

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-47

**БИОКОМПОЗИТ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ
ДЛЯ 3D-КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК****BACTERIAL CELLULOSE BIOCOMPOSITE FOR 3D-CULTIVATION OF TUMOR CELLS**

А. Ю. Алексеева, А. Н. Шишпарёнок, Д. Д. Жданов

НИИ биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича, Москва

A. Y. Alekseeva, A. N. Shishparenok, D. D. Zhdanov

V.N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Moscow

✉annaalekseeva2345@gmail.com

Аннотация

Двумерное культивирование (2D) часто используется для моделирования опухолевых процессов из-за простоты, однако имеет ряд недостатков, таких как измененная морфология и поведение клеток, а также низкая прогнозируемость ответа на лекарства. В данной работе разработан композит на основе бактериальной целлюлозы (БЦ) для трехмерного культивирования (3D) клеток рака легкого и проведено сравнение действия цисплатина на 2D- и 3D-культуры.

Abstract

Two-dimensional (2D) cultivation is often used to model tumor processes due to its simplicity, but it has several disadvantages, such as altered cell morphology and behavior, as well as low predictability of drug response. In this work, a composite based on bacterial cellulose (BC) was developed for the three-dimensional cultivation (3D) of lung cancer cells and the effect of cisplatin on 2D and 3D cultures was compared.

Введение

Для моделирования действия противоопухолевых препаратов на раковые клетки чаще всего используют 2D-культуры, однако морфология и рост клеток в 3D-культуре ближе к условиям *in vivo*, чем при 2D-культивировании [1]. 2D-культивирование также не может имитировать гетерогенность опухоли, в то время как рост опухоли в 3D-среде позволяет находиться клеткам в постоянном контакте с внеклеточным матриксом и другими клетками [2].

Матригель наиболее часто используется для 3D-культивирования, однако, помимо труднодоступности, его химический состав непостоянен. В связи с этим разрабатываются иные матрицы для 3D-культивирования из более доступных материалов и с лучшей стабильностью [3].

БЦ является одним из перспективных материалов для создания матриц для 3D-культивирования благодаря хорошей биосовместимости, чистоте, отсутствию иммуногенности, а также простоте производства и модификации [4].

Материалы и методы

В качестве продуцента БЦ использовали штамм *Komagataeibacter hansenii* (ВКПМ № В-11239). Для работы биомассы продуцента штамм культивировали статично на модифицированной среде Хестрина — Шрамма в течение 10 суток. Для получения пленок БЦ к полученной биомассе продуцента добавляли среду и переносили в чашки Петри, где выращивали в течение 7 суток до образования пленок. Очищенные пленки измельчали гомогенизатором в течение 20 минут при скорости 20 000 об/мин и фильтровали через сито с размером ячеек 75 мкм.

Для приготовления композита использовали полученный концентрированный фильтрат БЦ, полиэтиленгликоль (ПЭГ) 6000 Да, поливиниловый спирт (ПВС) и 70%-й этанол, которые прогревали при 80 °С в течение 3 часов. Полученный гель вносили по 500 мкл в 24-луночный планшет и замораживали при температуре –24 °С. Через 24 часа композит размораживали при комнатной температуре и замораживали повторно для образования высокопористой структуры за счет формирования кристаллов льда внутри матрицы.

Для характеристики физических свойств биокомполита определяли водоудерживающую способность, адсорбционную емкость и пористость, а также динамику его набухания. Для определения химического состава композита использовали инфракрасную спектроскопию. Для работы использовали клетки H1299-GFP, конститу-

тивно экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок. Для определения оптимальной концентрации клеток для посадки в 2D-культуру и гелевый 3D-композит, а также с целью определения значений IC₅₀ для действия цисплатина на клетки проводили МТТ-тест.

Перед посадкой клеток композиты предварительно инкубировали при 37 °С в стерильном фосфатно-солевом буфере в течение 12 часов и промывали фосфатно-солевым буфером для удаления спирта. После этого гель прогревали на термостате при 77 °С в течение 10 минут. Клетки H1299-GFP ($1,8 \times 10^5$ клеток/лунку) высаживали на поверхность гелевого композита и растили на среде DMEM. Каждые 72 часа 50 % среды заменяли на свежую. Фотографии клеток в биокомпозите получали в течение 15 дней на флуоресцентном микроскопе МИБ-2-ФЛ.

Результаты

Разработан композит, содержащий БЦ, ПВС и ПЭГ (6 %). Состав геля был подтвержден с помощью ИК-спектроскопии. Во влажном состоянии его средняя масса составила 0,527 г, в лиофилизированном — 0,206 г, а при повторном замачивании — 1,003 г. Данные результаты указывают на то, что 3D-композит также обладает высокой способностью к набуханию, характерной для гидрогелей.

Определены водопоглощающая способность композита — 62,2 %, адсорбционная способность — 389,4 % и пористость — 677,1 %. Полученные данные указывают на то, что добавление ПВС и ПЭГ к концентрату БЦ изменяют ее физико-химические свойства, переводя структуру в гидрогелевую. В лиофилизированном виде БЦ сама по себе не обладает высокой пористостью и способностью к набуханию.

При оценке жизнеспособности клеток после добавления цисплатина в 2D-модель и полученный 3D-композит выявили следующие различия: цисплатин был эффективен в отношении 2D-культуры H1299-GFP, в то время как на 3D-культуру цисплатин не оказывал заметного токсического влияния. Таким образом, действие цисплатина на 2D- и 3D-культуру различалось.

Во время культивирования морфология клеток H1299-GFP не изменялась, и композит не был подвержен деградации. Это указывает на то, что разработанный композит подходит для длительного культивирования без токсического действия на клетки.

Литература

1. Karki S. B., Thapa Gupta T., Yildirimayan E. et al. Investigation of non-thermal plasma effects on lung cancer cells within 3D collagen matrices // *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2017. Vol. 50.
2. Moghimi N., Hosseini S. A., Dalan A. B. et al. Controlled tumor heterogeneity in a co-culture system by 3D bio-printed tumor-on-chip model // *Sci. Rep.* 2013. Vol. 13. Art. 13648.
3. Caliri S. R., Burdick J. A. A practical guide to hydrogels for cell culture // *Nat. Methods*. 2016. Vol. 13. P. 405–414.
4. Halib N., Ahmad I., Grassi M., Grassi G. The remarkable three-dimensional network structure of bacterial cellulose for tissue engineering applications // *Int. J. Pharm.* 2019. Vol. 566. P. 631–640.