферативного потенциала и адгезивных свойств фибробластов, заселенных на поверхность объемного биокompозита, сформированного с использованием лазерного излучения и припоев, в опытах *in vitro*. **Материалы и методы.** Для исследования использовались фибробласты крысы линии Wistar, полученные в Национальном исследовательском центре эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи. Биокompозит формировался с использованием лазерного излучения и припоев. Оценка жизнеспособности клеток на поверхности биокompозита проводили при помощи мультипараметрической системы анализа клеточных культур RTCA iCELLigence (США). Цитотоксичность биокompозита определяли в тесте с трифенилтетразолия бромидом (MTT-тест, Merck Sigma-Aldrich, Швейцария). Пролиферативный потенциал и адгезивные свойства фибробластов изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа FEI Helios NanoLab 650. **Результаты и выводы.** С помощью электрофизической системы анализа клеточных культур доказана жизнеспособность клеток на поверхности и в объеме биокompозита, сформированного с использованием лазерного излучения и припоев. Продемонстрировано отсутствие цитотоксичности биокompозита при воздействии трифенилтетразолия бромида в спектрофотометрическом MTT-тесте. Установлено, что при инкубации фибробластов крысы в объеме биокompозита не наблюдается гибели клеток, а, напротив, происходит стимулирование их пролиферативного потенциала за счет увеличения адгезии, которая способствует формированию плотного клеточного слоя. **Выводы.** Биокompозит в целом, как и отдельные его элементы, создаёт благоприятную среду для роста культуры фибробластов и может быть использован при восстановлении целостности кровеносных сосудов с использованием лазерного излучения и припоев.

Актуальность. В настоящее время в связи с применением биоматериалов, заселенных клетками, связаны успехи регенеративной медицины в лечении широкого спектра патологических состояний, ассоциированных с повреждениями тканей и органов, а суммарный объем инвестиций в эту область здравоохранения оценивается в 1 млрд долл. США [4].

По данным ВОЗ, охватывающим период с 2000 по 2019 г., болезни сердца и магистральных сосудов остаются лидирующими причинами смертности в мире [1, 2]. Среди причин развития сердечно-сосудистой патологии важное место занимают мультифокальный атеросклероз, травматическое повреждение артерий, аневризмы аорты и других магистральных сосудов, ревматические заболевания сердца, а также более редкая патология. Частота развития ане-

* Исследования по взаимодействию лазерного излучения с белками и углеродными нано-трубками выполнены за счёт гранта Российского научного фонда № 22-75-00089, <https://rscf.ru/project/22-75-00089>, *in vitro* исследования выполнены при поддержке гранта Президента Российской Федерации НШ-843.2022.3 (соглашение № 075-15-2022-842 от 12 мая 2022 г.).

вризм брюшного отдела аорты составляет 29–38% от всех локализаций данного заболевания. При этом у 40% пациентов в течение первого года наблюдается разрыв аневризмы аорты, что является показанием к экстренному хирургическому лечению [2].

Применение синтетических конструкций для протезирования сосудов крупного калибра, чей диаметр превышает 8 мм (например, подвздошная артерия), демонстрирует 90% долгосрочного клинического успеха [3]. Почти такой же уровень надежности отмечен у синтетических конструкций при их применении для замещения участков сосудистых стволов среднего калибра (6–8 мм).

Скаффолды для замещения или пластики сосудистого фрагмента могут быть получены с использованием ряда полимерных соединений. Среди них поликапролактон, полилактат, полигликолевая кислота, поли (L-молочная) кислота, поликарбонат, термопластичный полиуретан, полиэстерифицированная мочевиная, полиглицерол себакат, поли-р-диоксанон. Из полимеров природного происхождения можно выделить полигидроксиканоаты, децеллюлиризованный мактрикс и др. [6]. К природным полимерам также относятся коллаген, эластин, фибрин, фибронектин и желатин. Все они принимают участие в формировании определенных слоев артериальной сосудистой стенки [5]. Эти полимерные вещества обладают сходством с природным межклеточным матриксом и тем самым могут создавать благоприятные условия для роста и дифференцировки клеточных элементов сосудистой стенки [5].

Биоматериалы, используемые в клинической хирургии, должны, с одной стороны, создавать оптимальные условия для колонизации целевыми клеточными популяциями, а с другой – обеспечивать необходимые для имплантации клеток условия в послеоперационном периоде. В этой связи идеальный биоматериал должен быть клеточно совместимым, обеспечивать механическую поддержку и функциональную активность клеток после трансплантации, активировать инфильтрацию аутологичными клетками и обладать свойствами управляемой или прогнозируемой биорезорбции.

Цель исследования – определение жизнеспособности, пролиферативного потенциала и адгезивных свойств фибробластов, засеянных на поверхности объемного биокомпозита, сформированного с использованием лазерного излучения и припоев, в опытах *in vitro*.

Материалы и методы исследования. Предметом исследования явились фибробласты крысы линии Wistar и структурные элементы биокомпозита, сформированные с использованием лазерного излучения и припоев (водных дисперсий на основе углеродных нанотрубок, бычьего сывороточного альбумина и прочих компонентов). Жизнеспособность фибробластов в присутствии элементов биокомпозита определяли в МТТ-тесте с трифенилтетразолия бромидом (МТТ-тест, Merck Sigma-Aldrich, Швейцария). Пролиферативный потенциал клеток оценивали при помощи мультипараметрической системы анализа клеточных культур RTCA iCELLigence (США). Для этого с помощью аналитического счетчика Scepter осуществляли подсчет клеток в лунке, при этом итоговое количество клеток составляло $1,17 \times 10^5$ в 1 мл, средний объем клеток составлял 1,71 пл, средний диаметр клетки – 14,36 мкм. После проведения настройки параметров эксперимента системы и аппарата iCELLigence производили снятие базового значения сопротивления в лунках относительно значения для среды культивирования. Длительность этого этапа составила 1 мин. Затем, на втором этапе проводили добавление клеток в лунку со средой и для контроля

чистую среду в лунку, после чего оценивали адгезию клеток ко дну лунки. Длительность данного этапа составляла 240 мин, при частоте регистрации показателя 1 раз в 1 мин. На третьем этапе осуществляли оценку пролиферативного потенциала клеток. Для этого в течение 20 ч с частотой 1 раз в 15 мин автоматически регистрировали показатель электрического сопротивления. На четвертом этапе эксперимента оценивали влияние биокомпозита, сформированного с использованием лазерного излучения и припоев, на клетки: проводили регистрацию короткого периода (продолжительностью 3 ч) и длительного периода (продолжительностью 163 ч) воздействия скаффолда на клетки при регистрации показателя электрического сопротивления каждые 15 мин наблюдения. Для исследования биосовместимости проводились эксперименты, связанные с культивированием клеток фибробластов на поверхности образцов. На каждый из образцов были высажены фибробласты. Клетки культивировали в среде DMEM-90% с добавлением 10% фетальной сыворотки. На дно каждой лунки культурального планшета помещали образец, далее добавлялась суспензия клеток в количестве $\sim 4 \times 10^4$ клеток/мл. Клетки на образцах инкубировались в культуральных планшетах в CO_2 термостате при 37°C в течение 3, 24, 48 и 72 ч, после чего производились их фиксация раствором глутарового альдегида и получение изображений с помощью сканирующего электронного микроскопа FEI Helios NanoLab 650.

Результаты исследования и их обсуждение. Многопараметрическая система анализа клеточных культур RTCA iCELLigence способна исследовать жизнеспособность клеток в режиме реального времени до, во время и после любого воздействия на них. Принцип определения жизнеспособности клеток в RTCA iCELLigence основан на непрерывном измерении электрического сопротивления в образце, расположенном на поверхности электрода, встроенного в реакционный модуль устройства. Значение импеданса, считываемое с электродов, отражает изменения количества клеток, их адгезии, размера и морфологии, а также жизнеспособности. Результаты проведенных экспериментов показали, что на протяжении первых 24 ч инкубации культур фибробластов без добавления образцов наблюдается активный рост клеток. При этом в первые 3 ч наблюдалась активная адгезия клеток к стенкам лунки, затем – активировались пролиферативные процессы.

Введение в среду культивации биокомпозитов через 24 ч после начала эксперимента сопровождалось появлением резкого скачка сопротивления во всех исследуемых лунках, что было связано с непродолжительным по времени изменением физико-химических свойств среды во всех лунках с внесенными образцами. После этого наблюдали постепенную стабилизацию клеточной пролиферации в экспериментальных образцах. Это представляло собой двухфазный процесс в виде инициального незначительного снижения сопротивления, за которым следовало постепенное и плавное нарастание пролиферативной активности с выходом на уровень плато к 55–60 ч инкубации (рис. 1).

Во всех исследуемых лунках пролиферативный потенциал фибробластов после добавления биокомпозита (интактный и размельченный образцы 0,001% диспергированные углеродные нанотрубки, 25% альбумин и 2% хитозан) не подавлялся, напротив, наблюдали продолжающуюся пролиферацию и рост клеточной популяции. Погрешность измерения пролиферативного потенциала в ходе эксперимента составляла не более 0,3.

Анализ клеток в реальном времени показал улучшение пролиферации клеток по сравнению с контролем в течение всего времени инкубации, при этом

самые большие различия наблюдались после 25 ч инкубации. По окончании эксперимента значение пролиферативного потенциала фибробластов в присутствии образца вдвое превышало значение для контроля клеток. Использование непрерывного анализа позволило увидеть небольшое снижение интенсивности пролиферации на промежутках 24–35 ч для контрольного образца и 35–42 ч для образца биоконструкта, которое может быть связано как с отдаленными эффектами процесса внесения образца, так и с особенностями распределения клеток по поверхности с промежутками повышенной клеточной плотности, где рост замедлялся ввиду нехватки свободного пространства.

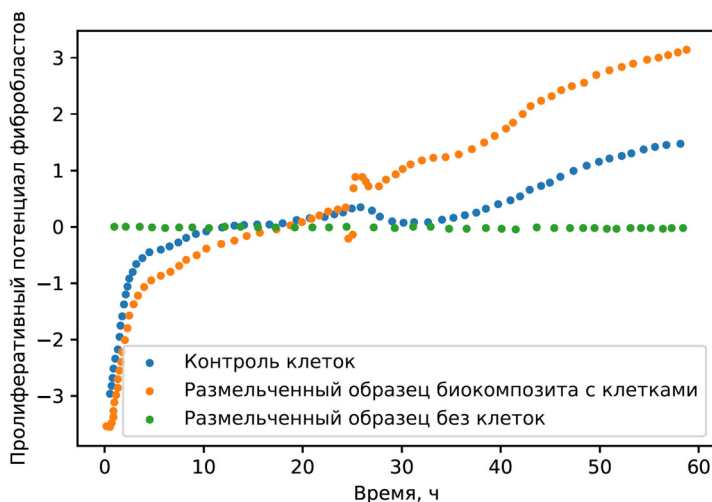


Рис. 1. Динамика пролиферации фибробластов с измельченным образцом конструкта: красная линия – контроль клеток; зеленая линия – измельченный образец конструкта с клетками; синяя линия – измельченный образец без клеток

МТТ-тест позволяет количественно оценить процесс пролиферации клеток на экспериментальных образцах по сравнению с контролем, где воздействие образца отсутствует (покрывное стекло). Результаты МТТ-теста фибробластов, культивированных с образцами биоконструкта, представлены на рис. 2. Спустя 3 ч количество клеток на контрольных и экспериментальных образцах практически одинаково. После 24 ч на экспериментальном образце наблюдается большее количество клеток по сравнению с контролем. Данный промежуток времени связан с окончанием процесса осаждения клеток и началом фазы активного распространения по поверхности. Повышенное количество клеток на образце биоконструкта связано с улучшенной адгезией клеток к его элементам. Через 48 ч культивирования количество клеток в образце возрастает более значительно, данная тенденция сохраняется и к окончанию эксперимента, через 72 ч. Таким образом, МТТ-тест наглядно показывает, что образцы биоконструкта не оказывают ингибирующего воздействия на клетки, повышают их адгезию и пролиферацию.

Рост клеток на биоматериале может быть успешен при соблюдении комплекса условий. Пористость биоматериала, размер пор, шероховатость поверхности влияют на адгезию клеток, их рост и способность выполнять свои функции. Результаты роста клеток фибробластов через разные периоды времени на изготовленных конструкциях представлены на рис. 3.

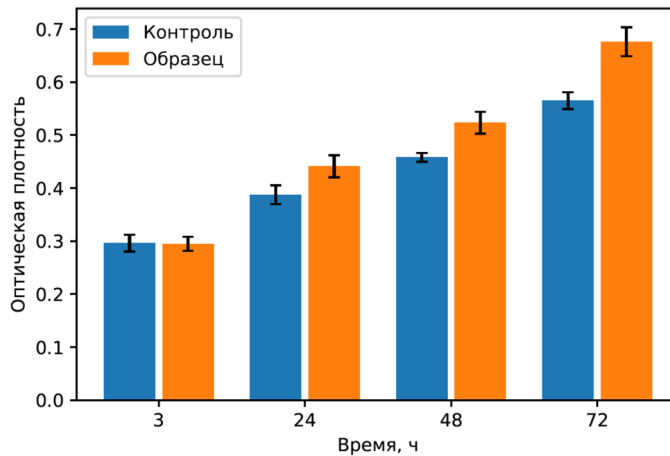


Рис. 2. Результаты МТТ-теста для образцов биокompозитов и контроля в течение 3 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч

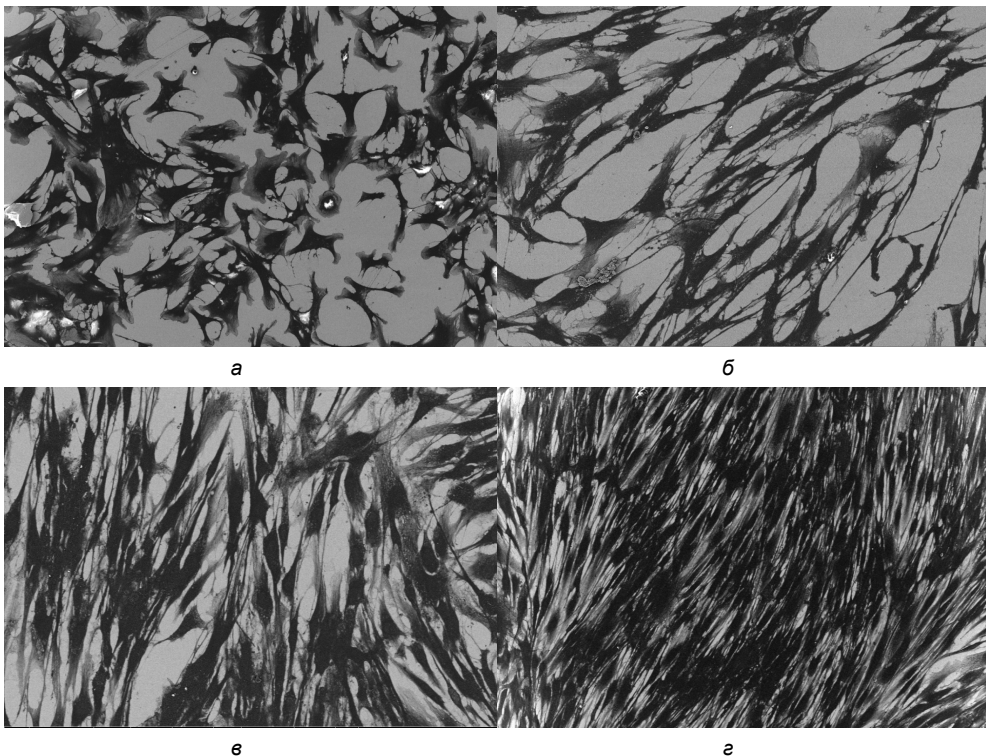


Рис. 3. Микроскопические изображения клеток фибробластов после культивирования в течение 3 ч (а), 24 ч (б), 48 ч (в), 72 ч (г)

Через 24 ч культивирования фибробласты приобретают более вытянутую форму, что является правильной морфологией в процессе их роста. Через 48 ч клетки продолжают вытягиваться и расплываться и спустя 72 ч покрывают всю доступную поверхность образца.

Выводы. Таким образом было показано, что ни сам биокомпозит, сформированный с использованием лазерного излучения и припоев, ни компоненты его нанокремнистого каркаса, ни отдельные компоненты природного матрикса не оказывают цитотоксического действия на культуры фибробластов крысы. Биокомпозит в целом, как и отдельные его элементы, создают благоприятную среду для роста культуры фибробластов и может быть использован в реконструктивной хирургии сосудов.

Литература

1. Здравоохранение в России. 2015: стат. сб. / Росстат. М., 2015. 174 с.
2. Применение клеточно-инженерных конструкций в хирургическом лечении повреждений артерий крупного диаметра в эксперименте / О.В. Дракина, А.И. Соколов, Е.В. Блинова и др. // Вестник новых медицинских технологий. 2022. Т. 29, № 2. С. 43–46.
3. Brewster D.C., Hospital F.M.G., School H.M. Current controversies in the management of aortoiliac occlusive disease. *J. Vasc. Surg.*, 1997, vol. 25, pp. 365–379.
4. Capella-Monsonís H., De Pieri A., Peixoto R. et al. Extracellular matrix-based biomaterials as adipose-derived stem cell delivery vehicles in wound healing: a comparative study between a collagen scaffold and two xenografts. *Stem Cell Res Ther.*, 2020, vol. 11, p. 510.
5. Kakisis J.D., Liapis C.D., Breuer C. et al. Artificial blood vessel: The Holy Grail of peripheral vascular surgery. *J. Vasc. Surg.*, 2005, vol. 41, pp. 349–354.
6. Stowell C.E.T., Wang Y. Quickening: Translational design of resorbable synthetic vascular grafts. *Biomaterials*, 2018, vol. 173, pp. 71–86.

РЯБКИН ДМИТРИЙ ИГОРЕВИЧ – кандидат физико-математических наук, ассистент Института бионических технологий и инжиниринга, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Россия, Москва (ryabkin@bms.zone; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1327-5690>).

СОКОЛОВ АЛЕКСЕЙ ИЛЬЯСОВИЧ – аспирант кафедры факультетской хирургии, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва, Россия, Саранск (dr.alex.sokolov@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7515-2314>).

ДЫДЫКИН СЕРГЕЙ СЕРГЕЕВИЧ – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой оперативной хирургии и топографической анатомии, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Россия, Москва (dydykin_ss@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1273-0356>).

БЛИНОВ ДМИТРИЙ СЕРГЕЕВИЧ – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом молекулярной и клинической фармакологии, Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачёва, Россия, Москва (blinov-pharm@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8385-4356>).

КУРИЛОВА УЛЬЯНА ЕВГЕНЬЕВНА – младший научный сотрудник, Центр цифрового биодизайна и персонализированного здравоохранения, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Россия, Москва (kurilova_10@mail.ru).

БЛИНОВА ЕКАТЕРИНА ВАЛЕРИЕВНА – доктор медицинских наук, профессор, кафедра клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет); кафедра фундаментальной медицины, Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Россия, Москва (bev-sechenov@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0050-0251>).

ТИМОШКИН СЕРГЕЙ ПАВЛОВИЧ – кандидат медицинских наук, докторант кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Россия, Москва (timoshkin-sergej@list.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5518-6859>).

ГЕРАСИМЕНКО АЛЕКСАНДР ЮРЬЕВИЧ – кандидат физико-математических наук, доцент, Институт биомедицинских систем, Национальный исследовательский университет «Московский институт электронной техники», Россия, Зеленоград (gerasimenko@bms.zone; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6514-2411>).

Dmitrii I. RYABKIN, Aleksey I. SOKOLOV, Sergey S. DYDYKIN,
Dmitry S. BLINOV, Ulyana E. KURILOVA, Ekaterina V. BLINOVA,
Sergey P. TIMOSHKIN, Aleksandr Yu. GERASIMENKO

**BIOLOGICAL COMPATIBILITY AND PROLIFERATIVE POTENTIAL
OF FIBROBLASTS SEEDDED ON BIOCOMPOSITE FORMED USING
LASER RADIATION AND SOLDERS**

Key words: fibroblasts, proliferation, adhesion, rats, tissue engineering construct.

The aim of the work was to determine the viability, proliferative potential and adhesive properties of fibroblasts seeded on the surface and in the volume of a biocomposite formed using laser radiation and solders in *in vitro* experiments. **Materials and methods.** For the study, Wistar rat fibroblasts obtained at the National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamalei were used. The biocomposite was formed using laser radiation and solders. The viability of cells on the surface of the biocomposite was assessed using the multiparametric RTCA iCELLigence cell culture analysis system (USA). The cytotoxicity of the biocomposite was determined in combination with triphenyltetrazolium bromide (MTT test, Merck Sigma-Aldrich, Switzerland). The proliferative potential and adhesive properties of fibroblasts were studied using a FEI Helios NanoLab 650 scanning electron microscope. **Results and conclusions.** The viability of cells on the surface and in the volume of a biocomposite formed using laser radiation and solder was proved using an electrophysical system for analyzing cell cultures. The absence of cytotoxicity of the biocomposite under the action of triphenyltetrazolium bromide in the spectrophotometric MTT test was demonstrated. It was found that during incubation of rat fibroblasts in the volume of the biocomposite, cell death is not observed, but, on the contrary, their proliferative potential is stimulated by increasing adhesion, which contributes to the formation of a dense cell layer. **Conclusions.** Biocomposite as a whole, as well as its individual elements, creates a favorable environment for the growth of fibroblast culture and can be used to restore the integrity of blood vessels using laser radiation and solder.

References

1. *Zdravoohranenie v Rossii. 2015: stat. sb.* [Healthcare in Russia: Statistical compendium]. Moscow, Rosstat Publ., 2015, 174 p.
2. Drakina O.V., Sokolov A.I., Blinova E.V. et al. *Primenenie kletочно-инженерных конструкций в хирургическом лечении повреждений артерий крупного диаметра в эксперименте* [Implantation of cell-engineered structures in the experimental surgical treatment of large diameter arterial injuries]. *Vestnik novykh medicinskih tekhnologii*, 2022, vol. 29, no. 3, pp. 43–46.
3. Brewster D.C., Hospital F.M.G., School H.M. Current controversies in the management of aortoiliac occlusive disease. *J. Vasc. Surg.*, 1997, vol. 25, pp. 365–379.
4. Capella-Monsonis H., De Pieri A., Peixoto R. et al. Extracellular matrix-based biomaterials as adipose-derived stem cell delivery vehicles in wound healing: a comparative study between a collagen scaffold and two xenografts. *Stem Cell Res Ther.*, 2020, vol. 11, p. 510.
5. Kakisis J.D., Liapis C.D., Breuer C. et al. Artificial blood vessel: The Holy Grail of peripheral vascular surgery. *J. Vasc. Surg.*, 2005, vol. 41, pp. 349–354.
6. Stowell C.E.T., Wang Y. Quickening: Translational design of resorbable synthetic vascular grafts. *Biomaterials*, 2018, vol. 173, pp. 71–86.

DMITRII I. RYABKIN – Candidate of Physical and Mathematical Sciences, Assistant Professor, Institute of Bionic Technologies and Engineering, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenovskiy University), Russia, Moscow (ryabkin@bms.zone; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1327-5690>).

ALEKSEY I. SOKOLOV – Post-Graduate Student of Faculty Surgery Department, N.P. Ogarev Mordovian State University, Russia, Saransk (dr.alex.sokolov@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7515-2314>).

SERGEY S. DYDYKIN – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Operative Surgery and Topographic Anatomy Department, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenovskiy University), Russia, Moscow (dydykin_ss@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1273-0356>).

DMITRY S. BLINOV – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of Molecular and Clinical Pharmacology Department, Dmitry Rogachev National Research Medical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Russia, Moscow (blinov-pharm@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8385-4356>).

ULYANA E. KURILOVA – Junior Researcher, Center for Digital Bioxy and Personalized Health, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenovskiy University), Russia, Moscow (kurilova_10@mail.ru).

EKATERINA V. BLINOVA – Doctor of Medical Sciences, Professor, Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenovskiy University); Department of Fundamental Medicine, National Research Nuclear University MEPhI, Russia, Moscow (bev-sechenov@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0050-0251>).

SERGEY P. TIMOSHKIN – Candidate of Medical Sciences, Operative Surgery and Topographic Anatomy Department, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenovskiy University), Russia, Moscow (timoshkin-sergej@list.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5518-6859>).

ALEKSANDR Yu. GERASIMENKO – Candidate of Physical and Mathematical Sciences, Associate Professor, Institute of Biomedical Systems, National Research University of Electronic Technology, Russia, Zelenograd (gerasimenko@bms.zone; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6514-2411>).

Формат цитирования: Рябкин Д.И., Соколов А.И., Дыдыкин С.С., Блинов Д.С., Курилова У.Е., Блинова Е.В., Тимошкин С.П., Герасименко А.Ю. Биологическая совместимость и пролиферативный потенциал фибробластов, заселенных на биокомпозит, сформированный с использованием лазерного излучения и припоев [Электронный ресурс] // Acta medica Eurasica. – 2023. – № 1. – С. 93–100. – URL: <http://acta-medica-eurasica.ru/single/2023/1/11>. DOI: 10.47026/2413-4864-2023-1-93-100.