

МОДИФИКАЦИЯ БИОДЕГРАДИРУЕМОГО ВОЛОКНИСТОГО МАТРИКСА ЭПИДЕРМАЛЬНЫМ ФАКТОРОМ РОСТА ПРИ ЭМУЛЬСИОННОМ ЭЛЕКТРОФОРМОВАНИИ ДЛЯ СТИМУЛИРОВАНИЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Т.Х. Тенчурин¹, А.В. Ляндуп², А.Г. Демченко², М.Е. Крашенинников², М.В. Балясин²,
И.Д. Клабуков², А.Д. Шепелев¹, В.Г. Мамагулашвили¹, А.С. Орехов¹,
С.Н. Чвалун¹, Т.Г. Дюжева²

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

² Институт регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Modification of biodegradable fibrous scaffolds with Epidermal Growth Factor by emulsion electrospinning for promotion of epithelial cells proliferation

T.H. Tenchurin¹, A.V. Lyundup², A.G. Demchenko², M.E. Krasheninnikov², M.V. Balyasin², I.D. Klabukov²,
A.D. Shepelev¹, V.G. Mamagulashvili¹, A.S. Orehov¹, S.N. Chvalun¹, T.G. Dyuzheva²

¹ National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Institute for regenerative medicine, Moscow, Russia

Обеспечение физиологически релевантного клеточного микроокружения является серьезной проблемой при создании тканеинженерных конструкций на основе биосовместимых и биodeградируемых полимерных материалов. Цель исследования — разработка методики функционализации каркасов, полученных методом эмульсионного электроформования, путем введения в структуру волокна эпидермального фактора роста (EGF) и оценка влияния модифицированных материалов на пролиферацию эпителиальных клеток *in vitro*. Эмульсионным электроформованием получены функционализированные EGF волокнистые матриксы из поликапролактона. Методами иммуноферментного и биосенсорного анализа проведена оценка выхода EGF из модифицированных матриксов и определена степень его влияния на пролиферацию клеточной линии MCF7.

Ключевые слова: тканевая инженерия, клеточная пролиферация, биodeградируемые материалы, внеклеточный матрикс, поликапролактон, электроформование, EGF, GFP, эпителиальные клетки.

Введение

Использование биосовместимых полимерных материалов в качестве имплантатов и каркасов для тканеинженерных конструкций отчасти неэффективно, поскольку не обеспечивает физиологически релевантное клеточное микроокружение, несмотря на достижение необходимой механической прочности. Дискуссионным остается вопрос о преимуществах использования естественных материалов (полученных методами децеллюляризации) по сравнению с синтетическими [1], подобранными по механическим свойствам и биосовместимости. Повысить способность синтетического материала встраиваться в организм можно за счет его модификации биохимическими методами [2]. В настоящее время модификация каркасов для тканеинженерных конструкций проводится с использованием иммобилизованных на поверхностях или инкорпорированных в структуру волокна ростовых факторов, которые создают условия для активизации регенерации тканей [3–8].

Исследование процесса взаимодействия клеток с окружающими их структурами привело к развитию методов изготовления каркасов, наделенных строением и функцией биологических тканей из

Supporting of a physiologically relevant cellular micro-environment is currently a grand challenge in the design of tissue-engineering grafts based on biocompatible and biodegradable polymeric materials. The aim of this research was to develop a new technique of a fibrous polycaprolactone-based scaffold modification with epidermal growth factor (EGF) and assessment of its effect on scaffold properties and proliferative activity of epithelial cells *in vitro*. Fibrous scaffolds from EGF-functionalized polycaprolactone has received by the emulsion electrospinning method. Prolonged yield of EGF upon the material destruction and its biological effect on the MCF7 cell line proliferation have been estimated using ELISA and iCELLigence real-time cell analysis for respectively.

Keywords: tissue engineering, cell proliferation, biodegradable plastics, polycaprolactone, extracellular matrix, electrospinning, EGF, GFP, epithelial cells.

биосовместимых полимеров синтетического и природного происхождения. В организме пространственное строение органа представлено внеклеточным матриксом, состоящим в основном из волокон коллагена и аморфного вещества. Для воссоздания подобной структуры целесообразно использовать метод электроформования, позволяющий получать волокнистую сетку (каркас) из нано- и микроволокон [9, 10].

Целью настоящей работы являлась разработка методики функционализации волоконных матриксов, полученных методом эмульсионного электроформования, путем введения в структуру волокон эпидермального фактора роста (EGF) и оценка влияния модифицированных матриксов на пролиферацию эпителиальных клеток *in vitro*.

Материал и методы

Биологически активное соединение (БАС). Для модификации матрикса был выбран EGF (Invitrogen, США) — белок, стимулирующий пролиферацию и дифференцировку эпителиальных клеток, который входит в состав специальных питательных сред

для культивирования эпителиоцитов из разных источников [10]. Для визуализации волокон в конфокальной микроскопии использовали зеленый флуоресцентный белок (GFP) (ИБХ РАН, Россия).

Расчет необходимой концентрации EGF. По спецификации производителя концентрация EGF, необходимая для активации клеток, составляла ED50 = 250 пг/мл. Для 100% активации клеток в культуре была выбрана концентрация ED50×3 = 750 пг/мл.

Методика модификации волокнистых материалов. Для создания каркасов применяли ПКЛ 80 кДа (Sigma Aldrich, США), который ранее был проверен на цитосовместимость при использовании клеток линий 3T3/N1H и MCF7 [11].

Для приготовления формовочного раствора, содержащего GFP или EGF, необходимо сначала получить относительно устойчивую смесь двух несмешивающихся жидкостей: хлороформа и фосфатного буфера (PBS). После смешивания время жизни такой системы (эмульсии) будет невелико [3, 12, 13]. Поэтому для повышения стабильности эмульсии использовали поверхностно-активное вещество (ПАВ) биосовместимый плуроник F-127 (Pluronic F-127, Sigma-Aldrich, США). Однородную эмульсию получали путем перемешивания хлороформа и PBS, содержащего EGF или GFP, на магнитной мешалке в течение 24 ч. при максимальной интенсивности (1000 об/мин). Дополнительное диспергирование эмульсии проводили в ультразвуковой ванне S40 Elmasonic (Singen, Германия) с использованием ледяной бани в течение 15 мин. На стадиях механического и ультразвукового диспергирования для определения содержания активной формы EGF из эмульсии отбирали пробы, маркированные B1 и B2, соответственно. После чего в приготовленной эмульсии растворяли ПКЛ таким образом, чтобы соотношение между ПКЛ и EGF составило 1 г/5500 нг. При флуоресцентном маркировании волокон использовали соотношение между ПКЛ и GFP 1 г/160 нг. В качестве отрицательного контроля при исследовании биологического эффекта *in vitro* были изготовлены две серии контрольных образцов: первые (К.1) имели в своем составе ПАВ, но не содержали БАС; вторые (К.2) не имели в своем составе ни ПАВ, ни БАС. Состав формовочного раствора, используемого для получения модифицированных матриц, представлен в таблице.

Электроформование образцов. Экспериментальные образцы изготавливали на лабораторной однокапиллярной установке, обеспечивающей устойчивый во времени процесс получения волокон. Формование образцов проводили при напряжении 22 кВ и объемном расходе формовочного раствора 6 мл/ч на вращающийся металлический цилиндр (20 об/мин) диаметром 4,3 мм, расстояние между дозирующим капилляром и приемным электродом составляло 30 см. После изготовления все образцы вакуумировались при разрежении 1 мбар в течение 1 сут. Полученные матрицы были стерилизованы гамма-излучением (гамма-облучательная установка

ГУТ-200М, Курчатовский институт) в дозе 15 кГр в контейнерах «Клиника».

Определение размера частиц дисперсной фазы в эмульсии. Измерение дисперсности эмульсий проводили методом динамического рассеяния света на анализаторе размера наночастиц и дзета потенциала Malvern Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments, Великобритания).

Измерение контактных углов смачивания. Измерение краевых углов смачивания биосовместимых нетканых материалов проводилось с помощью системы анализа формы капли DSA 30E (Krüss GmbH, Германия).

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Морфологию поверхности нетканых волокнистых материалов изучали с помощью сканирующего электронно-ионного микроскопа Versa 3D DualBeam (FEI, США) в режиме высокого вакуума с использованием ISE-детектора вторичных электронов. Для определения среднего диаметра волокна измеряли не менее 100 волокон с помощью программы Scope Photo Image Software (ScopeTek, Китай).

Культуры клеток. Для тестирования матричных свойств была выбрана клеточная линия MCF7 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН, Санкт-Петербург) — эпителиальная линия опухолевых клеток протока молочной железы человека, одна из наиболее часто используемых в исследованиях линий клеток с характеристиками дифференцированного эпителия, которая ранее показала свою адекватность как модельная культура для заселения искусственных каркасов [14]. Клетки культивировали в стандартных условиях в CO₂-инкубаторе с концентрацией углекислого газа 5%, атмосферного воздуха 95% и с повышенной влажностью. Состав полной питательной среды: DMEM/F12 (Invitrogen, США), содержащей 10% телячьей фетальной сыворотки FBS Defined (HyClone, США) и 1% пенициллина/стрептомицина (Invitrogen, США). Замену питательной среды осуществляли каждые 3 сут.

Микроскопия. Микрофотографии волокон, содержащих в своем составе флуоресцентные белки, получали с помощью микроскопа Axio Imager 2 (Carl Zeiss, Швейцария) с модулем для флуоресцентного анализа.

Иммуноферментный анализ выхода EGF. Образцы каркасов, массой от 1 до 1,7 мг, помещали в лунки планшета с 1 мл среды DMEM (без сыворотки), содержащей 0,1% бычьего сывороточного альбумина, инкубировали от 2 до 77 сут., после чего отбирали 1 мл раствора и оценивали выход EGF из матрикса иммуноферментным «сэндвич» методом (ИФА) с использованием моноклональных антител к EGF (клон С6, ВНЦМДЛ, Россия). Оптическую плотность измеряли при 450 нм на спектрофотометре Multiskan FC Microplate Photometer (Thermo Scientific, США). Инструментальная погрешность измерений составляла 0,001 единицы оптической плотности в соответствии с паспортом.

Таблица. Состав формовочного раствора для получения волокон

Содержание компонентов, масс %	ХФ	ПКЛ	F-127	PBS с белком
	89,8	8,6	1	0,6

Пробы В1 и В2 объемом 0,5 мл, взятые при изготовлении эмульсии для оценки содержания EGF в активной форме, были высушены под вакуумом, а остаток растворен в 1 мл питательной среды.

Изучение биологического эффекта модифицированных каркасов in vitro. Для оценки биологического эффекта модификации *in vitro* использовали биосенсорный анализ в режиме реального времени на клеточном анализаторе iCelligence (ACEA, США). Поверхность ячейки планшета анализатора покрыта на 70–80% микроэлектродами, на которые подается электрический потенциал (22 мВ), не влияющий на состояние и поведение клеток. В режиме реального времени измерялся клеточный индекс (КИ):

$$\text{КИ} = \frac{\text{Импеданс в определенный временной промежуток } n - \text{Импеданс в отсутствие клеток}}{\text{Номинальное значение импеданса}}$$

Значения импеданса зависят от количества адгезированных клеток, их размера и формы, а также от силы адгезии к субстрату.

Эпителиальные клетки высевали в лунки специального планшета (площадь лунки 0,64 см²) с плотностью 60×10³ кл/см². Образцы каркасов стандартизировали по форме (круг площадью 0,33 см²) и массе (~1 мг) и помещали на культуру клеток через 17 ч. после посева (экспоненциальная фаза роста). В качестве положительного контроля эффекта использовали EGF в концентрации ED50, отрицательным контролем служила полная питательная среда без сыворотки. Для контроля значений базового уровня КИ применяли одинаковый для всего эксперимента объем полной питательной среды — 600 мкл. Значения КИ (относительный импеданс клеток) фиксировали в течение 87 ч.

Результаты и обсуждение

Из опубликованных ранее работ [15], было известно, что из растворов ПКЛ можно получать волокна диаметром от 2 до 24 мкм. На основании проведенных экспериментов удалось определить состав эмульсии ХФ/PBS + ПАВ, а также режим диспергирования, позволявший включать в структуру таких волокон дисперсионную фазу с биологически активными веществами. Анализ дисперсного состава приготовленной эмульсии (рис. 1) показал, что

приблизительно 95% частиц имеют размер менее 1000 нм. Размеры остальных частиц находятся в диапазоне от 1000 до 7000 нм.

Изображения волокон, содержащих GFP, полученные методом флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии, представлены на рис. 2. Флуоресцентные метки размерами от 0,3 до 4 мкм введены в структуру полимерного волокна. Модифицированные материалы обладают широким диапазоном распределения волокон по диаметру. Средний диаметр волокон, рассчитанный из анализа микрофотографий волокнистых образцов на основе ПКЛ, составляет 2,1 мкм.

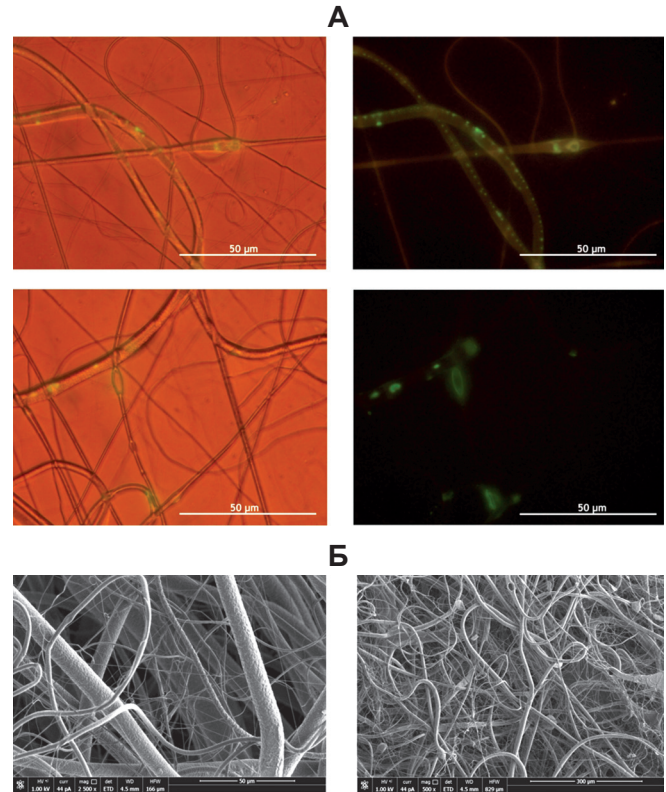


Рис. 2. Волокна ПКЛ, содержащие флуоресцентную метку GFP (А) и рельеф волокнистой поверхности образцов ПКЛ ($d_{\text{ср}} = 2,1$ мкм) (Б):

А — микроскопия в светлом поле и флуоресцентная микроскопия;

Б — сканирующая электронная микроскопия

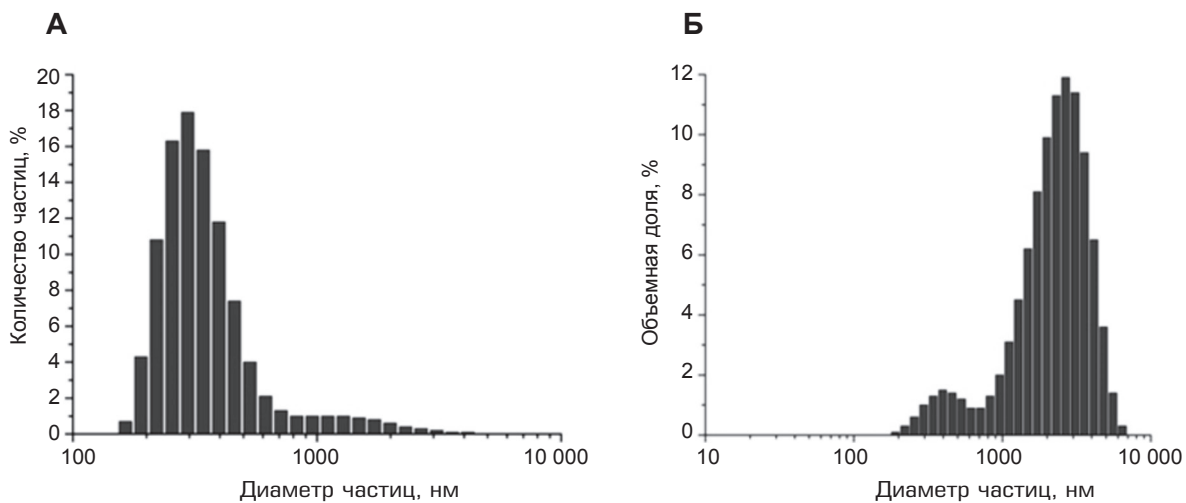


Рис. 1. Гистограммы распределения частиц по размерам (А); по объему (Б)

При изготовлении функционализированных волокон были получены образцы, содержащие 5,5 нг EGF на 1 мг материала, что позволяло достигнуть 10-кратного запаса EGF для активации клеток в культуре и продолжительного выхода фактора роста в инкубационную среду.

Для исследования поверхностных свойств модифицированных микроволоконистых каркасов были проведены измерения краевых углов смачивания (рис. 3). Образец, не содержащий в своем составе ПАВ, имел супергидрофобные свойства, причем краевой угол смачивания составил 145° . В то же время все образцы, модифицированные плурониом F-127, мгновенно поглощали каплю воды (краевой угол смачивания 0°), что может повысить их адгезию для клеточных культур.

Оценка выхода EGF in vitro. Концентрация EGF в пробах эмульсий БАС (B1 и B2) до проведения

электроформования была >4000 пг/мл, что подтверждает наличие функционального БАС на различных стадиях подготовки эмульсии.

Проведенные исследования показали постепенное изменение концентрации EGF в инкубационной среде с волокнистыми матриксами в течение 2 мес. (рис. 4). В литературе отмечается, что белок EGF стабилен, а его время полужизни составляет от 4 сут. в физиологических жидкостях [16] до 30 сут. в PBS [17] в зависимости от источника происхождения, pH среды и способа измерения.

Характер полученной кривой концентрации белка соответствует имеющимся данным научной литературы: выход на пиковый уровень за счет десорбции белка с поверхности материала, стабилизация, и постепенное уменьшение детектируемой концентрации со временем [8], вызванное деградацией центров связывания белка.

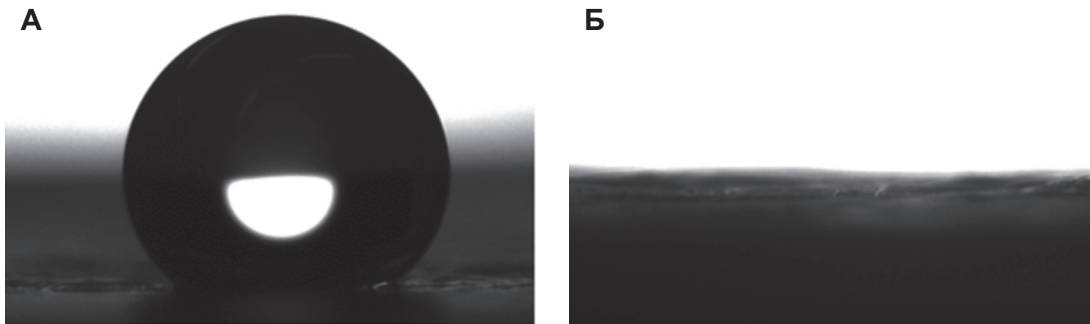


Рис. 3. Краевой угол смачивания волоконистых материалов на основе ПКЛ (А) без плуроника F-127 (145°) и (Б) с плурониом F-127 (0°). Микроскопия в отраженном свете

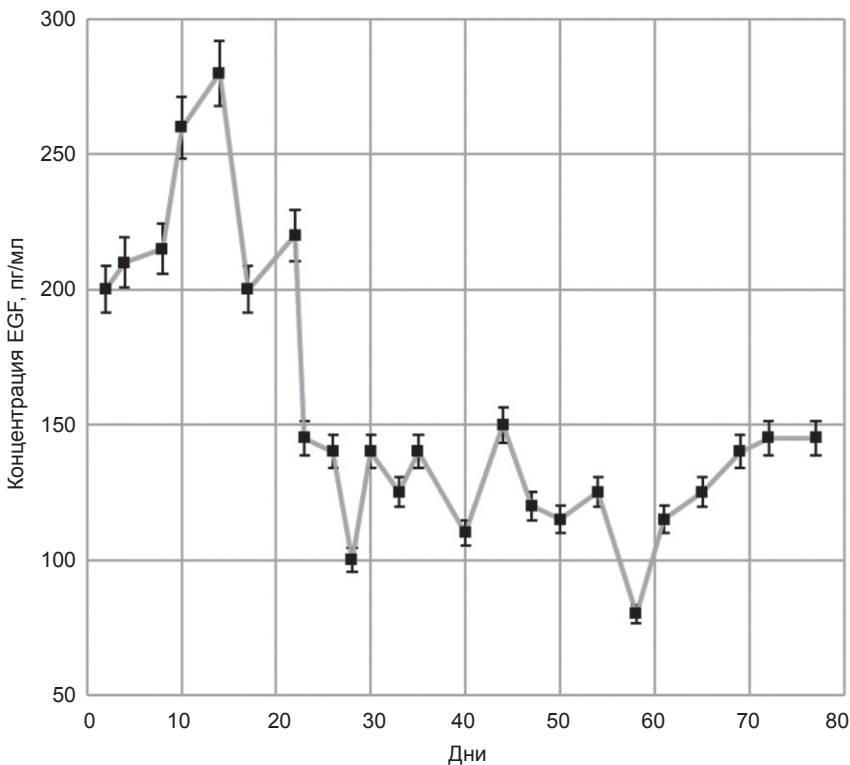


Рис. 4. Динамика выхода EGF из деградирующего ПКЛ-матрикса

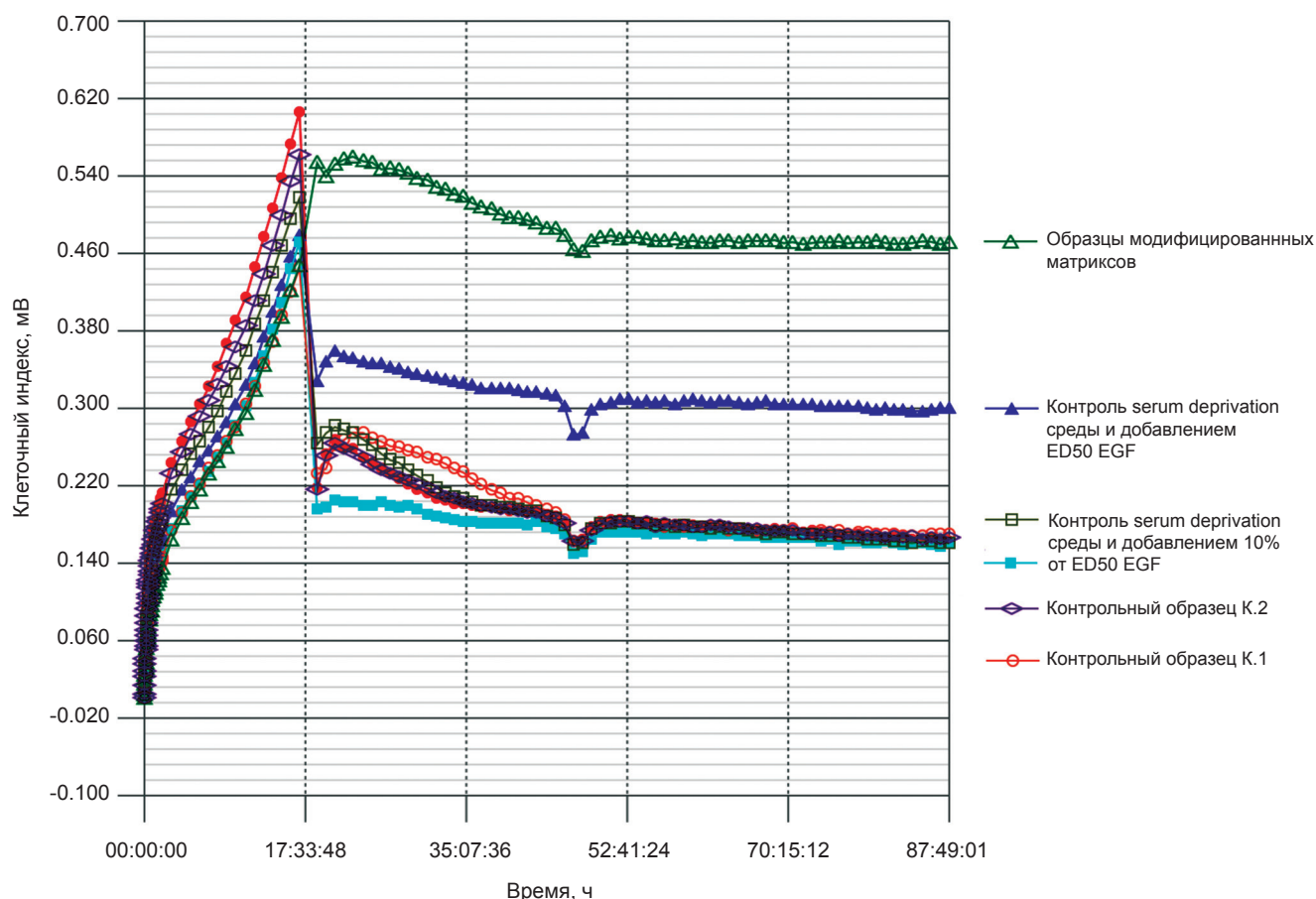


Рис. 5. Динамика изменения клеточного индекса при культивировании эпителиальных клеток MCF7 в клеточном анализаторе iCelligence

Следует отметить, что измеренные значения концентрации EGF в растворах (80–280 пг/мл) были более чем в 20–30 раз меньше теоретически рассчитанных предельных значений. Предположительно снижение концентраций EGF в среде DMEM относительно теоретически рассчитанного значения связано с медленной деградацией волокнистого материала на основе ПКЛ и, возможно, денатурацией EGF в электрическом поле или под действием гамма-излучения [18].

Биологический эффект модифицированных каркасов. Измерение клеточного индекса проводилось следующим образом: в лунки специального планшета высевали клетки MCF7 в полной питательной среде, в первую фазу 0–17 ч. происходила адгезия и пролиферация клеток, через 17 ч. производилась замена полной питательной среды на неполную (без сыворотки), и в лунки планшета добавлялись модифицированные и контрольные образцы волокнистых материалов. Изменения клеточного индекса отмечали в промежутке 17–87 ч. (рис. 5).

В лунках с модифицированными EGF образцами был выявлен максимальный биологический эффект на пролиферацию клеток линии MCF7 (средний КИ 465). В контрольных лунках стимулирования пролиферации не происходило, КИ уменьшался, что подтверждалось уменьшением площади клеток, контактирующих с поверхностью лунок (средний

КИ 160). В лунках с добавлением ED50 EGF наблюдали более низкие значения КИ по сравнению с лунками с образцами волокнистых материалов (средний КИ 300).

Таким образом, модифицированные матриксы обладают, за счет выхода БАС, эффектом стимуляции пролиферации культур эпителиальных клеток *in vitro*.

Выводы

Методом эмульсионного электроформования изготовлены каркасы на основе ПКЛ, модифицированные EGF. Проведены биологические исследования, показывающие, что модифицированные волокнистые материалы обладают эффектом стимулирования пролиферации клеточной линии MCF7. Полученные в работе результаты позволяют создавать специализированные слои тканеинженерных конструкций со свойствами пролонгированного индуцирования пролиферации эпителиальных клеток.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке соглашения о субсидии № 14.604.21.0133 Минобрнауки РФ (уникальный идентификатор RFMEFI60414X0133) с использованием оборудования ЦКП «Регенеративная медицина» (ID310020).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Aamodt J.M., Grainger D.W. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. *Biomaterials* 2016; 86: 68-82.
2. Edgar L., McNamara K., Wong T. et al. Heterogeneity of Scaffold Biomaterials in Tissue Engineering. *Materials (Basel)* 2016; 9(5): 332.
3. Насонова М.В., Шишкова Д.К., Антонова Л.В. и др. Результаты субкутанной имплантации полимерных матриц на основе поликапролактона и полигидроксibuтиролвалерата, модифицированных ростовыми факторами. *Современные технологии в медицине* 2017; 9(2): 7-18.
4. Антонова Л.В., Кривкина Е.О., Сергеева Е.А. и др. Тканеинженерный матрикс, модифицированный биологически активными молекулами для направленной регенерации тканей. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний* 2016; 5(1): 18-25.
5. Yang B., Zhou L., Peng B. et al. In vitro comparative evaluation of recombinant growth factors for tissue engineering of bladder in patients with neurogenic bladder. *J. Surg. Res.* 2014; 186(1): 63-72.
6. Sebe I., Szabó P., Kállai-Szabó B. et al. Incorporating small molecules or biologics into nanofibers for optimized drug release: A review. *Int. J. Pharm.* 2015; 494(1): 516-30.
7. Севостьянова В.В., Elgudin Y.L., Wnek G.E. и др. Свойства тканеинженерных матриц из поликапролактона, импрегнированных факторами роста VEGF и bFGF. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2012; 7(3): 62-7.
8. Simón-Yarza T., Formiga F.R., Tamayo E. et al. Vascular Endothelial Growth Factor-Delivery Systems for Cardiac Repair: An Overview. *Theranostics* 2012; 2(6): 541-52.
9. Sell S., Barnes C., Smith M. et al. Extracellular matrix regenerated: tissue engineering via electrospun biomimetic nanofibers. *Polymer Int.* 2007; 56(11): 1349-60.
10. Wang X., Ding B., Li B. Biomimetic electrospun nanofibrous structures for tissue engineering. *Materials Today* 2013; 16(6): 229-41.
11. Люндуп А.В., Демченко А.Г., Тенчури Т.Х. и др. Повышение эффективности заселения биodeградируемых матриц стромальными и эпителиальными клетками при динамическом культивировании. *Гены и клетки* 2016; 11(3): 102-7.
12. Boonstra J., Rijken P., Humbel B. et al. The epidermal growth factor. *Cell Biol. Int.* 1995; 19(5): 413-30.
13. Холмберг К., Йенсон Б., Кронберг Б. и др. Поверхностно-активные вещества и полимеры в водных растворах. М.: БИНОМ Лаборатория знаний; 2007.
14. Senga K., Mostov K.E., Mitaka T. et al. Grainyhead-like 2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through the organization of a molecular network among claudin3, claudin4, and Rab25. *Mol. Biol. Cell* 2012; 23(15): 2845-55.
15. Арутюнян И.В., Тенчури Т.Х., Кананыхина Е.Ю. и др. Нетканые материалы на основе поликапролактона для тканевой инженерии: выбор структуры и способа заселения. *Гены и клетки* 2017; 12(1): 62-71.
16. Hardwicke J., Moseley R., Stephens P. et al. Bioresponsive dextrin – rhEGF conjugates: In vitro evaluation in models relevant to its proposed use as a treatment for chronic wounds. *Molecular pharmaceuticals* 2010; 7(3): 699-707.
17. Araki F., Nakamura H., Nojima N. et al. Stability of Recombinant Human Epidermal Growth Factor in Various Solutions. *Chemical and Pharm. Bull.* 1989; 37(2): 404-6.
18. Ji W., Sun Y., Yang F. et al. Bioactive electrospun scaffolds delivering growth factors and genes for tissue engineering applications. *Pharmaceutical res.* 2011; 28(6): 1259-72.

Поступила: 20.10.2017