

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2022-21-3-72-81>

Эффективность стерилизации пучком ускоренных электронов гидрогеля для 3D-культивирования мезенхимальных мультипотентных клеток

П.А. Быстров¹, К.М. Новрузов², М.П. Потапнев³, С.М. Космачева³, Н.Ю. Анисимова^{2, 4},
М.В. Киселевский^{2, 4}, П.С. Мышелова⁴, И.Н. Булыгина⁴, Ф.С. Сенатов⁴

¹ФГБУН Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН; Россия, 119071 Москва, Ленинский пр-т, 31, корп. 4;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

³ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»; Беларусь, 220053 Минск, Долгиновский тракт, 160;

⁴ФГАУ ВО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»; Россия, 119049 Москва, Ленинский пр-т, 4

Контакты: Керям Мурсали оглы Новрузов nkeryam@gmail.com

Введение. Гидрогели перспективны для использования в тканевой инженерии для восстановления и регенерации различных тканей, поскольку способны выполнять функции объемных скаффолдов, обеспечивая формирование 3D клеточных структур. Заселение таких скаффолдов аутологичными или гетерогенными мезенхимальными мультипотентными стромальными клетками *in vitro* дает возможность локализовать эти клетки в области тканей-мишеней после имплантации пациенту. Одной из сложных задач является выбор способа и режима стерилизации гидрогеля, не изменяющих его свойства.

Цель исследования – изучение эффективности стерилизации гидрогеля пучком ускоренных электронов в различных режимах, изменения структуры и биосовместимости скаффолда для оценки перспектив его использования в медицинских целях, в том числе в качестве платформы для мезенхимальных стромальных клеток.

Материалы и методы. В работе использовали гидрогель на основе полисахаридов (4 % растворы альгината натрия и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы), сшитых хлоридом кальция, который был разработан, получен и предоставлен для наших исследований коллективом Научно-образовательного центра биомедицинской инженерии ФГАУ ВО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС». Образцы гидрогеля, нагруженные *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*, были подвергнуты обработке пучком электронов в диапазоне 5–100 кГр. После электронно-лучевой обработки гидрогеля оценивали наличие живых микроорганизмов и изменение его структуры методом инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье, а также фенотип мезенхимальных мультипотентных клеток и формирование ими 3D-структур.

Результаты. Было установлено, что режим обработки гидрогелей пучком электронов в режиме 25 кГр обеспечивает гибель микроорганизмов, не разрушая структуру гидрогеля, и не ингибирует способность формировать капиллярноподобные структуры мезенхимальными мультипотентными клетками.

Заключение. Обработка пучком ускоренных электронов в режиме 25 кГр может быть использована с целью стерилизации гидрогелей для получения объемных скаффолдов клеточно-инженерных имплантатов.

Ключевые слова: гидрогель, мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки, стерилизация, пучок ускоренных электронов, скаффолд

Для цитирования: Быстров П.А., Новрузов К.М., Потапнев М.П. и др. Эффективность стерилизации пучком ускоренных электронов гидрогеля для 3D-культивирования мезенхимальных мультипотентных клеток. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(3):72–81. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-72-81

Efficiency of accelerated electron beam sterilization of a hydrogel for 3D cultivation of mesenchymal multipotent cells

Peter A. Bystrov¹, Keryam M. Novruzov², Mikhail P. Potapnev³, Svetlana M. Kosmacheva³, Natalia Yu. Anisimova^{2,4}, Mikhail V. Kiselevskiy^{2,4}, Polina S. Mysheleva⁴, Inna N. Bulygina⁴, Fedor S. Senatov⁴

¹A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences; Bld. 4, 31 Leninsky Ave., Moscow 119071, Russia;

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

³Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies; 160 Dawhinawskiy Trakt, Minsk 220053, Belarus;

⁴National University of Science and Technology "MISIS"; 4 Leninsky Ave., Moscow 119049, Russia

Contacts: Keryam Mursali ogy Novruzov nkeryam@gmail.com

Background. Hydrogels are promising for use in tissue engineering for the restoration and regeneration of various tissues, since they are able to perform the functions of bulk scaffolds, providing the formation of 3D cell structures. Population of such scaffolds with autologous or heterogeneous mesenchymal multipotent stromal cells *in vitro* makes it possible to localize these cells in the area of target tissues after implantation in a patient. One of the difficult tasks is the choice of the method and mode of sterilization of the hydrogel, which does not change its properties.

Aim. Study of the effectiveness of hydrogel sterilization by an accelerated electron beam in various modes, changes in the structure and biocompatibility of the scaffold, to assess the prospects for its use for medical purposes, including as a platform for mesenchymal stromal cells.

Materials and methods. We used a hydrogel based on 4 % solutions of sodium alginate and sodium salt of carboxymethyl cellulose, cross-linked with calcium chloride, which was developed, obtained and provided for our research by the team of the Research and Educational Center for Biomedical Engineering of the National University of Science and Technology "MISIS". Hydrogel samples loaded with *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae* were subjected to electron beam treatment in the range of 5–100 kGy. After electron beam treatment of hydrogel, the presence of living microorganisms and its structure were evaluated by IR-Fourier spectroscopy, as well as the phenotype and formation of 3D structures by mesenchymal multipotent cells.

Results. It was found that the treatment of hydrogels with an electron beam at a mode of 25 kGy ensures the death of microorganisms, but does not destroy the structure of the hydrogel and does not inhibit the ability to form capillary-like structures by mesenchymal multipotent cells.

Conclusion. Treatment with an accelerated electron beam at a 25 kGy can be used to sterilize hydrogels to obtain bulk scaffolds for cell engineering implants.

Keywords: hydrogel, mesenchymal multipotent stromal cells, sterilization, accelerated electron beam, scaffold

For citation: Bystrov P.A., Novruzov K.M., Potapnev M.P. et al. Efficiency of accelerated electron beam sterilization of a hydrogel for 3D cultivation of mesenchymal multipotent cells. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(3):72–81. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-72-81

Введение

Гидрогель (ГГ) является разновидностью полимерного полутвердого материала, который обладает хорошей биосовместимостью и способен впитывать большое количество воды. Из-за физического сходства ГГ с тканью человека они используются в качестве субстратов для клеточных культур и раневых повязок. С появлением и развитием тканевой инженерии ГГ стали использовать для восстановления и регенерации различных тканей и органов [1]. Мезенхимальные мультипотентные (стволовые) стромальные клетки (ММСК) применяют для регенерации тканей, лечения и профилактики цитокинового шторма при COVID-19 и реакции «трансплантат против хозяина», а также для стимуляции гемопоэза при аллогенной трансплантации стволовых гемопоэтических клеток [2–5]. В отличие от рутинного

культивирования использование ГГ позволяет создавать 3D-скаффолды, заселенные ММСК, что дает возможность локализовать эти клетки в области тканей-мишеней [6]. Более того, ГГ, дополненный ростовыми факторами, может значительно улучшить пролиферацию клеток в системе 3D-культивирования и обеспечить управляемую миграцию ММСК в целевую область [7]. 3D-культивирование ММСК способствует структурообразованию клеточной культуры и улучшает локальную перфузию тканей, что подтверждает перспективность использования ГГ в качестве скаффолда для локальной доставки ММСК и стимуляции ангиогенеза [8].

В настоящее время используется большое количество синтетических и природных полимеров, а также конструкций из них в качестве скаффолдов для клеточных культур. К перспективным направлениям

относится создание клеточных сфероидов ММСК, инкапсулированных в ГГ для локального введения, а также внесение в ГГ различных факторов, стимулирующих пролиферацию и хемотаксис стволовых клеток. В частности, одним из перспективных направлений является насыщение синтетических ГГ плазмой, обогащенной лизатом тромбоцитов (platelet rich plasma, PRP) – PRP-продуктом [9]. PRP-продукты содержат биоактивные компоненты, способствующие регенерации тканей [10]. Недавние работы описывают подходы к использованию PRP и гелей на ее основе для культивирования ММСК [11]. Полимерные системы доставки предназначены также для улучшения низкой растворимости некоторых биологически активных соединений, продления времени их циркуляции в крови и улучшения их биораспределения [12, 13]. Однако, несмотря на перспективы использования ГГ в медицине, для их широкого клинического применения еще предстоит решить ряд проблем.

Помимо эффективности и биосовместимости важным требованием к любому биоматериалу, предназначенному для внесения в организм, является микробиологическая безопасность, или стерильность. Эффективная стерилизация материалов имеет решающее значение для сведения к минимуму инфекционных осложнений, связанных с имплантируемыми медицинскими устройствами. Методы стерилизации имеют особо важное значение для комбинированных медицинских устройств, таких как системы доставки клеточных культур и лекарств, в которых необходимо уделять внимание целостности имплантата и таким факторам, как деградация/стабильность лекарства и жизнеспособность клеток, внесенных в него. Рутинные методы стерилизации, применяемые в медицинской практике, связанные с термическим или химическим воздействием, могут существенно изменить структуру и свойства ГГ, поэтому для их стерилизации чаще всего используют электронно-лучевые установки. R. Galante и соавт. [14] исследовали эффективность обработки ГГ гамма- и бета-излучением в диапазоне доз 2–100 кГр, при этом стерилизующий эффект отмечался при достижении дозы не ниже 25 кГр. Однако электронно-лучевая обработка может изменять свойства ГГ, такие как масса, форма, растворимость и структура, ухудшая его биологические свойства [15]. Несмотря на важность этой проблемы, из большого числа работ, посвященных изучению ГГ и перспектив их клинического использования, лишь менее 1 % публикаций освещают вопросы стерилизации этих полимерных материалов. Поэтому **целью исследования** стало изучение эффективности стерилизации ГГ пучком ускоренных электронов и влияния различных режимов облучения на его массу, структуру и биосовместимость для оценки перспектив

его использования в медицинских целях, в том числе в качестве платформы для ММСК.

Материалы и методы

Характеристика образцов. В работе использовали 50 образцов ГГ сферической формы диаметром 7 ± 2 мм на основе 4 % растворов альгината натрия и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы, сшитых хлоридом кальция, которые были предоставлены для наших исследований коллективом Научно-образовательного центра биомедицинской инженерии ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС». В литературе описаны получение, структура и свойства ГГ медицинского назначения на основе альгината натрия и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы [16, 17].

Определение активности живых микроорганизмов и их способности к делению после облучения пучком ускоренных электронов. В качестве модельных микроорганизмов использовали 20–48-часовые культуры грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* (*E. coli*), грамположительных неспорообразующих бактерий *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) и дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (коллекция ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России). Инокуляты модельных культур микроорганизмов ресуспендировали в жидкой питательной среде: *S. cerevisiae* в бульоне Сабуро (концентрация $3,6 \times 10^6$ клеток/мл), *E. coli* и *L. acidophilus* в триптозносоевом бульоне (все среды: Pronadisa, Испания). С целью подготовки для исследования образцы ГГ промывали в стерильном растворе Хенкса («ПанЭко», Россия), а затем на каждый образец наносили по 50 мкл суспензии микроорганизмов (СМ). Для оценки исходного уровня жизнеспособности микроорганизмов 50 мкл СМ вносили в 500 мкл мясо-пептонного бульона (МПБ) (Pronadisa, Испания).

Подготовленные образцы ГГ с нанесенными микроорганизмами (СМ + ГГ) помещали по одному в пластиковые центрифужные пробирки объемом 2 мл. В отдельных сериях в пробирки помещали образцы промытого ГГ без микроорганизмов (только ГГ) или только СМ в объеме 50 мкл. Затем во все пробирки вносили по 500 мкл МПБ. Не позднее чем через 3 ч после приготовления дублированные образцы ГГ, СМ, СМ + ГГ были подвергнуты облучению в компактной радиационно-технологической установке при различных режимах обработки (5, 10, 25, 50, 100 кГр), как было описано нами ранее [18]. После обработки образцов для оценки бактерицидного эффекта тестировали наличие живых микроорганизмов в каждом образце, а также определяли их способность к росту (делению клеток) в тестах на бактериостатическую активность. В качестве контроля использовали образцы,

не подвергавшиеся воздействию электронного пучка (режим 0 кГр).

Для оценки воздействия изучаемых физических факторов на жизнеспособность дрожжей использовали клеточный анализатор Luna (Logos Biosystems, Корея). Для определения жизнеспособности бактерий использовали метод культивирования в присутствии красителя AlamarBlue (Invitrogen, США) с последующей оценкой флуоресценции при 530 Ex/590 Em в триплетах на планшетном ридере Spark (Tecan, Швейцария). Результат воздействия обработки пучком электронов на жизнеспособность дрожжей рассчитывали как процентное отношение величин флуоресценции в пробах ГГ, СМ, СМ + ГГ к исходному уровню.

Для оценки воздействия изучаемых физических факторов на способность микроорганизмов к делению тестируемые образцы после обработки пучком электронов помещали в 500 мкл МПБ и инкубировали в течение 1 сут при 20 °C (*S. cerevisiae*) или 37 °C (*E. coli* и *L. acidophilus*) в атмосфере 5 % CO₂. Для учета результата проводили оценку абсорбции в триплетах при 540 нм против 690 нм на приборе Spark (Tecan, Швейцария). Отдельно учитывали абсорбцию в лунках, содержащих только 500 мкл МПБ. Результат рассчитывали по формуле:

$$\text{Рост культуры, \%} = \frac{A_o - A_{\text{МПБ}}}{A_k - A_{\text{МПБ}}} \times 100,$$

где A_o — абсорбция в образце, A_k — абсорбция в контроле, $A_{\text{МПБ}}$ — абсорбция в МПБ.

Инфракрасная (ИК) спектроскопия с преобразованием Фурье (ИК-Фурье-спектроскопия). Для изучения влияния различных режимов стерилизации на изменение химических связей ГГ был выполнен анализ образцов методом нарушенного полного внутреннего отражения в ИК-области. Исследование проводили на ИК-спектрометре Nicolet 380 (Thermo Scientific, США) в диапазоне от 4000 до 750 см⁻¹ при комнатной температуре. Данный метод позволяет судить о деградации ГГ с помощью мониторинга изменений по результирующим пикам, которые соответствуют определенным функциональным группам.

Биосовместимость. Для оценки биосовместимости изучали уровень индуцированного гемолиза и цитотоксичности в соответствии с методиками, изложенными ранее [15]. С этой целью образцы ГГ по одному инкубировали с суспензией эритроцитов и лейкоцитов крови здорового донора, предварительно оценив базовый уровень жизнеспособности и гемолиза в клеточных суспензиях. Длительность инкубации составила 2 и 24 ч. В качестве контроля использовали клетки, которые инкубировали при отсутствии ГГ в анало-

гичных условиях. Результат исследований рассчитывали как отношение измеренной величины гемолиза или цитотоксичности в конце периода инкубации к исходным уровням указанных параметров. ГГ рассматривали как биосовместимый в случае отсутствия достоверных отличий клеточной реактивности в лунках с ГГ и в контроле.

Изучение 3D-культивирования ММСК в ГГ. Генерацию культуры ММСК из костного мозга здоровых собак породы бигль для изучения 3D-культивирования на модели объемного скаффолда проводили в соответствии с методикой, изложенной ранее [19]. С этой целью охлажденный до +4 °C матригель (Matrigel Basement Membrane Matrix, Corning, США) смешивали с полной питательной средой в соотношении 1:1 на льду и разливали по 1 мл в лунки охлажденного 24-луночного планшета (Nunc, ThermoFisher Scientific, США). ММСК были деадгезированы трипсином, затем отмыты RPMI-1640, ресуспендированы в полной питательной среде и внесены в лунки с матригелем в концентрации 3,2–4,4 × 10⁴ клеток/мл. Инкубацию клеток осуществляли при 37 °C и 5 % CO₂ в течение 12 сут. Для оценки особенностей структурообразования ММСК были изучены морфологические особенности роста культуры по результатам световой микроскопии после окрашивания клеток гематоксилином и эозином («ПанЭко», Россия). Для определения концентрации делящихся клеток оценивали уровень ММСК, маркированных Ki-67, с помощью набора Muse® Ki67 Proliferation Kit (EMD Millipore Corp., Германия) и клеточного анализатора Muse (EMD Millipore Corp., Германия). Для оценки фенотипа использовали антитела против CD11c, CD11b, CD62 (BD Bioscience, США). Уровень экспрессии клетками данных молекул определяли на проточном цитометре ACEA Novocyte (Bioscience Inc., США).

Статистический анализ данных. Для описания результатов измерений в отдельных группах рассчитывали среднее значение и стандартную девиацию. Для проведения сравнительного анализа воздействия различных режимов физических факторов относительно контроля использовали тесты χ^2 . Отличия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Определение активности живых микроорганизмов после облучения пучком ускоренных электронов. На 1-м этапе работы были оценены антибактериальная и антифунгицидная активность облучения в диапазоне воздействующих доз от 5 до 100 кГр (рис. 1).

Как видно из рис. 1, а, наблюдалось достоверное снижение концентрации живых дрожжевых клеток в СМ под воздействием обработки пучком ускоренных электронов при всех режимах (от 5 до 100 кГр) в сравнении с контролем. Максимальный эффект (44 %) в

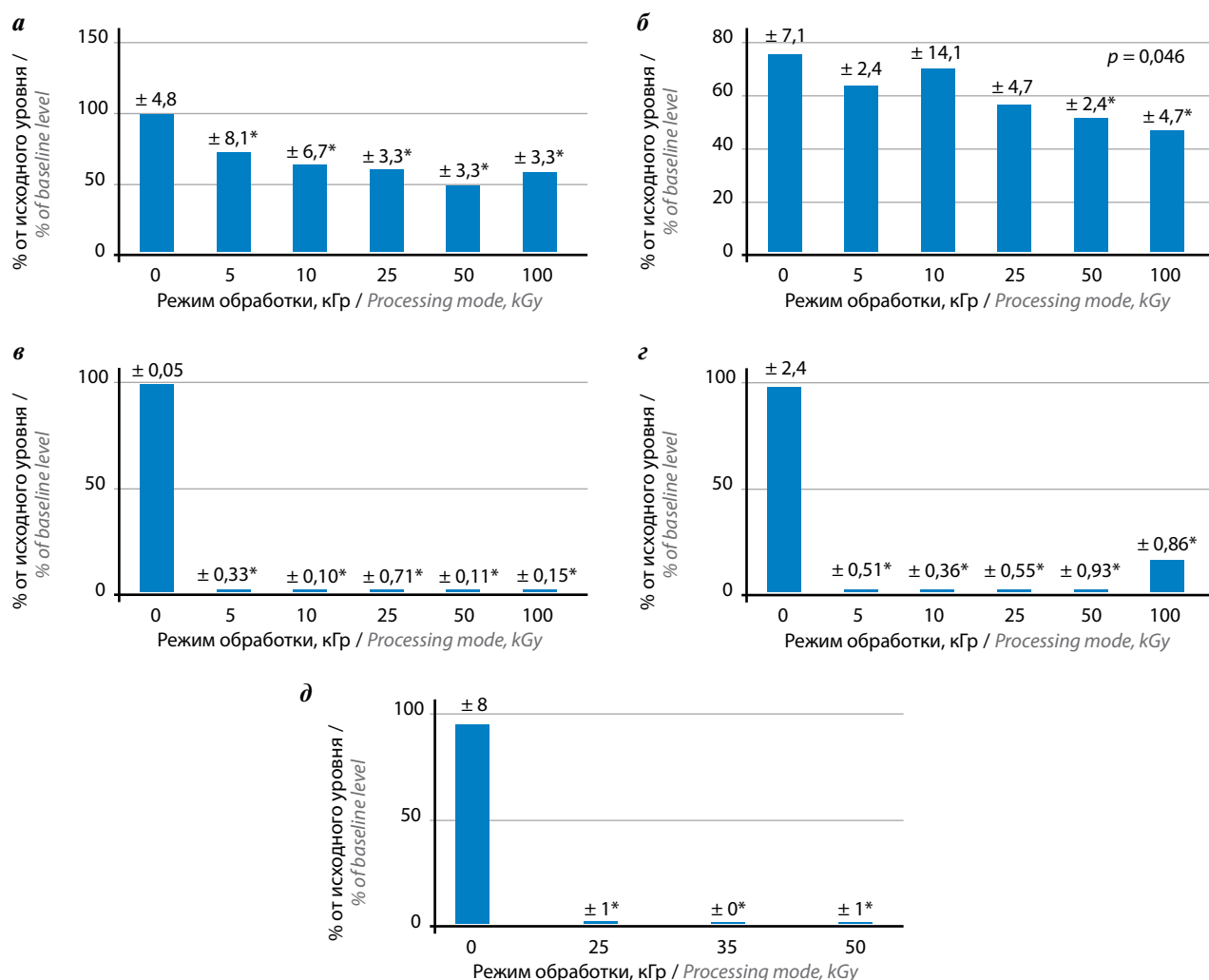


Рис. 1. Результаты оценки выживаемости дрожжей *S. cerevisiae* в суспензии (а) и на образцах гидрогеля (б); грамотрицательных бактерий *E. coli* в суспензии (в) и на образцах гидрогеля (г); грамположительных неспорообразующих бактерий *L. acidophilus* (д) после обработки пучком ускоренных электронов в различных режимах относительно исходного уровня жизнеспособности. Контроль — режим обработки 0 кГр. *Достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$)

Fig. 1. Results of evaluating the survival rate of yeast *S. cerevisiae* in suspension (а) and on hydrogel samples (б); gram-negative bacteria *E. coli* in suspension (в) and on hydrogel samples (г); gram-positive non-spore-forming bacteria *L. acidophilus* (д) after treatment with an electron beam in various modes relative to the initial level of viability. Control — processing mode 0 kGy. *Differences from the control are significant ($p < 0.05$)

отмечен после применения режимов 50–100 кГр. Эффект обработки пучком ускоренных электронов образцов ГГ с нанесенными дрожжами (СМ + ГГ) был сходным (см. рис. 1, б). Достоверный фунгицидный эффект (46–51 % относительно исходного уровня) наблюдали только в результате применения режимов 50–100 кГр. Использование режима 25 кГр обеспечивало гибель в среднем 41 % дрожжей. Значительно более выраженный антимикробный эффект изучаемого метода обработки был обнаружен на модели *E. coli* (см. рис. 1 в, г). Так, было установлено, что применение всех использованных режимов приводило к достоверному угнетению жизнеспособности бактерий как в суспензии, так и на образцах ГГ (гибель 95–100 % относительно исходного уровня). На модели

грамположительных бактерий *L. acidophilus* было показано, что полная гибель этих микроорганизмов на ГГ происходила при использовании режимов 25–50 кГр (см. рис. 1, д).

Исследование способности микроорганизмов к делению после облучения. Согласно приведенным выше результатам, воздействие пучка ускоренных электронов не обеспечивало немедленной гибели дрожжей. Для проверки гипотезы о том, что изучаемый метод все же перспективен для стерилизации ГГ, в специальной серии экспериментов исследовали его способность подавлять деление микроорганизмов, предотвращая рост культуры (т.е. фунгио-/бактериостатический эффект оказанного воздействия). А именно оценили подавление роста культуры микроорганизмов,

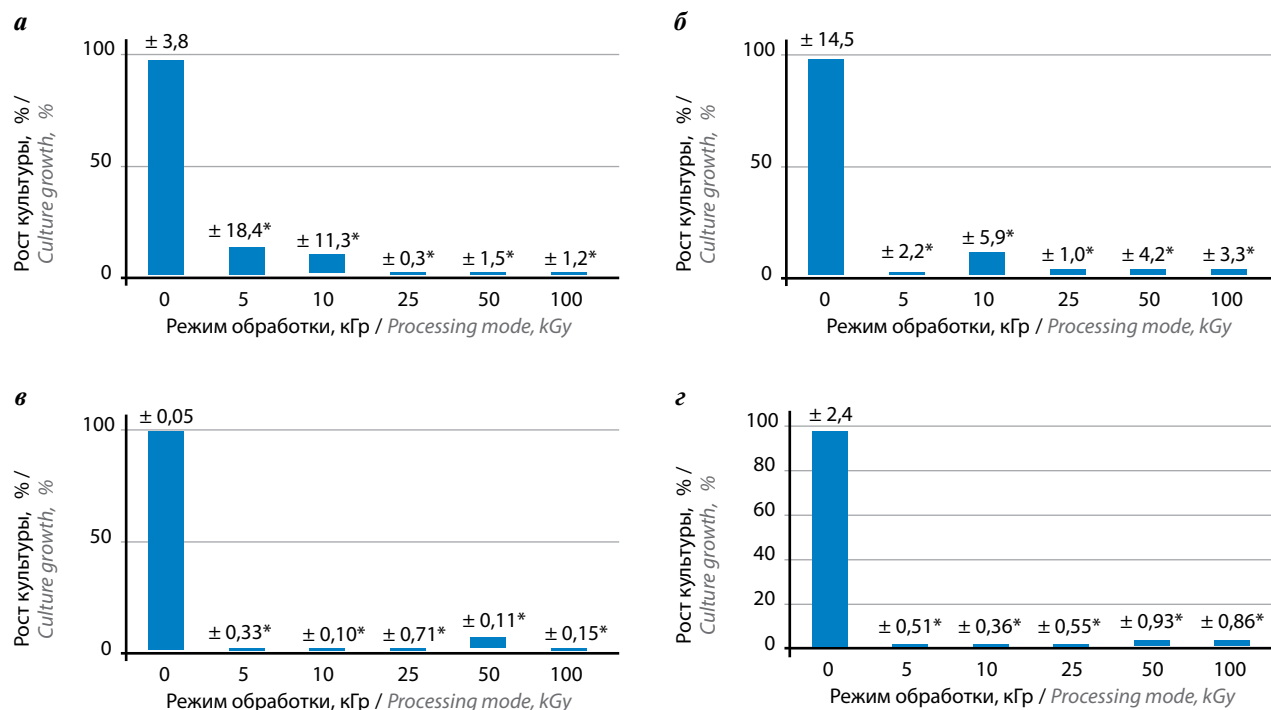


Рис. 2. Оценка подавления роста культуры микроорганизмов через 1 сут после электронно-лучевой обработки пучком ускоренных электронов в режимах 5–100 кГр: дрожжей *S. cerevisiae* в суспензии (а) и на образцах гидрогеля (б); бактерий *E. coli* в суспензии (в) и на образцах гидрогеля (г). Контроль – режим обработки 0 кГр. *Достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$)

Fig. 2. Evaluation of inhibition/suppression of the microorganisms division 1 day after electron beam treatment with accelerated electrons in modes 5–100 kGy: of yeasts *S. cerevisiae* in suspension (a) and on hydrogel samples (б), as well as *E. coli* bacteria in suspension (в) and on hydrogel samples (г). Control – processing mode 0 kGy. *Differences from the control are significant ($p < 0.05$)

опосредованного их способностью к делению, через 1 сут после обработки пучком ускоренных электронов (рис. 2).

Представленные данные показывают, что обработка пучком ускоренных электронов во всех использованных режимах приводила к достоверному угнетению жизнеспособности микроорганизмов. При использовании режимов 25, 50 и 100 кГр стерилизующий эффект достигал 99 %.

ИК-Фурье-спектроскопия образцов ГГ при облучении пучком ускоренных электронов. Приведенные выше результаты позволили выявить эффективные режимы обработки ГГ для его стерилизации. Однако данный подход представляет интерес для практического использования только в том случае, если результатом воздействия на ГГ не становится изменение его физических свойств, влияющих на эксплуатационные характеристики материала. В связи с этим в специальной серии экспериментов было исследовано влияние электронно-лучевой обработки в режимах в диапазоне от 25 до 50 кГр: изучено изменение химических связей в образцах с помощью ИК-Фурье-спектроскопии методом нарушенного полного внутреннего отражения.

Полученные данные свидетельствуют о том, что применение режимов обработки 25 кГр и менее не из-

меняло структуру ГГ (рис. 3). Однако после стерилизации исследуемых образцов в режиме 35 кГр наблюдали снижение интенсивности пиков в диапазоне от 1500 до 1000 см^{-1} , которые почти полностью исчезли после обработки 50 кГр, что свидетельствует о разрушении структуры ГГ.

На основании анализа полученных результатов был сделан вывод, что наиболее предпочтительным режимом для стерилизации ГГ методом электронно-лучевой обработки пучком ускоренных электронов является 25 кГр.

Биосовместимость гидрогелей. Представленные выше результаты позволили определить эффективный режим стерилизации ГГ пучком электронов, не приводящий к достоверным изменениям его свойств. Это обеспечило возможность использования ГГ данного типа в медицинских целях при условии его биосовместимости. Примером такой цели может быть получение объемного скаффолда, предназначенного для локального внесения клеток, колонизировавших его *ex vivo*. Для оценки перспективности применения тестируемого ГГ в качестве объемного скаффолда для целевой имплантации клеток мы исследовали индукцию гемолиза изучаемыми образцами ГГ, а также цитотоксичность в отношении лейкоцитов крови после 2 и 24 ч инкубации. С этой целью

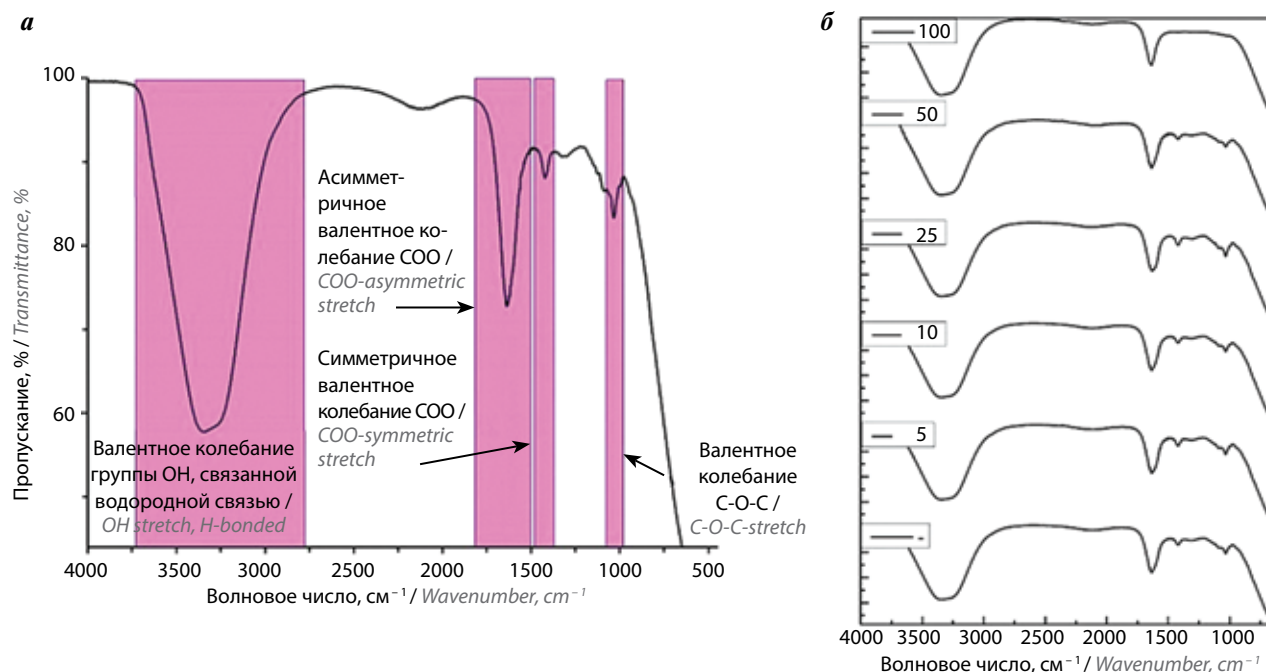


Рис. 3. Инфракрасный спектр образцов гидрогеля до (а) и после (б) электронно-лучевой обработки пучком ускоренных электронов
Fig. 3. Infrared spectrum of hydrogel samples before (a) and after (b) electron beam processing with an accelerated electron beam

ГГ обрабатывали пучком электронов в режиме 25 кГр. Результаты проведенных экспериментов представлены на рис. 4.

Полученные данные показали отсутствие достоверного воздействия ГГ на выживаемость клеток и гемолиз (при сравнительном межгрупповом анализе $p < 0,05$). Следовательно, изучаемый ГГ после стерилизации в режиме 25 кГр соответствует критериям биосовместимости. Таким образом, полученные результаты подтверждают возможность использования ГГ после обработки предлагаемым способом в качестве платформы, или скаффолда, для заселения клетками.

3D-культивирование ММСК в ГГ. ММСК получали из аспирата костного мозга собак. Полученные после культивирования клетки характеризовались следующим фенотипом: CD34⁻CD45⁻CD105^{high+}CD90^{high+}CD11c^{high+}CD11b⁺CD95^{low+} (что позволило идентифицировать их как ММСК). ММСК заселяли в образцы ГГ (модель пространственного скаффолда для 3D-культивирования), а также на дно лунок планшета (модель 2D-культивирования) и оценивали их пролиферативную активность, а также фенотип через 12 сут инкубации.

Рис. 5 демонстрирует, что в условиях 3D-культивирования образуются циркулярные структуры, формирующие в толще гидрогеля капиллярноподобную сеть.

Для изучения пролиферативной активности ММСК в ГГ была оценена экспрессия внутриклеточ-

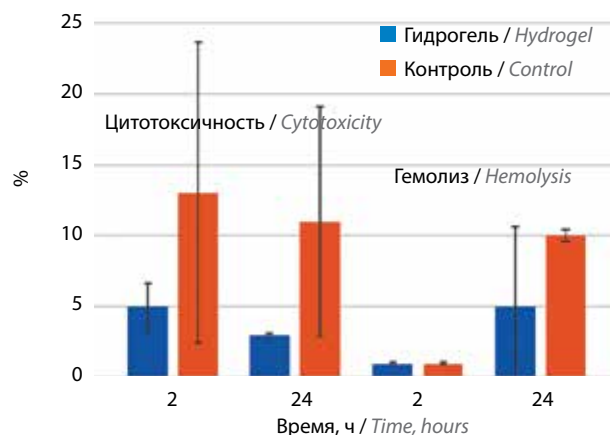


Рис. 4. Сравнительный анализ цитотоксичности и гемолиза, индуцированных гидрогелем, в сравнении с контролем (инкубация клеток при отсутствии гидрогеля в аналогичных условиях)

Fig. 4. Comparative analysis of cytotoxicity and hemolysis induced by hydrogel compared with the control (incubation of cells in the absence of hydrogel under similar conditions)

ного белка Ki-67. Установлено, что инкубация в гидрогелевом скаффолде достоверно не влияла на количество Ki-67⁺-клеток ($22 \pm 3,5$ % при 2D-культивировании и $27 \pm 1,7$ % при 3D-культивировании в ГГ). Изучение фенотипа ММСК в различных моделях культивирования также не позволило выявить угнетающего воздействия ГГ на экспрессию клетками молекул адгезии в условиях 3D-культивирования (см. таблицу).

Экспрессия мезенхимальными мультипотентными стромальными клетками (ММСК) молекул адгезии и маркеров пролиферации после инкубации в гидрогеле

Mesenchymal multipotent stromal cells (MMSC) expression of adhesion molecules and proliferation markers after incubation in hydrogel

Модель культивирования Cultivation mode	Образцы ММСК MMSC samples		
	CD11c	CD11b	CD62
В гидрогеле после облучения (3D-культивирование), % In the hydrogel after irradiation (3D cultivation), %	83 ± 4,6	92 ± 1,5	76 ± 2,3
Контроль (2D-культивирование), % Control (2D cultivation), %	81 ± 4,1	95 ± 2,6	77 ± 4,4
<i>p</i>	0,376	0,248	0,414

Закключение

Полученные результаты позволяют прийти к заключению, что обработка пучком ускоренных электронов обладает бактерицидной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий использованных модельных штаммов. В частности, было установлено, что обработка пучком ускоренных электронов предотвращала деление клеток и снижала жизнеспособность бактериальной культуры на 95–100 % как в суспензии, так и при контаминации образцов ГГ.

Воздействие пучка ускоренных электронов обладало более слабым эффектом в отношении одноклеточных дрожжевых грибов вида *S. cerevisiae*. Так, было обнаружено, что только самые жесткие режимы обработки – 50 и 100 кГр – способствуют достоверной гибели клеток. Однако обработка пучком ускоренных электронов на всех режимах повреждает клеточные структуры, предотвращая возможность пролиферации микроорганизмов, что проявляется подавлением роста и последующей гибелью микробной культуры. Учитывая вышеизложенное, можно констатировать, что экспериментальный метод обработки способствовал деконтаминации ГГ от бактерий на всех режимах, тогда как его применение даже в самых жестких дозах гарантировало только частичное снижение количества живых дрожжевых клеток к концу обработки. Однако повреждения дрожжевых клеток, вероятно,

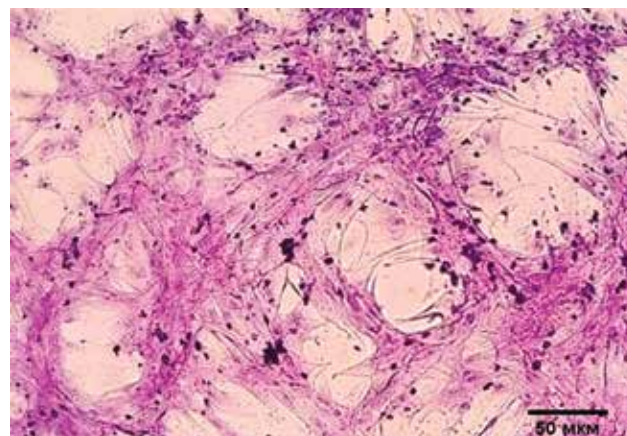


Рис. 5. Структурирование культуры мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток в модели пространственного скаффолда для 3D-культивирования на 12-е сутки инкубации. Окраска гематоксилином и эозином, ×400

Fig. 5. Structuring of mesenchymal multipotent stromal cells culture in a spatial scaffold model for 3D cultivation on the 12th day of incubation. Hematoxylin and eosin staining, ×400

были настолько значительны, что это приводило к подавлению клеточного деления и в конечном счете к отсроченной гибели дрожжевой культуры. Таким образом, обработка пучком ускоренных электронов на всех испытанных режимах ингибировала колониеобразование как бактерий, так и дрожжей, т. е. демонстрировала бактериостатический и фунгиостатический эффект.

Проведенные исследования показали, что предложенный режим обработки ГГ пучком ускоренных электронов в дозе 25 кГр оказывает микробицидное воздействие, не вызывая разрушающего воздействия на структуру ГГ, не влияя на пролиферативный потенциал и способность формировать капилляроподобные структуры ММСК. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, показавших, что оптимальным стерилизующим режимом для гидрогелей является облучение электронным пучком (в пределах 25–100 кГр). Следовательно, обработка в указанном режиме может применяться для стерилизации ГГ с целью их использования для разработки новых продуктов медицинского назначения, в том числе скаффолдов, колонизированных клеточными культурами, что принципиально важно для обеспечения васкуляризации биоинженерной конструкции после имплантации в ткани организма.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Li Z., Chen Z., Chen H. et al. Polyphenol-based hydrogels: pyramid evolution from crosslinked structures to biomedical applications and the reverse design. *Bioact Mater* 2022;17:49–70. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2022.01.038
- Santamaria G., Brandi E., Vitola P. et al. Intranasal delivery of mesenchymal stem cell secretome repairs the brain of Alzheimer's mice. *Cell Death Differ* 2021;28(1):203–18. DOI: 10.1038/s41418-020-0592-2
- Sultan M.T., Choi B.Y., Ajiteru O. et al. Reinforced-hydrogel encapsulated hMSCs towards brain injury treatment by trans-septal approach. *Biomaterials* 2021;266:120413. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120413
- Kiselevskiy M.V., Vlasenko R.Y., Stepanyan N.G. et al. Secretome of mesenchymal bone marrow stem cells: is it immunosuppressive or proinflammatory? *Bull Exp Biol Med* 2021;172(2):250–3. DOI: 10.1007/s10517-021-05371-5
- Kiselevskiy M., Vlasenko R., Reshetnikova V. et al. Potential use of mesenchymal multipotent cells for hemopoietic stem cell transplantation: pro and contra. *J Pediatr Hematol Oncol* 2021;43(3):90–4. DOI: 10.1097/MPH.0000000000002065
- Kakudo N., Morimoto N., Ma Y., Kusumoto K. Differences between the proliferative effects of human platelet lysate and fetal bovine serum on human adipose-derived stem cells. *Cells* 2019;8(10):1218. DOI: 10.3390/cells8101218
- Kirsch M., Rach J., Handke W. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cell cultivation in fetal calf serum, human serum, and platelet lysate in 2D and 3D systems. *Front Bioeng Biotechnol* 2021;8:598389. DOI: 10.3389/fbioe.2020.598389
- Shanbhag S., Rashad A., Nymark E.H. et al. Spheroid coculture of human gingiva-derived progenitor cells with endothelial cells in modified platelet lysate hydrogel. *Front Bioeng Biotechnol* 2021;9:739225. DOI: 10.3389/fbioe.2021.739225
- Chahal A.S., Gomez-Florit M., Domingues R.M.A. et al. Human platelet lysate-loaded poly(ethylene glycol) hydrogel induce stem cell chemotaxis *in vitro*. *Biomacromolecules* 2021;22(8):3486–96. DOI: 10.1021/acs.biomac.1c00573
- Ясюкевич А.С., Загородный Г.М., Потاپнев М.П. и др. Показатели, безопасность, результаты клинического использования аутологичной плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, и дальнейшие перспективы ее изучения. *Прикладная спортивная наука* 2021;1(13):100–9. Yasyukevich A.S., Zagorodny G.M., Potapnev M.P. et al. Indications, safety, results of clinical use of autologous plasma enriched with soluble platelet factors, and further prospects for its study. *Prikladnaya sportivnaya nauka = Applied sports science* 2021;1(13):100–9. (In Russ.).
- Gallego M., López C., Carmona J.U. Carmon Evaluation of the pro-, anti-inflammatory, and anabolic effects of autologous platelet-rich gel supernatants in an *in vitro* coculture system of canine osteoarthritis. *Vet Med Int* 2022;2022:3377680. DOI: 10.1155/2022/3377680
- Lei T., Liu Y., Deng S. et al. Hydrogel supplemented with human platelet lysate enhances multi-lineage differentiation of mesenchymal stem cells. *J Nanobiotechnology* 2022;20(1):176. DOI: 10.1186/s12951-022-01387-9
- Senatov F., Anisimova N., Kiselevskiy M. et al. Polyhydroxybutyrate/hydroxyapatite highly porous scaffold for small bone defects replacement in the nonload-bearing parts. *J Bionic Eng* 2017;14(4): 648–58. DOI: 10.1016/S1672-6529(16)60431-6
- Galante R., Pinto T.J.A., Colaço R., Serro A.P. Sterilization of hydrogels for biomedical applications: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2018;106(6):2472–92. DOI: 10.1002/jbm.b.34048
- Sedlacek O., Kucka J., Monnery B.D. et al. The effect of ionizing radiation on biocompatible polymers: from sterilization to radiolysis and hydrogel formation. *Polym Degrad Stab* 2017;137:1–10. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2017.01.005
- Zhang K., Wang Y., Wei Q. et al. Design and fabrication of sodium alginate/carboxymethyl cellulose sodium blend hydrogel for artificial skin. *Gels* 2021;7(3):115. DOI: 10.3390/gels7030115
- Osidak E.O., Karalkin P.A., Osidak M.S. et al. Viscoll collagen solution as a novel bioink for direct 3D bioprinting. *J Mater Sci Mater Med* 2019;30(3):31. DOI: 10.1007/s10856-019-6233-y
- Pavlov Yu.S., Bystrov P.A. Software and hardware complex for radiation processing facility control. *Radiat Phys Chem* 2022;196:110110. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2022.110110
- Choudhary R., Venkatraman S.K., Bulygina I. et al. Biomineralization, dissolution and cellular studies of silicate bioceramics prepared from eggshell and rice husk. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021;118:111456. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111456

Вклад авторов

П.А. Быстров: отработка методики и проведение электронно-лучевой обработки гидрогелей, написание и редактирование текста статьи;

К.М. Новрузов: проведение исследований для получения данных, статистический анализ данных, написание и редактирование текста статьи;

М.П. Потاپнев: разработка дизайна экспериментов по изучению биоактивных свойств гидрогеля;

С.М. Космачева: обзор публикаций по теме статьи, анализ данных о колонизации гидрогеля мезенхимальными мультипотентными стромальными клетками;

Н.Ю. Анисимова: проведение исследований для получения данных, интерпретация полученных результатов, написание и редактирование текста статьи;

М.В. Киселевский: обзор публикаций по теме статьи, разработка дизайна исследований биологических свойств гидрогеля;

П.С. Мышелова, И.Н. Булыгина, Ф.С. Сенатов: характеристика гидрогеля и исследование его физических свойств методом ИК-Фурье.

Author's contribution

P.A. Bystrov: development of the methodology for electron beam processing of hydrogels, article writing and editing;

K.M. Novruzov: conducting research to obtain data, statistical analysis of data, article writing and editing;

M.P. Potapnev: development of the design of experiments to study the bioactive properties of the hydrogel;

S.M. Kosmacheva: review of publications on the topic of the article, analysis of data on the colonization of the hydrogel by mesenchymal multipotent stromal cells;

N.Yu. Anisimova: conducting research to obtain data, interpreting the results, article writing and editing;

M.V. Kiselevskiy: review of publications on the topic of the article, development of the design of studies of the biological properties of the hydrogel;

P.S. Myshelova, I.N. Bulygina, F.S. Senatov: characterization of the hydrogel and the study of its physical properties by the IR-Fourier method.

ORCID авторов / ORCID of authors

П.А. Быстров / P.A. Bystrov: <https://orcid.org/0000-0001-8453-5739>

К.М. Новрузов / K.M. Novruzov: <https://orcid.org/0000-0002-0773-255X>

М.П. Потапнев / M.P. Potapnev: <https://orcid.org/0000-0001-7705-9383>

Н.Ю. Анисимова / N.Yu. Anisimova: <https://orcid.org/0000-0002-4370-6578>

М.В. Киселевский / M.V. Kiselevskiy: <https://orcid.org/0000-0002-0132-167X>

Ф.С. Сенатов / F.S. Senatov: <https://orcid.org/0000-0003-3907-5344>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030».

Funding. The study was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation under the strategic academic leadership program “Priority 2030”.

Статья поступила: 13.04.2022. Принята к публикации: 31.08.2022.

Article submitted: 13.04.2022. Accepted for publication: 31.08.2022.