

УДК 57.086.83

**КОМПОЗИТНЫЕ СКАФФОЛДЫ НА ОСНОВЕ ГИДРОГЕЛЕЙ ДЛЯ ТРЕХМЕРНОГО  
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С КЛЕТКАМИ НЕРВНОЙ ТКАНИ**

**А.А. Денисов<sup>1,2</sup>**

*<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, Минск*

*<sup>2</sup>Институт физиологии НАН Беларуси, Минск*

Методы культивирования клеток *in vitro* широко используются в современной биологии и медицине. Спектр их применений включает модельные системы для изучения фундаментальных ос-

нов клеточной биологии и механизмов заболеваний, тестирование новых лекарственных препаратов на предмет эффективности и безопасности, разработку способов регенерации поврежденных тканей. Традиционные подходы по культивированию клеток основаны на применении культуральных емкостей с плоским дном, таких как флакон, планшет или чашка Петри, куда клетки высеваются из суспензии, прикрепляются к дну и растут в виде слоя в двумерном (2D) пространстве в контролируемых условиях специальных клеточных инкубаторов. Преимуществами методов культивирования на плоском субстрате является их относительная простота, широкая распространенность и опыт применения, накопленный за многие десятилетия. Вместе с тем, серьезным недостатком такого подхода является низкое соответствие создаваемых условий реальным условиям в организме. Клетки в чашке Петри находятся на жесткой плоской поверхности, как правило, распластанные на ней при наличии адгезивного субстрата, что существенно отличается от условий *in vivo*. Это ярко проявляется в приложениях фарминдустрии при разработке новых лекарственных препаратов, когда подавляющее большинство субстанций-кандидатов, прошедших тестирование *in vitro*, отсеивается затем на первой стадии клинических испытаний [1]. Эти особенности 2D-культивирования привели к значительной интенсификации научных исследований, направленных на разработку методов трехмерного (3D) культивирования клеток. Методы 3D-культивирования обеспечивают ряд преимуществ по сравнению с 2D-подходами [2]. Значительно более совершенные биомиметические характеристики 3D-культуры клеток позволяют получать с их помощью более физиологически релевантные результаты. Становится возможным создание сложных трехмерных гетерогенных систем взаимодействующих клеток, в том числе, органоидов – развивающихся клеточных конструкций, обладающих определенными свойствами органов и тканей [3].

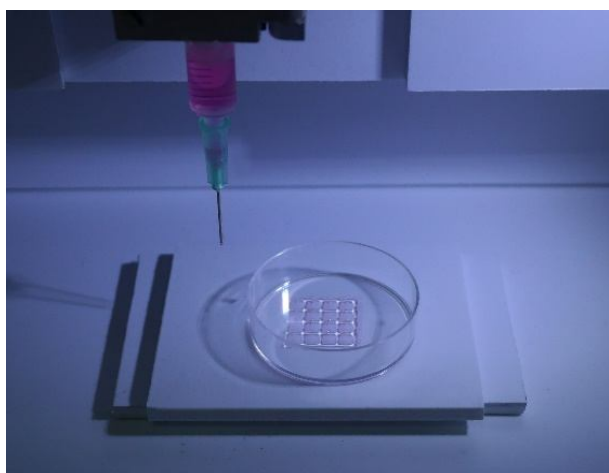
Небольшие трехмерные клеточные сфероиды можно создавать и в стандартных растворах для клеточного культивирования при отсутствии адгезивного субстрата, но более продвинутые модели используют скаффолды – структуры, обеспечивающие поддержку клеткам в 3D-пространстве, которые могут быть либо жесткими, либо же эластичными – на основе гидрогелей. Гидрогели могут включать молекулы внеклеточного матрикса, формируя близкое к естественному биохимическое окружение клеток. Преимуществом таких скаффолдов является их совместимость с методами биопечати, дающими возможность создания сложных трехмерных паттернов из «биочернил» на основе гидрогеля, загруженного клетками. В настоящее время разработаны самые разные составы гидрогелей на основе естественных и синтетических полимеров в целях оптимизации их свойств для различных типов клеток и различных приложений. При этом гидрогель может содержать не только гидрофильные полимеры, но и другие материалы, предназначенные, например, для модификации механических или электрических свойств. Увеличение электропроводности гидрогеля может быть важным при разработке биоинженерных и интерфейсных систем для регистрации электрической активности нейронов. К числу соединений, которые могут применяться для модификации свойств гидрогеля, относятся наноразмерные соединения углерода, такие как графен. Материалы на основе графена обладают механической прочностью, электропроводностью и биосовместимостью, что делает их перспективными кандидатами для использования в приложениях, подразумевающих создание электрического интерфейса с клетками нервной ткани.

Целью данной работы было исследование возможностей применения графенсодержащих композитных гидрогелей для формирования паттернов клеток нервной ткани и интерфейсных элементов с применением методов 3D-печати и биопечати.

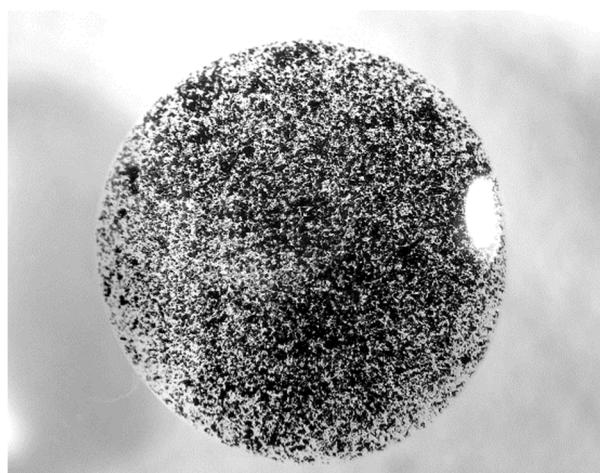
В работе использовали клетки линии глиомы крысы С6. В качестве основы для гидрогеля использовали композицию, состоящую из альгината натрия, крысиного коллагена первого типа и желатина. Компоненты растворяли в среде DMEM и добавляли композит графит/многослойный графен. Итоговая концентрация компонентов составляла: 0,5% альгината натрия, 0,5% коллагена и 2% желатина. Гель помещали в шприц и с применением разработанного биопринтера [4] формировали паттерн, затем фиксировали раствором, содержащим 1% хлорида кальция и промывали раствором фосфатного буфера. Далее клетки высевали из суспензии, после их закрепления заливали средой DMEM и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Для контроля клетки высевали по стандартной процедуре в чашки Петри. Интерфейсные элементы печатали с применением принтера Wanhao Duplicator 7 Plus (КНР).

Печатающий узел биопринтера и вариант напечатанного гидрогелевого паттерна показан на рисунке *а*. На рисунке *б* показан фрагмент паттерна из композитного гидрогеля, формируемого в виде капель в узлах квадратной решетки. На рисунке *в* показано изображение клеток глиомы крысы С6 после трех дней культивирования в чашке Петри по стандартной методике. Клетки распластываются по поверхности, формируют однородный монослой, имеют характерную вытянутую

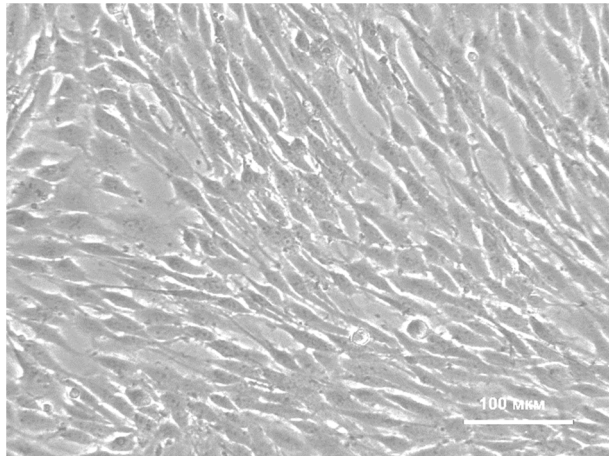
форму. На рисунке *в* показан фрагмент композитного паттерна с культивируемыми клетками. В данном случае клетки, мигрировавшие на дно чашки, имеют более округлую форму и более тонкие отростки. В объеме проявляется клеточная агрегация, при этом отдельные агрегаты включают в себя фрагменты углеродного композита. Полученные данные свидетельствуют о биосовместимости применяемого композитного гидрогеля. Коллаген первого типа в его составе является элементом внеклеточного матрикса нервной ткани и обеспечивает оптимальные условия роста нейритов, альгинат увеличивает прочность гидрогеля после ионной сшивки, желатин служит для оптимизации реологических свойств при печати методом шприцевой экструзии. Следует отметить, что гидрогель такого состава обеспечивает возможности сшивки различного типа – ионная сшивка альгината, ферментативная сшивка желатина. Коллаген может необратимо формировать гель при повышении температуры до физиологической. Таким образом, возможно быстрое формирование геля ионной сшивкой альгината с последующим более медленным упрочнением желатина и коллагена.



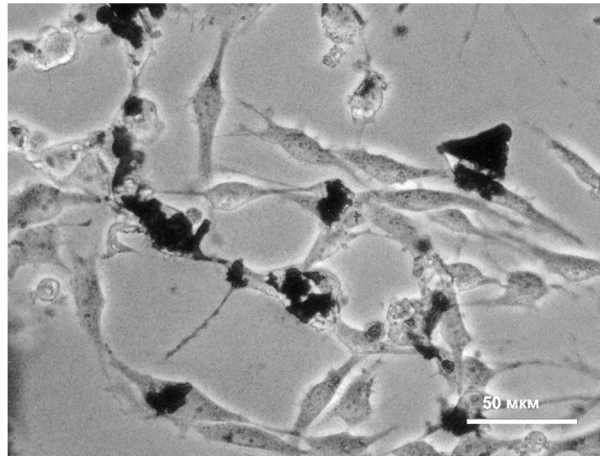
*а*



*б*



*в*



*г*

**Рисунок – Печатающий узел биопринтера и вариант напечатанного в чашке Петри гидрогелевого паттерна (*а*). Фрагмент композитного гидрогелевого паттерна (*б*). Изображение клеток глиомы крысы С6 при культивировании по стандартной методике (*в*). Клетки С6, культивируемые в композитном скаффолде (*г*).**

Разработанные методики могут применяться и в составе современных подходов класса «лаборатория на чипе», когда экспериментальная модель *in vitro* тесно интегрирована с сенсорными элементами, обеспечивающими мониторинг состояния клеток. В случае клеток нервной ткани для регистрации электрической активности применяются микроэлектродные сенсоры. В связи с этим отработаны методические приемы изготовления элементов сенсоров электрической активности нейронов с применением методов фотополимерной 3D-печати. Для этого разработан набор трехмерных моделей тестовых структур с различными параметрами формы и размеров рабочей области электродов и каналов сенсора. С применением фотополимерного 3D-принтера изготовлены тестовые каналные структуры и определены оптимальные параметры времени экспозиции слоев

и состава фотополимера для печати элементов сенсора с наилучшим пространственным разрешением. Установлено, что для оптимизации разрешения печати элементов канала необходимо увеличение содержания ультрафиолетового блокатора в фотополимере. Получено, что разработанный подход дает возможность выполнять печать каналов микроэлектродов с рабочей областью менее 100 мкм, что достаточно для регистрации внеклеточной популяционной активности клеток нервной ткани. Каналы сенсора предназначены для заполнения электропроводящим гидрогелем, что позволяет формировать регистрирующие микроэлектроды. Данный подход непосредственно совместим с методами формирования биоинженерных конструкций, состоящих из эксплантатов нервной ткани, культивируемых в гидрогеле. Таким образом обеспечивается интеграция гидрогелевых интерфейсных элементов и клеточных конструкций, культивируемых в гидрогелевом скаффолде.

#### **Список использованных источников**

1. Sun D. et al. Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? // Acta Pharm Sin B. 2022. Vol. 12, № 7. P. 3049–3062.
2. Langhans S.A. Three-Dimensional *in vitro* Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning // Front. Pharmacol. 2018. Vol. 9. P. 6.
3. Corró C., Novellasdemunt L., Li V.S.W. A brief history of organoids // American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2020. Vol. 319, № 1. P. 151–165.
4. Денисов А.А., Губкин С.В. Биопринтинг для создания конструкций с использованием живых клеток в аддитивных технологиях // Неразрушающий контроль и диагностика. 2021. № 3. С. 43–52.