

DOI: 10.7868/S0041377118100107

**ВЛИЯНИЕ ФОРМЫ ЧАСТИЦ ГИДРОКСИАПАТИТА НА ОРГАНИЗАЦИЮ  
АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА И ЖИЗНеспОСОБНОСТЬ  
МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА**

© Ю. А. Нащекина,<sup>1, 3</sup>, \* А. С. Чабина,<sup>1, 3</sup> О. М. Осмоловская,<sup>2</sup>  
И. П. Добровольская,<sup>3, 4</sup> В. Е. Юдин<sup>3, 4</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,

<sup>2</sup> С.-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034,

<sup>3</sup> С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251, и

<sup>4</sup> Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, 199004;

\* электронный адрес: yuliya.shved@gmail.com

Гидроксиапатит (ГА) является главным неорганическим компонентом костной ткани. Для формирования композитных скафхолдов со свойствами, идентичными нативной ткани, необходимо знать, как частицы ГА влияют на свойства клеток. В настоящей работе изучали влияние формы частиц ГА на организацию актинового цитоскелета (методом флуоресцентной микроскопии) и количество жизнеспособных мезенхимных стромальных клеток (МСК) костного мозга кролика (МТТ-тест). Большее количество жизнеспособных клеток после 5 сут культивирования обнаружено в присутствии сферических частиц по сравнению с количеством клеток, культивируемых в присутствии иглообразных частиц. Сделано предположение о том, что такая зависимость обусловлена более высокой сорбционной способностью сферических частиц по отношению к белкам ростовой среды. Сферические частицы имеют большую удельную поверхность по сравнению с удельной поверхностью иглообразных частиц.

**Ключевые слова:** частицы гидроксиапатита, мезенхимные стромальные клетки кролика

В связи с экспоненциальным ростом числа заболеваний опорно-двигательного аппарата использование биоматериалов для замены или регенерации поврежденных органов и тканей неуклонно растет (O'Brien, 2011). Первое поколение имплантатов изготавливали из биоматериалов, которые не включаются в иммунные реакции организма. К ним прежде всего относятся металлы и небиодеградируемые полимерные материалы (Williams, 2009). Однако в последние десятилетия были достигнуты огромные успехи в понимании взаимодействия между имплантированными материалами и клетками, а также тканями организма (Добровольская и др., 2016; Нащекина и др., 2016). В результате появились новые подходы к восстановлению тканей, использующие разные материалы с широким спектром химических и физико-механических характеристик, влияющих на функциональную активность клеток, а также на процесс регенерации после имплантации в организм (Хоминец и др., 2016). Например, свойства биоматериала, такие как жесткость и топология или рельеф поверхности, могут направлять дифференцировку мезенхимных стволовых клеток в зрелые клетки разных тканеспецифических линий (Engler et al., 2006). Создавая материалы с определенным микрорельефом поверхности, можно направлять дифференцировку стволовых клеток и, таким образом, способствовать успешной интеграции биоматериала в ткани пациента.

Нано- и микрочастицы широко используются для покрытия металлических имплантатов (Goodman et al., 2013), контролируемой доставки терапевтических агентов, таких как гены, белки и вакцины, в ткани (Notaling et al., 2015) и для визуализации *in vivo* (Gu et al., 2013).

Несмотря на прогресс, достигнутый в получении частиц разных размеров, морфологии и химического состава, механизмы, лежащие в основе того, как свойства частиц, в том числе их форма и размер, влияют на клетки, изучены недостаточно. В связи с тем что нано- и микрочастицы широко используются в различных областях медицины и биологии, существует острая необходимость в более детальном понимании взаимодействия клеток с частицами разной формы. Изменение количества жизнеспособных клеток и реорганизация актинового цитоскелета являются важными и чувствительными параметрами клеток, реагирующими на внешние воздействия, в том числе и на присутствие в ростовой среде микрочастиц органической или неорганической природы.

Целью настоящего исследования было изучение влияния формы частиц гидроксиапатита (ГА) на организацию актинового цитоскелета и количество жизнеспособных мезенхимных стромальных клеток (МСК) костного мозга кролика.

## Материал и методика

**Получение наночастиц частиц ГА.** Частицы получали методом осаждения из смеси нитрата кальция  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  и фосфорной кислоты  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , контролируя pH среды и температуру. Частицы ГА отделяли центрифугированием и промывали дистиллированной водой. Форму и размеры частиц определяли методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) (JEOL JEM 107, Япония). Полученные изображения обрабатывали с помощью программы «Scandium» (Olympus Soft Imaging Solutions, Германия). Величину удельной поверхности частиц ( $S$ ) определяли методом Брунауэра—Эммета—Теллера (БЭТ), измерения проводили на газо-адсорбционном порозиметре NOVA-1200e (США).

**МСК костного мозга.** Клетки выделяли из плоских костей таза новорожденного кролика, высевали ( $1 \cdot 10^6$  кл./ $\text{cm}^2$ ) на чашки Петри и культивировали в среде  $\alpha$ MEM (Sigma, США), содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США) и смесь пенициллина и стрептомицина (Invitrogen, Великобритания), при 5 %  $\text{CO}_2$  и 37 °C. В экспериментах использовали клетки 2–6-го пассажей.

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста. Для эксперимента частицы ГА в концентрации 0.3 г/мл инкубировали в среде  $\alpha$ MEM в течение 5 сут. Среду с частицами вносили в лунки 96-луночной платы, куда потом сеяли МСК (по 3 тыс. на лунку) и добавляли 10 % эмбриональной бычьей сыворотки. В качестве контроля использовали клетки, культивируемые в ростовой среде с сывороткой без частиц ГА. Количество жизнеспособных клеток оценивали после окраски МСК раствором МТТ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma, США). МТТ растворяли в среде  $\alpha$ MEM до конечной концентрации 5 мг/мл, вносили в лунку и оставляли на 2 ч при 5 %  $\text{CO}_2$  и 37 °C. Живые клетки восстанавливали желтый МТТ до темно-фиолетовых гранул формазана. Гранулы формазана растворяли в диметилсульфоксиде (Sigma, США) и измеряли оптическую плотность раствора на иммуноферментном анализаторе Флюорофот (ПРОБАНАУЧПРИБОР, Россия) при длине волны 570 нм.

**Окраска актинового цитоскелета МСК.** Частицы ГА в концентрации 0.3 г/мл предварительно инкубировали в среде  $\alpha$ MEM в течение 5 сут. Затем ростовую среду с частицами ГА вносили в чашку Петри с по-

кровным стеклом, на которое сеяли МСК (10 тыс.) и добавляли 10 % эмбриональной бычьей сыворотки. В качестве контроля использовали клетки, культивируемые в ростовой среде с сывороткой без частиц ГА. По истечении 1 сут культивирования неприкрепившиеся клетки удаляли, прикрепившиеся МСК промывали раствором PBS (Биолот, Россия) и фиксировали в 4%-ном растворе формалина (Sigma, США), затем добавляли раствор 0.1%-ного Тритона X-100 (Sigma, США) и раствор родамина-фаллоидина (10 ед./мл) (Invitrogen, Великобритания). После каждой обработки препараты трижды промывали PBS. Ядра окрашивали DAPI (Invitrogen, Великобритания). Актиновые филаменты визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа (LSM 5 Pascal, Германия).

Статистическую обработку результатов, полученных в 5 экспериментах, обрабатывали в программе Microsoft Excel 2007, определяя среднее значение и стандартную ошибку среднего. Для сравнения результатов использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при  $P < 0.05$ .

## Результаты и обсуждение

Перед исследованием были синтезированы частицы ГА двух видов. Структура и свойства наночастиц ГА подробно описаны ранее (Добровольская и др., 2018). Форму и размер частиц оценивали с помощью ПЭМ (рис. 1). В настоящей работе использовали частицы двух видов — сферические диаметром около 8 нм (ГА1) (рис. 1, *a*) и иглообразные длиной 45–65 нм и диаметром 7–9 нм (ГА2) (рис. 2, *б*). Методом БЭТ измеряли удельную поверхность ( $S$ ), которая для сферических частиц ГА1 составила 180 м/г, а для иглообразных частиц ГА2 — 115 м/г.

Синтезированные частицы предварительно инкубировали в ростовой среде  $\alpha$ MEM без сыворотки в течение 5 сут. В полученную суспензию частиц ГА со средой добавляли МСК и сыворотку до конечной концентрации последней 10 %. В качестве контроля использовали клетки, культивируемые в стандартной ростовой среде без добавления частиц ГА. Организацию актинового цитоскелета МСК, культивируемых в присутствии разных частиц ГА, оценивали методом флуоресцентной микроскопии через 1 сут после посева. Как видно на рис. 2, *б*, *в*, в присутствии как сферических частиц ГА1, так и иглообразных

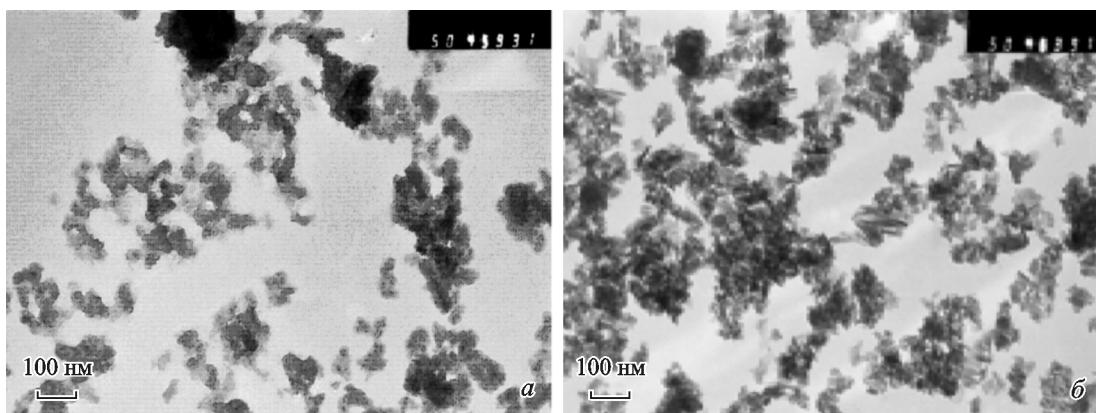


Рис. 1. Частицы гидроксиапатита (ГА) сферической (ГА1, *а*) и иглообразной (ГА2, *б*) форм. Просвечивающая электронная микроскопия.

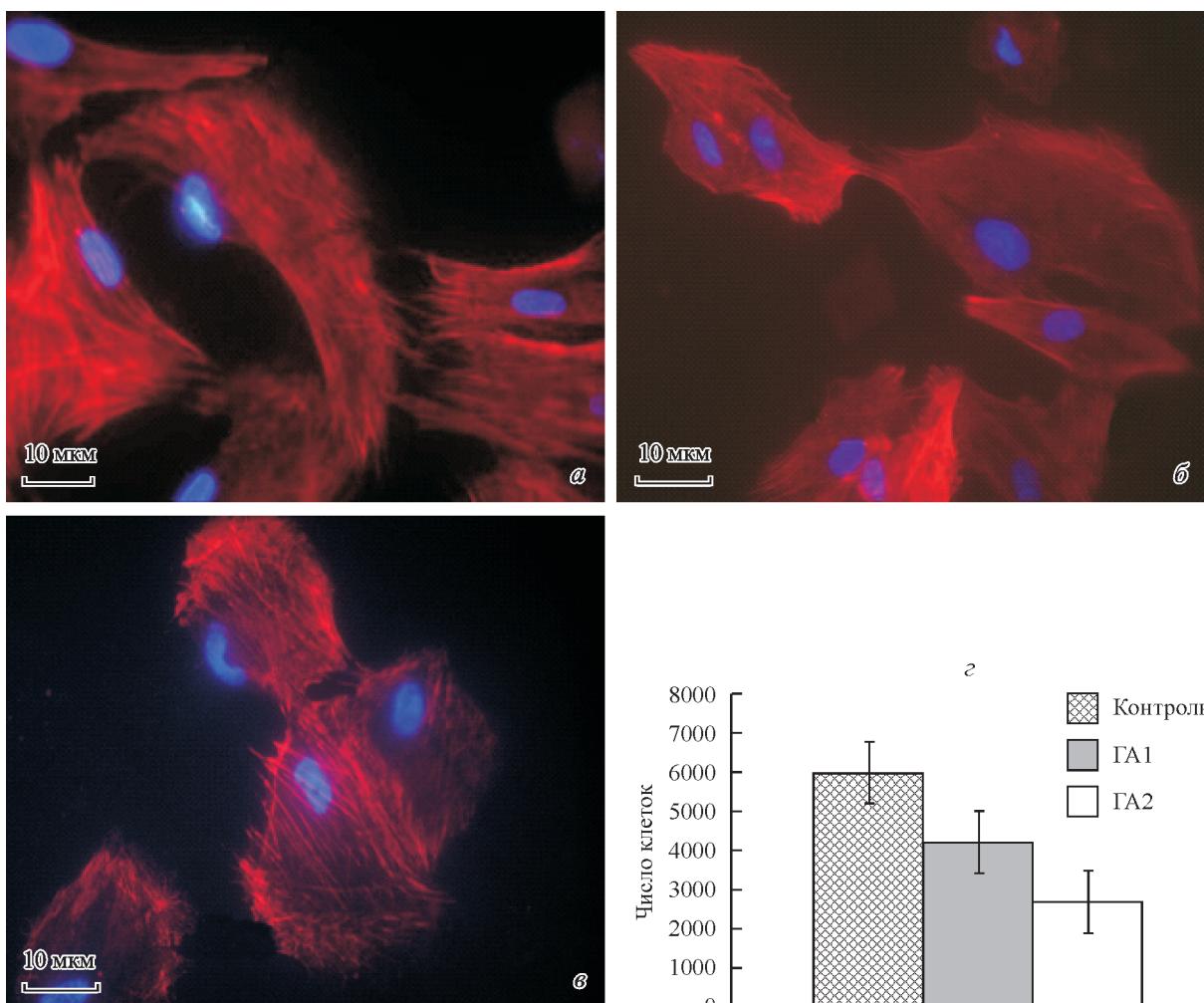


Рис. 2. Организация актинового цитоскелета МСК в контроле (а) и через 1 сут культивирования в присутствии сферических частиц ГА1 (б) и иглообразных частиц ГА2 (в), а также жизнеспособность клеток через 5 сут культивирования в присутствии ГА (г).

г — результаты МТТ-теста; вертикальные отрезки — ошибки среднего.

ГА2 клетки хорошо распластаны и не отличаются от контроля (рис. 2, а). Во всех случаях в клетках видны длинные нити полимеризованного актина.

Для оценки количества жизнеспособных клеток при культивировании в присутствии частиц ГА использовали МТТ-тест. Клетки культивировали в ростовой среде в присутствии частиц ГА в течение 5 сут. Как видно из диаграммы (рис. 2, г), частицы ГА влияют на жизнеспособность клеток, причем частицы ГА2 в большей степени снижают количество жизнеспособных клеток по сравнению с частицами ГА1. Причиной разного влияния частиц ГА на жизнеспособность МСК могут быть как форма частиц, так и разница в значениях их удельной поверхности. Чем больше удельная поверхность частиц, тем выше способность поверхности частиц к адсорбции белков из ростовой среды. Сорбируясь на поверхности частиц, белки делают ее благоприятной для роста клеток. Наши предположения согласуются с данными других авторов. Показано, например, что не только размер (Higashi et al., 1996), но и шероховатость и степень развитости поверхности влияют на пролиферацию клеток (Li et al., 2012). Чем более шероховатая поверхность, тем больше у нее удельная поверхность и сорбционная способность, тем больше количество жизнеспособных клеток.

Таким образом, присутствие частиц ГА любой формы не влияет на организацию актинового цитоскелета МСК после культивирования в течение 1 сут. Количество жизнеспособных клеток больше в присутствии частиц сферической формы, чем в присутствии частиц иглообразной формы. Возможно, причиной этих различий является разная удельная поверхность частиц, а следовательно, и способность частиц ГА сорбировать белки из ростовой среды в процессе культивирования клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 14-33-00003).

#### Список литературы

- Добровольская И. П., Царев Н. С., Осмоловская О. М., Касаткин И. А., Иванькова Е. М., Попова Е. Н., Панкова Г. А., Юдин В. Е. 2018. Влияние термической обработки на структуру и свойства гидроксиапатита. Журнал прикладной химии. 91 (3) : 328—334. (Dobrovolskaya I. P., Tsarev N. S., Osmolovskaya O. M., Kasatkin I. A., Ivan'kova E. M., Popova E. N., Pankova G. A., Yudin V. E. 2018. Effect of thermal treatment on the structure and properties of hydroxyapatite. Russ. J. Appl. Chem. 91 (3) : 368—374.)

- Добровольская И. П., Юдин В. Е., Попрядухин П. В., Иванькова Е. М. 2016. Полимерные матрицы для тканевой инженерии. СПб.: Издательско-полиграфическая ассоциация университетов России. 223 с. (*Dobrovol'skaya I. P., Yudin V. E., Popryaduhin P. V., Ivankova E. M. 2016. Polymer scaffolds for tissue engineering*. St. Petersburg: Publishing and Printing Association of Universities of Russia. 223 p.)
- Нащекина Ю. А., Никонов П. О., Юдинцева Н. М., Нащекин А. В., Лихачев А. И., Москалюк О. А., Юдин В. Е., Блинова М. И. 2016. Взаимодействие мезенхимных клеток костного мозга с нативными волокнами фиброна шелка. Цитология. 58 (11) : 843—849. (*Nashchekina Yu. A., Nikonorov P. O., Yudintseva N. M., Nashchekin A. V., Likhachev A. I., Moskalyuk O. A., Yudin V. E., Blinova M. I. 2016. Bone marrow mesenchymal cells interaction with native silk fibroin*. *Tsitolgiya*. 58 (11) : 843—849.)
- Хоминец В. В., Михайлов С. В., Шакун Д. А., Деев Р. В., Чупкина Н. В., Комаров А. В., Жумагазиев С. Е., Нащекина Ю. А. 2016. Результаты ортотопической имплантации тканеинженерного эквивалента кости на основе полилактидного матрикса и мультипотентных мезенхимальных стromальных клеток. Вестн. Рос. военно-мед. акад. 3 (55) : 105—112. (*Khominec V. V., Mikhailov S. V., Shakun D. A., Deev R. V., Tsupkina N. V., Komarov A. V., Shumagaziev S. E., Naschekina Ya. A. 2016. Results of orthotopic implantation of tissue-engineered bone equivalent on basis of polylactides matrix and multipotent mesen-*
- chymal stromal cells
- Vestnik Rossiyskoy Voenno-Medicinskoy Akademii. 3 (55) : 105—112.)
- O'Brien F. J. 2011. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. Materials Today. 14 : 88—95.
- Engler A. J., Sen S., Sweeney H. L., Discher D. E. 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. Cell. 126 : 677—689.
- Goodman S. B., Yao Z., Keeney M., Yang F. 2013. The future of biologic coatings for orthopaedic implants. Biomaterials. 34 : 3174—3183.
- Gu L., Hall D. J., Qin Z., Anglin E., Joo J., Mooney D. J., Howell S. B., Sailor M. J. 2013. In vivo time-gated fluorescence imaging with biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles. Nature Commun. 4 : 2326.
- Higashi T., Okamoto H. 1996. Influence of particle size of hydroxyapatite as a capping agent on cell proliferation of cultured fibroblasts. J. Endod. 22 : 236—239.
- Hotaling N. A., Tang L., Irvine D. J., Babensee J. E. 2015. Biomaterial strategies for immunomodulation. Ann. Rev. Biomed. Eng. 17 : 317—349.
- Li L., Crosby K., Sawicki M., Shaw L. L., Wang Y. 2012. Effects of surface roughness of hydroxyapatite on cell attachment and Proliferation. J. Biotechnol. Biomater. 2 (6) : 150.
- Williams D. F. 2009. On the nature of biomaterials. Biomaterials. 30 : 5897—5909.

Поступила 16 VII 2018

## INFLUENCE OF THE HYDROXYAPATITE PARTICLES FORM ON THE ACTINE CYTOSKELETON ORGANIZATION AND VIABILITY OF BONE MARROW MESENCHYMAL CELLS

Yu. A. Nashchekina,<sup>1, 3</sup>, \* A. S. Chabina,<sup>1, 3</sup> O. M. Osmolovskaya,<sup>2</sup>  
I. P. Dobrovolskaya,<sup>3, 4</sup> V. E. Yudin<sup>3, 4</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064,

<sup>2</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034,

<sup>3</sup> Peter the Great St. Petersburg State Polytechnic University, St. Petersburg, 195251, and

<sup>4</sup> Institute of Macromolecular Compounds RAS, St. Petersburg, 199004;

\* e-mail: yuliya.shved@gmail.com

Hydroxyapatite (HA) is the main inorganic component of bone tissue. To form composite scaffolds with properties identical to native tissue, it is necessary to know how the shape of the HA particles influence on the cell properties. In this study we investigated the effect of the HA particles shape on the actin cytoskeleton organization (fluorescence microscopy) and the viability of bone marrow mesenchymal stromal cells (MTT test). After 5 days of cultivation in the presence of spherical particles, a greater number of viable cells were observed than the number of viable cells when cultured in the presence of needle-like particles. It is suggested that such dependence is due to a higher sorption capacity of proteins by the spherical particles surface having a large specific surface in comparison with the specific surface of needle-shaped particles.

**К e y w o r d s:** hydroxyapatite particles, bone marrow mesenchymal stromal cells