

А.С. Гольдерова, И.Э. Николаева, Н.Ф. Тимофеева,
М.П. Кириллина, А.Н. Егоров

ПРОЛИФЕРАЦИЯ И АДГЕЗИЯ ФИБРОБЛАСТОВ *IN VITRO* НА ПОЛИЛАКТИДНЫХ ПЛЕНКАХ

DOI 10.25789/YMJ.2021.74.20

УДК 57.085.23

Проведена оценка пролиферативной активности и адгезивной способности культивированных *in vitro* фибробластов на полилактидные пленки различной толщины в зависимости от наличия адгезивного фактора.

Добавление в питательную среду адгезивного фактора АФ, включающего в своем составе желатин, активирует пролиферацию культивируемых клеток. Наибольшее количество прикрепленных фибробластов отмечается на 3-й день с подложками 100 и 150 мкн в лунках с АФ, тогда как в подложках с толщиной 125 мкн – в 1-й и 3-й дни культивирования. По суправитально окрашенным образцам установлено, что адгезия фибробластов в зависимости от толщины полилактидной пленки показал статистически значимые различия между пленками толщиной 125 и 100 мкн, а также тенденцию к повышению между 125 и 150 мкн. Только при толщине полилактида 125 мкн количество фибробластов на поверхности пленки выше, чем в лунке, а при других толщинах количество клеток в лунке больше, чем на полилактиде.

Ключевые слова: пролиферация, адгезия, полилактид, *in vitro*, фибробласты.

Evaluation of the proliferative activity and adhesive capacity of cultured *in vitro* fibroblasts on polylactide films of various thicknesses, depending on the presence of an adhesive factor was carried out.

Adding an adhesive factor AF which contains gelatin to the nutrient medium activates the proliferation of cultured cells. The largest number of attached fibroblasts is noted on the 3rd day with substrates of 100 microns and 150 microns in wells with AF, while in substrates with the thickness of 125 microns - on the 1st and 3rd days of cultivation. Based on supravital stained samples, it was found that the fibroblast adhesion, depending on the thickness of the polylactide film, showed statistically significant differences between films with the thickness of 125 and 100 microns, as well as a tendency to increase between 125 and 150 microns. Only with the polylactide thickness of 125 microns the number of fibroblasts on the surface of the film is higher than in the well, and with other thicknesses the number of cells in the well is greater than on the polylactide.

Key words: proliferation, adhesion, polylactide, *in vitro*, fibroblasts.

Введение. Фибробласты представляют собой универсальную биологическую модель для изучения *in vitro* динамических молекулярных регуляторных процессов, лежащих в основе роста и пролиферации клеток, метаболизма и трансдукции внутри-, внеклеточных сигналов [4].

Большинство тканеинженерных заменителей живой кожи создают путем культивирования клеток кожи в лабораторных условиях и комбинирования их с подложкой. Применение эквивалентов кожи ускоряет заживление ран, уменьшает болевой синдром, воспаление, а также предотвращает образование рубцов, контрактуры или пигментных дефектов [13].

Полимолекулярная кислота, ее сополимеры и композиты входят в современный класс биodeградируемых материалов и широко применяются для

изготовления различных имплантатов [1]. Полимерные матрицы из полимолочной кислоты являются биосовместимыми изделиями, обладающими биоактивными свойствами в отношении регенераторных процессов и рекалий системы крови при подкожной имплантации лабораторным крысам [3]. Биоразлагаемые полимеры, такие как полилактид и поли(ε-капролактон), широко применяются в области биомедицины в качестве полимерных каркасов (скаффолдов) для содействия росту тканей и клеток во время регенерации костной ткани, а также для доставки лекарственных препаратов, когда лекарства смешиваются с полимерной матрицей и постепенно высвобождаются по мере разложения биополимера в организме человека [10, 11]. Однако из-за его гидрофобности взаимодействие клеток с этим материалом далеко от оптимального [9]. Биофункционализация поверхности многих биоразлагаемых полимеров является одной из стратегий, используемых для улучшения биологической активности таких материалов [6]. Высокомолекулярный полилактид представляет собой бесцветный, глянцевый, жесткий термопластичный полимер, который может быть полукристаллическим и полностью аморфным, в зависимости от чистоты основной полимерной цепи. Как молочная кислота, так и полилак-

тид проявляют оптическую активность, т.е. существуют в виде двух L- и D- стереоизомеров. Молочная кислота весьма гигроскопична, поэтому вместо нее используют лактиды [2].

Разработка каркасов для использования в тканевой инженерии требует тщательного выбора свойств, таких как механические характеристики, пористость и биоразложение. Свойства поверхности каркаса являются важным критерием, поскольку они влияют на адгезию, пролиферацию и дифференцировку клеток. Известно, что на клеточный ответ влияет топография поверхности, но механизмы, управляющие этим, остаются неясными [7].

Целью нашего исследования являлась оценка пролиферативной активности и адгезивной способности культивированных *in vitro* фибробластов на полилактидные пленки различной толщины в зависимости от наличия адгезивного фактора.

Материал и методы. Лабораторные образцы пленок из полилактида были изготовлены из L-PLA 4043D NatureWorks (USA) на базе УНТЛ «Технологии полимерных нанокомпозитов» СВФУ им. М.К. Аммосова методом экструзии при следующих параметрах: температура расплава 175-180°C; зона питания 170°C; зона уплотнения (зона пластикации) 174°C; зона нагнетания (зона дозирования) 175°C; фильера

Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова: **ГОЛЬДЕРОВА Айталиа Семеновна** – д.м.н., зав. НИЛ, Медицинский институт, foto68@mail.ru, **НИКОЛАЕВА Ирина Эдуардовна** – н.с. НИЛ, Медицинский институт, **ТИМОФЕЕВА Нина Федоровна** – аспирант, Институт естественных наук, **ЕГОРОВ Андрей Николаевич** – магистрант 2 курса ИЕН, лаборант НИЛ, Медицинский институт; **КИРИЛЛИНА Мария Петровна** – к.б.н., в.н.с. - руковод. лаб. ЯНЦ КМП, kirillina@mail.ru.

(экструзионная головка) 180°C. В результате получены пленки толщиной в 100, 125 и 150 нм с гладкой поверхностью. Данные пленки можно легко разрезать ножницами, что соответствует требованию для матриц.

Экспериментальное исследование *in vitro* было проведено в научно-исследовательской лаборатории «Клеточные технологии и регенеративная медицина» Медицинского института СВФУ им. М.К. Аммосова. Объектом исследования явились культивированные фибробласты (2-й пассаж), выделенные из рыхлой волокнистой соединительной ткани брюшины практически здорового человека при аппендэктомии с предварительно подписанным информированным согласием. Маленькие кусочки ткани в стерильных условиях были измельчены на кусочки от 1 до 2 мм и по 2-3 кусочка были помещены в чашки Петри. Культивирование клеток проводилось с использованием среды DMEM/F-12 (1:1) (1X), FBS 20%, anti-anti (1x100), пируват натрия (1x100). Клетки инкубировались при температуре 37°C в атмосфере, обогащенной 5% CO₂ в течение 5 дней.

После достижения монослойного роста в полистироловых чашках Петри (диаметр 60x15 мм) на 2-й день культивирования сделали пассаж во флаконы размером дна 75 см². Через два дня методом трипсинизации суспензию клеток (1,0-1,3x10⁶/мл) после 2-кратного промывания PBS и центрифугирования перенесли на дно по 15 мкл в 24-луночные стандартные культуральные планшеты с площадью 2 см². Для каждой из трех толщин полилактида (100, 125 и 150 мкм) были оценены по 12 лунок, из которых 6 лунок были обработаны в течение 5 мин адгезивным фактором – AF (Attachment Factor 1X,

Cascade Biologist TM), содержащий желатин в качестве фактора прикрепления. Разрезанные по диаметру лунок (1,75 см) подложки из полилактида были помещены на дно лунок.

Ежедневный подсчет клеток производился по снимкам инвертированного микроскопа (ЛОМО, Россия) с увеличением в 60 раз (окуляр x15, объектив x 4) и визуализацией 5 полей зрения на каждой лунке. Всего анализировано 180 лунок, из которых 90 лунок с адгезивным фактором (по 30 лунок для толщин 100 мкм, 125 мкм, 150 мкм) и 90 лунок (по 30 лунок для толщин 100 мкм, 125 мкм, 150 мкм) – без нее. Подсчитывались количество округлых (неприкрепившиеся) и вытянутых (прикрепившиеся) фибробластов, а также их сумма – общее число клеток (рис. 1).

Статистический анализ проведен в IBM SPSS Statistics, версии 19. Для сравнения связанных групп (в динамике) использовался критерий Вилкоксона, для сравнения независимых выборок использовались непараметрические критерии Манна-Уитни и Краскала-Уоллиса. Критическое значение уровня значимости (p) принималось равным 0,05.

Результаты и обсуждение. Сравнительный анализ общего числа кле-

ток (круглые и вытянутые клетки) в исследуемых лунках в зависимости от обработки AF выявил статистически значимые различия (p=0,000) во все дни наблюдения (с 1-го по 4-й дни). В 90 лунках с адгезивным фактором среднее значение общего количества клеток оказалось статистически значимо выше (в среднем 1,98 раза), чем без нее (рис. 2).

Наибольшее увеличение количества клеток в лунках с AF наблюдается на 3-й день культивирования фибробластов в 2,03 раза больше в лунках, чем без AF. При ежедневном подсчете под инвертированным микроскопом количества клеток в лунках в зависимости от толщины полилактидных пленок были выявлены следующие особенности. Наибольшее количество прикрепленных фибробластов (вытянутых клеток) в лунках с AF отмечается на 3-й день культивирования в подложках 100 и 150 мкм, тогда как в подложке толщиной 125 мкм количество клеток в 1-й и 3-й дни оказались одинаково высокими. Для лунок без AF наибольшее количество прикрепленных клеток отмечается при всех толщинах полилактида на 2-й день культивирования (рис. 2). Снижение пролиферативного потенциала фибробластов на 4-й день

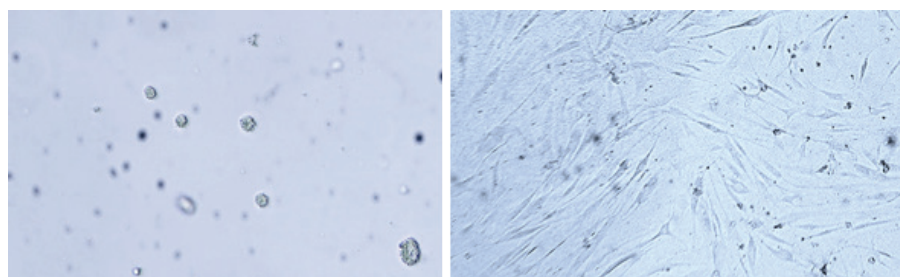


Рис. 1. Округлые не прикрепившиеся фибробласты в день посадки (слева) и веретенообразные прикрепившиеся клетки на 4-й день культивирования (справа)

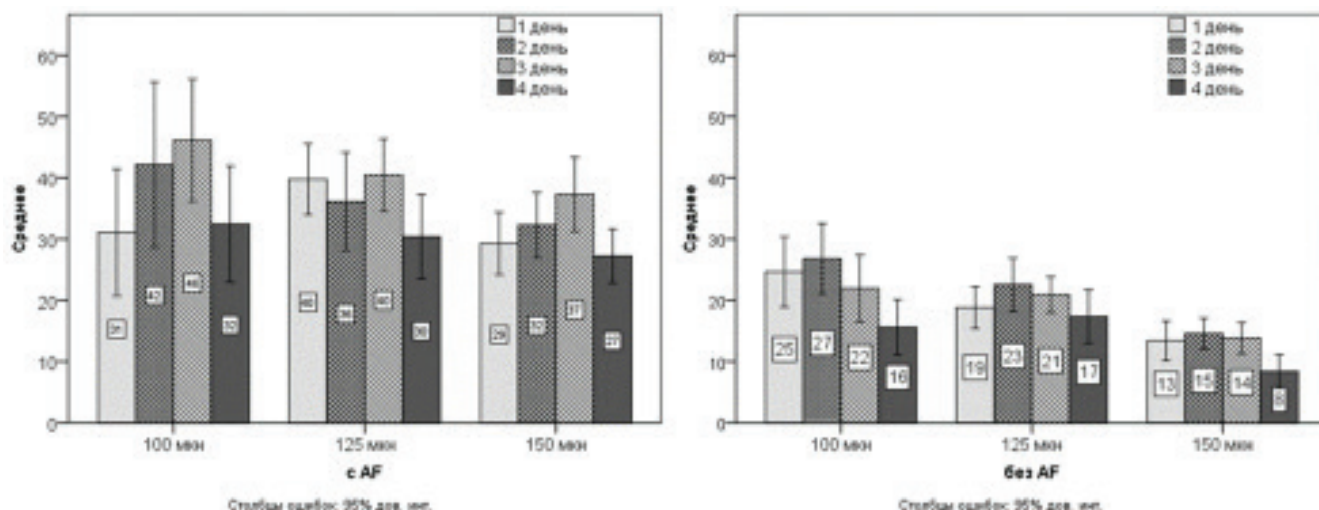
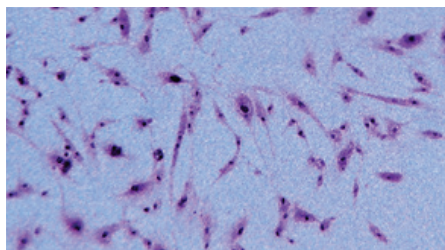


Рис. 2. Общее количество клеток в лунках с AF и без AF в динамике

культивирования, несомненно, связано с истощением энергетических ресурсов и накоплением продуктов обмена (в течение 5 дней не обновлялась питательная среда), что может привести к задержке пролиферативной активности, а также с прикреплением клеток на верхней стороне полилактидной пленки и, соответственно, с недостаточно четкой визуализацией (из-за толщины пленки) под инвертированным микроскопом.



морфностью клеток (веретенообразные, вытянутые, округлые, имеющие немногочисленные отростки), гетерохромностью ядер (гетерохромные), различным количеством и длиной отростков (рис.3).

Следует отметить, что на полилактидных пленках фибробласты прикрепляются на поверхности неравномерно, ближе к краю пленок наблюдается существенно больше клеток, нежели в центре. Авторы [7] наблюдали уве-

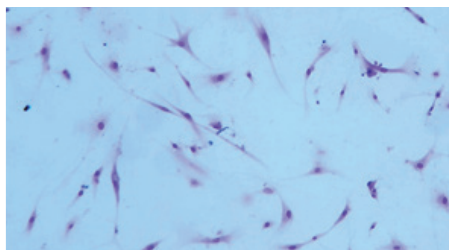


Рис. 3. Окрашенные фибробласты на 4-й день культивирования: слева – клетки на поверхности полилактида толщиной 125 мкн, справа – на дне лунки

В последний день культивирования (4-й день) из лунок неприкрепленные клетки удаляли промыванием фосфатно-солевым буфером (PBS). Прикрепленные ко дну пластика и к подложке клетки после переноса полилактидных подложек на чистые лунки окрашивали суправитально методом Романовско-Гимза (15 мин) с предварительной фиксацией по Майн-Грюнвальду (5 мин).

Результаты анализа окрашенных клеток указывают, что в полилактидных подложках с AF адгезивность выше в 2,87 раза ($p=0,000$), чем без AF, а аналогичный показатель на дне лунок – в 2,07 раза ($p=0,000$). Сравнительный анализ адгезивной способности фибробластов в зависимости от толщины полилактидной пленки показал статистически значимые различия ($p=0,022$) между пленками толщиной 125 мкн ($37,67 \pm 7,63$) и 100 мкн ($20,75 \pm 8,51$), а также тенденции ($p=0,068$) между 125 мкн ($37,67 \pm 7,63$) и 150 мкн ($25,67 \pm 10,67$). Только при толщине полилактида 125 мкн количество фибробластов на поверхности пленки выше, чем в лунке, а в остальных случаях толщина количество клеток в лунке больше, чем на полилактиде.

Известно, что адгезия клеток к поверхности биоматериала является ключевым требованием для выживания клеток, поскольку неприлипшие клетки будут апоптозировать путем аноикиса [5].

В нашем исследовании морфология фибробластов в окрашенных образцах характеризуется выраженной поли-

личение клеточного ответа с увеличением плотности краев. Возможно, это связано с предпочтительной адсорбцией белка или конформационными изменениями, происходящими на неоднородностях поверхности. Адсорбция белка или конформационные изменения преимущественно происходят на неоднородностях поверхности. Это было предложено как механизм так называемого феномена контактного выравнивания, который испытывают клетки, засеянные на параллельных гребнях, где было обнаружено, что очаговые спайки преимущественно формируются на краях и боковых стенках таких особенностей [12].

Заключение. Таким образом, по полученным результатам можно сделать следующие выводы:

- добавление в питательную среду адгезивного фактора AF, включающего в своем составе желатин, активизирует пролиферацию культивируемых клеток почти в 1,98 раза ($p=0,000$), чем без нее;

- наибольшее количество прикрепленных фибробластов отмечается на 3-й день с подложками 100 и 150 мкн в лунках с AF, тогда как в подложках с толщиной 125 мкн – в 1-й и 3-й дни культивирования;

- по суправитально окрашенным образцам установлено, что адгезия фибробластов в зависимости от толщины полилактидной пленки показал статистически значимые различия ($p=0,022$) между пленками толщиной 125 мкн ($37,67 \pm 7,63$) и 100 мкн ($20,75 \pm 8,51$), а также тенденцию в

повышению ($p=0,068$) между 125 мкн ($37,67 \pm 7,63$) и 150 мкн ($25,67 \pm 10,67$). Только при толщине полилактида 125 мкн количество фибробластов на поверхности пленки выше, чем в лунке, а при других толщинах количество клеток лунке больше, чем на полилактиде;

- на полилактидных пленках фибробласты прикрепляются на поверхности неравномерно, ближе к краю пленок наблюдается существенно больше клеток, нежели в центре.

Литература

1. Волова Т.Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии: учебное пособие [Электронный ресурс] / Т.Г. Волова, Е.И. Шишацкая, П.В. Миронов. — Красноярск, 2009. — Режим доступа : http://nashaucheba.ru/docs/18/17894/conv_1/file1.pdf
- Volova TG. Materials for medicine, cellular and tissue engineering: textbook [Electronic resource] / T.G. Volova, E.I. Shishatskaya, P.V. Mironov. - Krasnoyarsk, 2009. - Access mode: http://nashaucheba.ru/docs/18/17894/conv_1/file1.pdf
2. Глотова В.Н. Усовершенствование технологии синтеза и очистки лактида: дис. ... канд. техн. наук: 05.17.04 / В.Н. Глотова; НИ ТПУ; науч. рук. В.Т. Новиков. — Томск, 2016. — 129 с.
- Glotova V.N. Improvement of the technology of synthesis and purification of lactide: dis. ... Cand. tech. Sciences: 05.17.04 / V.N. Glotova; NI TPU; scientific. hands. V.T. Novikov - Tomsk, 2016. - 129 p.
3. Коррекция миелосупрессии у крыс с помощью имплантации матрицков, несущих мезенхимальные стволовые клетки / Н.Г. Абдулкина, К.В. Зайцев, И.А. Хлусов [и др.] // Медицина и образование. - 2014. - №6. - С. 6.
- Correction of myelosuppression in rats using the implantation of matrices carrying mesenchymal stem cells / Abdulkina N.G., Zaitsev K.V., Khlusov I.A. [et al.] // Medicine and education. - 2014. - No. 6. - P.
4. Фибробласты как объект изучения пролиферативной активности in vitro / В.И. Кузьмичева, Л.Т. Волова, Ф.Н. Гильмиярова [и др.] // Наука и инновации в медицине. - Т.5(3).2020.210-214.
- Fibroblasts as an object of studying proliferative activity in vitro / Kuzmicheva V.I., Volova L.T., Gilmiyarova F.N. et al. // Science and innovations in medicine. - T.5 (3). 2020.210-214.
5. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. Frisch SM, Francis H // J Cell Biol. 1994 Feb; 124(4):619-26.
6. Effect of structure, topography and chemistry on fibroblast adhesion and morphology. M.A. Mateos-Timoneda, O. Castano, J.A. Planell & Elisabeth Engel Journal of Materials Science: Materials in Medicine volume 25, pages 1781–1787(2014).
7. Fibroblast response is enhanced by poly (L-lactic acid) nanotopography edge density and proximity / K.R Milner, C.A Siedlecki // Int J Nanomedicine. 2007 Jun; 2(2): 201–211.
8. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. J Cell Biol. 1994; 124:619–626.
9. Huang SJ. Poly (lactic acid) and copolyesters. In: Bastioli C, editor. Handbook of biodegradable polymers. Shawbury: Rapra Technology; 2005. p. 287–301.

10. Hutmacher D.W., Schantz T., Zein I., Ng K.W., Teoh S.H., Tan K.C. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. J. Biomed. Mater. Res. 2001; 55(2): 203–216. DOI:10.1002/1097-4636(200105)55:2<203::AID-JBMB1001>3.0.CO;2-7

11. Jorge P., Domingos M., Gloria A., Ciurana J. BioCell printing: Integrated automated assembly system for tissue engineering constructs. CIRP Annals – Manufacturing Technology. 2011; 60 (1): 271–274. DOI: 10.1016/J.CIRP.2011.03.116.

12. Uttayarat P., Toworfe GK, Dietrich F, et al. Topographic guidance of endothelial cells on sil-

icone surfaces with micro- to nanogrooves: Orientation of actin filaments and focal adhesions. J Biomed Mater Res A. 2005;75A:668–80.

13. Zhong S.P., Zhang Y.Z., Lim C.T. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol 2010; 2(5): 510–525.

А.А. Иванова, А.Ф. Потапов

СМЕРТНОСТЬ И ИНВАЛИДИЗАЦИЯ НАСЕЛЕНИЯ ЯКУТИИ ОТ ВОЗДЕЙСТВИЯ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

DOI 10.25789/YMJ.2021.74.21

УДК314.48 (571.56)

Дана оценка уровню смертности населения Якутии в результате воздействия чрезмерно низкой природной температуры в 2011–2019 гг. и уровню инвалидизации в 2014–2019 гг. Выявлено, что воздействие чрезмерно низкой природной температуры (холодовая травма) занимает третье ранговое место в структуре внешних причин смертности населения Якутии после самоубийств и убийств. Уровень смертности населения в результате холодовой травмы превышает показатель смертности в результате дорожно-транспортных происшествий. При этом уровень инвалидизации по причине отморожений тяжелой степени, приведших к увечьям, относительно невысок.

Ключевые слова: Крайний Север, низкая природная температура, смертность, инвалидизация.

An assessment of the mortality rate of the population of Yakutia as a result of exposure to excessively low natural temperatures in 2011–2019 and the level of disability in 2014–2019 has been given. It was revealed that the impact of excessively low natural temperature (cold injury) ranks third in the structure of external causes of death of the population of Yakutia after suicides and homicides. The death rate of the population due to cold injury exceeds the death rate as a result of road traffic accidents (RTA). At the same time, the level of disability due to severe frostbite, which led to injuries, is relatively low.

Keywords: Far North, low natural temperature, mortality, disablement.

Введение. Потери здоровья населения (инвалидизация, преждевременная смертность) в результате воздействия низкой природной температуры являются одной из малоизученных проблем здравоохранения. Данные научных публикаций свидетельствуют об актуальности данного вопроса в мировом масштабе. Так, в США за период 2003–2013 гг. зафиксировано 13419 смертей от гипотермии, что составляет 0,3–0,5 случая на 100 тыс. населения. При этом доля лиц мужского пола составила 67%; также прослеживается возрастная особенность – для лиц старше 65 лет коэффициент составил 1,8–1,1 случая на 100 тыс. населения [5]. В Швеции смертность в результате гипотермии, отморожения и переохлаждения в холодной воде составляет 3,4, 1,5 и 0,8 случая на 100 тыс. населения соответственно [4]. Уровень летальности при тяжелой гипотермии, по данным зарубежной литературы, составляет от 12 до 80% и зависит от возраста, предрасполагающих факторов,

причин и сроков начала лечения [5].

Но особенно остра проблема в Российской Федерации, обширные территории которой расположены в северных широтах. В специализированном отделении для лечения пострадавших с термическими поражениями Амурской области больные с холодовой травмой составляют 12–19% (60–90 чел. ежегодно). Краевой показатель госпитализации больных с холодовой травмой в Читинской области составляет 1,9 случая на 10000 населения в год [1].

Среди субъектов Российской Федерации Якутия занимает первое место по занимаемой территории (3103,2 км²), а по плотности населения – 83 место из 85 регионов (0,3 чел. на 1 км²); 90% территории не имеет круглогодичного транспортного доступа. Холодное время года в регионе составляет 7 месяцев в году со средней зимней температурой 35–40 °С. В таких условиях воздействие низкой природной температуры на человеческий организм занимает особое место в структуре причин смертности от внешних причин, являясь острой медико-социальной проблемой.

Следует отметить, что медико-демографическая ситуация в Республике Саха (Якутия) в течение 1990–2014 гг. характеризовалась высоким

уровнем преждевременной смертности от предотвратимых причин, прежде всего, несчастных случаев, травм и отравлений. В структуре основных причин смертности населения внешние причины стабильно занимали второе ранговое место после болезней системы кровообращения [2]. Начиная с 2015 г., внешние причины отошли на третье место (болезни системы кровообращения – новообразования – внешние причины). Снижение показателя смертности от всех видов внешних причин в 2011–2019 гг. составило 39,8% (с 181,8 до 109,4 на 100 тыс. населения). В официальной статистике причин смертности от внешних причин принято выделять в основном транспортные причины, в том числе дорожно-транспортные происшествия, насильственную смертность (убийства, самоубийства), случайные отравления алкоголем, случайные утопления, случайные падения и т.д. Холодовая травма же учитывается в числе «прочих» причин, в связи с чем реальная картина о потерях здоровья населением в результате воздействия низкой природной температуры остается скрытой.

Целью настоящего исследования являлось изучение проблемы смертности и инвалидизации населения Республики Саха (Якутия) в результате