

## Кополімерні гідрогелеві мембрани для іммобілізації та культивування стовбурових клітин людини

О. О. Косенко, Л. Л. Лукаш<sup>1</sup>, Ю. М. Самченко, Т. А. Рубан<sup>1</sup>,  
З. Р. Ульберг, С. И. Лукаш<sup>1</sup>

Інститут біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України  
Бул. Академіка Вернадського, 42, Київ, 03142, Україна

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

lukash@imbg.org.ua

---

*На основі акриламідів, акрилонітрилу та акрилової кислоти методом радикальної кополімеризації синтезовано велику кількість гідрогелевих мембран для культивування стовбурових клітин. В результаті порівняльних досліджень встановлено, що оптимальні параметри, визначені іммобілізацією мезенхімних стовбурових клітин людини, притаманні неіоногенним кополімерним гідрогелям на основі акриламідів та акрилонітрилу. Використання гідрогелів із значним вмістом акрилової кислоти обмежується зниженням величини рН культурального середовища, що не сумісно з підтримкою життєдіяльності досліджуваних клітин.*

---

*Ключові слова: гідрогель, стовбурові клітини, іммобілізація, живильне середовище.*

---

**Вступ.** Розробка біотехнологій на основі клітинних препаратів у трансплантології потребує використання біосумісних полімерних матриксів і носіїв, придатних для іммобілізації і культивування стовбурових та спеціалізованих клітин *in vitro* [1].

В останні роки все ширше застосування в медицині і промисловості знаходять кополімерні гідрогелі — поперечно зшиті гідрофільні полімери з тривимірною структурою. Залежно від хімічної природи мономерів, використаних при їхньому синтезі (насамперед, від гідрофільності, полярності і присутності іоногенних груп), фізико-хімічні параметри одержаних гідрогелів можна цілеспрямовано змінювати в широкому діапазоні. На основі різноманітних гідрогелів отримано м'які контактні лінзи з покращеним живленням рогівки ока киснем, антиглаукомні очні плівки з пролонгованим вивіль-

ненням гіпотензивних речовин, щільні живильні середовища для культивування мікроорганізмів, протиопіковий матеріал, який поєднує ефективно поглинання ексудату з пролонгованим вивільненням широкого спектра хіміотерапевтичних засобів тощо [2—6].

Полімерні гідрогелі використовують для іммобілізації мікроорганізмів і клітин. Продемонстровано, що при іммобілізації дріжджових клітин на гідрогелевому носії ефективність продукування клітинами етанолу у 3,5 рази вища порівняно з вільними клітинами [7]. Композитний матеріал на основі кополімерного гідрогелю та клітин — попередників тканин використовують для створення нової кісткової і хрящової тканини при відновлювальній і реконструктивній хірургії [8]. Акриловий латекс з іммобілізованими клітинами *Escherichia coli* запропоновано застосовувати як біокатализатор [9].

Поліакриламідному гелю притаманні висока гідрофільність і біологічна толерантність, що поряд з іншими експлуатаційними характеристиками робить його придатним для іммобілізації клітин і мікроорганізмів. Проте у нього є й низка недоліків, серед яких недостатня механічна міцність і відсутність іоногенних груп, що сприяли б іммобілізації клітин на його поверхні. Для пошуку оптимального для культивування клітин складу гідрогелевої матриці синтезовано велику кількість кополімерних гідрогелів на основі акрилових мономерів.

**Матеріали і методи.** Гідрогелі отримували методом радикальної кополімеризації у водному середовищі за кімнатної температури.

Процес гелеутворення індукували, використовуючи окиснювально-відновлювальну систему персульфат калію—метабісульфат натрію. Всього синтезовано 17 гідрогелів різного складу. Варіювали співвідношення мономерів — акриламід, акрилонітрилу та акрилової кислоти у діапазоні від гомополіакриламідного гелю до кополімерних гідрогелів з 50 %-м вмістом кополімерів. Сумарний вміст мономерів у гідрогелях складав від 20 до 50 %. Зшивання з утворенням просторової сітки забезпечували за допомогою біфункціонального мономера — N,N'-метилен-біс-акриламід. Концентрацію зшивального агента варіювали в діапазоні концентрації від 0,188 до 0,75 %.

Гідрогелеві зразки досліджуваної композиції заливали у спеціальні шаблони, витримували протягом 1 год, після чого їх рознімали. Зразки занурювали у значний об'єм дистильованої води для відмивання залишків компонентів суміші, які не прореагували, і витримували протягом 10 діб за температури 65 °С.

Для тестування гідрогелевих мембран як носіїв клітин досліджуваної лінії спочатку поверхню чашок Петрі вкривали зразками мембран і заливали їх культуральним середовищем не менш ніж на 5—6 год для набухання гідрогелів. Видаляли надлишок середовища і наносили клітинну суспензію ( $10^5$  клітин у 2 мл культурального середовища). Зразки клітинних суспензій готували на основі мезенхімальних стовбурових клітин лінії 4BL2, одержаної нами раніше з периферійної донорської крові. Моношар клітин обробляли розчином трипсину і версену. Стандартну методику культивування клітин описано нами в [10]. Клітини 4BL2 культивували *in vitro* в стандартному середовищі DMEM («Sigma», США) з додаванням 5 % сироват-

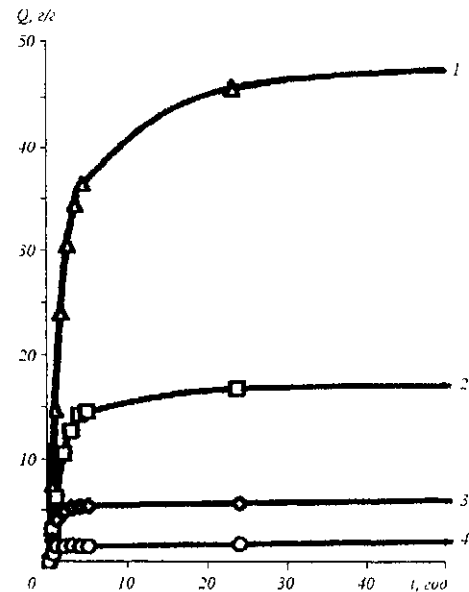


Рис. 1. Кінетика набухання гідрогелів різного складу в дистильованій воді за температури 20 °С: 1 — гідрогелевий кополімер акриламід і акрилової кислоти (АК); 2 — гідрогель на основі поліакриламід; 3 — гідрогелевий кополімер АК і акрилонітрилу (АН); 4 — гідрогелевий кополімер АА і АН

ки новонароджених телят («Sigma») та антибіотиків пеніциліну і стрептоміцину (по 100 од/мл). Звичайно клітини культивували з формуванням моношару на поверхні скляних флаконів або чашок Петрі («Anumbra», Чехія) діаметром 35 мм.

У контролі клітини висівали на скляну поверхню стандартних чашок Петрі. Далі спостереження за клітинами проводили під інвертованим мікроскопом кожного дня протягом тижня. При цьому оцінювали здатність клітин до іммобілізації на досліджуваних гідрогелевих мембранах, адгезивні властивості, можливості росту і розмноження та морфологію.

**Результати і обговорення.** Однією з фундаментальних характеристик гідрогелів, яка визначає можливість насичення їх живильним середовищем для культивування клітин і мікроорганізмів, є сорбційна здатність відносно водних розчинів.

Набухання зразків  $Q$  обраховували за формулою

$$Q = \frac{m_2 - m_1}{m_1}, \quad (1)$$

де  $m_1$  — маса сухого зразка;  $m_2$  — маса набухлого зразка.

Кінетику набухання синтезованих гідрогелів у дистильованій воді показано на рис. 1. Експеримен-

## Розрахункові параметри математичної моделі гідрогелів

№ гелю	$Q_{\max}$	$a$	$1/\tau$	$t_0$
1	47,5	0,68	0,234	1
2	16,5	0,58	0,434	1
3	5,5	0,38	0,984	1
4	1,5	0,99	4,0	0

Примітка. Цифри на рис. 1 біля кожної теоретично розрахованої кривої відповідають номерам гелю, наведеним у таблиці.



Рис. 2. Зовнішній вигляд гідрогелевих мембран після набухання у культуральному середовищі ДМЕМ

тальні дані представлені точками-маркерами. Як видно з наведених результатів, кінетичні залежності мають вигляд кривих насичення і можуть бути представлені математичною моделлю у вигляді

$$Q = Q_{\max}(T, C, G, M) \cdot (1 - a \cdot \exp(-\frac{t-t_0}{\tau})), \quad (2)$$

де  $Q_{\max}$  — максимально можливе набухання за даних умов у певному середовищі, зумовлене складом і властивостями гелю;  $T, C, G, M$  — узагальнене позначення параметрів умов, складу гелю та ін.;  $a, t_0$  і  $\tau$  — параметри, які характеризують процес насичення;  $t$  — час.

Відхилення експериментальних даних від теоретично розрахованих за наведеною формулою визначали методом найменших квадратів. Його величина не перевищувала 5 % від максимального значення. Коефіцієнти рівняння (2) представлено в таблиці.

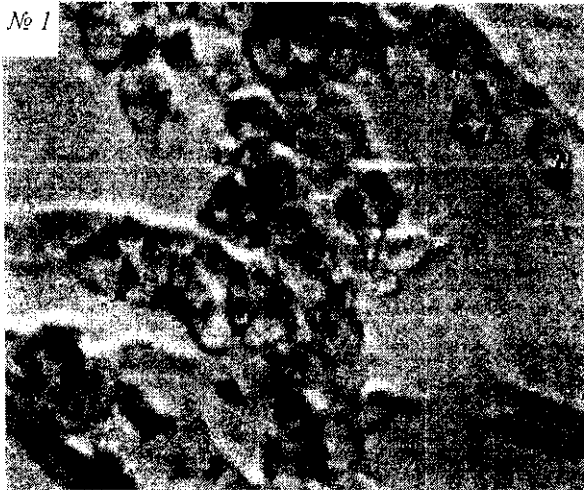
Очевидно, що гель № 1 здатний більше поглинати розчинник ( $Q_{\max}$ ), але з меншою швидкістю ( $1/\tau$ ), тоді як гель № 4 поглинає менше рідини, але з більшою швидкістю. Основна частина розчинника, у якому відбувається набухання гідрогелів, сорбується протягом 5–6 год.

Набухання  $Q_{\max}$  зменшується із зростанням в гідрогелях концентрації зшивального агента. Заміщення в поліакриламідному гелі акриламідних ланок на акрилонітрильні також знижує набухання гідрогелів. Залежність набухання від вмісту ланок акрилової кислоти має складніший характер, причому максимальне набухання притаманне гідрогелю з 25 %-м вмістом акрилової кислоти.

Механічна міцність гідрогелів збільшується відповідно до заміщення в поліакриламідному гелі акриламідних ланок на ланки акрилової кислоти і особливо на гідрофобні акрилонітрильні ланки. Однак, незважаючи на покращення механічних характеристик кополімерних гідрогелів з високим вмістом акрилонітрилу, через значну гетерогенність вони втрачають прозорість, що ускладнює їхнє використання для культивування і контролю росту на них клітин і мікроорганізмів. Гідрогелі із значним вмістом акрилової кислоти виявилися непридатними для підтримання життєдіяльності клітин через притаманну їм кислу реакцію, що призводило до різкої зміни величини рН культурального середовища.

Зовнішній вигляд гідрогелевих мембран після їхнього набухання у культуральному середовищі ДМЕМ наведено на рис. 2.

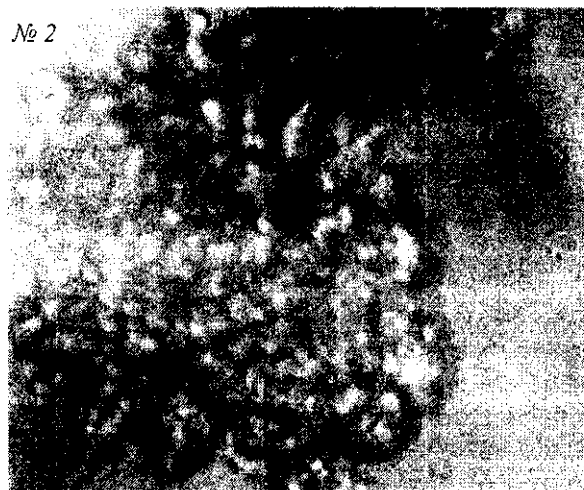
№ 1



№ 4



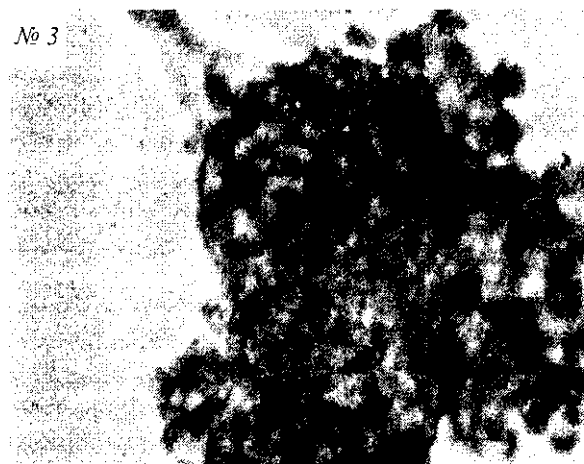
№ 2



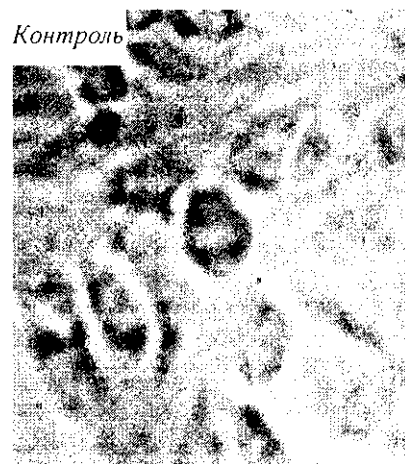
№ 5



№ 3



Контроль



Для визначення сумісності клітин з одержаними гідрогелевими мембранами досліджували можливість прикріплення і розпластування клітин на нових субстратах під інвертованим мікроскопом. Здатність до росту і розмноження клітин за цих умов визначали після їхнього кількадечного підросування *in vitro*. Через добу після висіву клітин на гідрогелеві мембрани на основі акриламід у більшості зразків спостерігали прикріплення клітин до їхньої поверхні, часткове розпластування, а також агрегацію клітин у конгломерати різної величини з подальшим відкріпленням їх від субстрату і переходом до суспензійного стану (рис. 3, № 1, 3—5). Міцність прикріплення клітин перевіряли, механічно перемішуючи мембрани з іммобілізованими клітинами безпосередньо у середовищі. Найвиразніше розпластування клітин у процесі культивування виявили при використанні мембрани з найбільшим вмістом зшитого полімеру в гелі і максимальною частотою зшивання (рис. 3, № 2). Картина розпластування клітин на субстраті у цьому варіанті наближається до вигляду моношарових клітин на скляній поверхні стандартних флаконів у контролі (рис. 3, контроль).

Характеристика міжклітинних взаємодій і взаємодій клітин із субстратом при іммобілізації клітин на гідрогелевих мембранах є важливою якісною оцінкою біосумісності досліджуваних об'єктів. Якщо склад гідрогелевої мембрани несумісний з проявом адгезивних властивостей клітин, то в процесі життєдіяльності клітини намагаються уникнути контакту з основою, в першу чергу, зменшити площу контакту з нею, що призводить до формування клітинних агрегатів. Із зменшенням сил зчеплення клітинні агрегати відокремлюються від основи і переходять до стану суспензії. І, навпаки, коли склад гідрогелю сумісний з проявом адгезивних властивостей клітин, то вони розпластуються на субстраті і розмножуються, як і в умовах контролю.

**Висновки.** Таким чином, кополімерні гідрогелі на основі мономерів акрилового ряду можна характеризувати набором параметрів, визначення яких спрощує процес їхнього отримання і встановлення сумісності з іммобілізованими клітинами. Гідрогелеві мембрани придатні для використання не лише при іммобілізації мікроорганізмів, але і клітин вищих еукаріотів, що показано нами на прикладі стовбурових клітин людини. Вірогідно, що при відповідній модифікації структури гідрогелевих

мембран їх можна буде довго зберігати за рахунок кріоконсервування.

Оцінка стану культивованих клітин дозволила встановити, що оптимальні експлуатаційні параметри, з точки зору збереження життєздатності, іммобілізації та адгезії клітин на поверхні мембран, притаманні висококонцентрованим гідрогелям на основі акриламід. Використання гідрогелів із значним вмістом акрилової кислоти обмежене зниженням рН культурального середовища, що несумісно з підтриманням життєдіяльності досліджуваних клітин. У наступному повідомленні будуть представлені дані із визначення технологічних умов, необхідних для ефективнішого і довготривалішого культивування клітин на поверхні гідрогелевих мембран з покращеними експлуатаційними властивостями.

*O. O. Kosenko, L. L. Lukash, U. M. Samchenko, T. A. Ruban, Z. R. Ulberg, S. I. Lukash*

Copolymeric hydrogel membranes for immobilization and cultivation of human stem cells

#### Summary

*A number of hydrogel membranes for stem cells cultivation has been synthesized on the basis of acrylamide, acrylonitrile, and acrylic acid by the method of radical copolymerization. The comparison has shown that the optimal parameters, determined by the immobilization of human mesenchymal stem cells, are inherent to nonionic copolymer hydrogels on acrylamide and acrylonitrile bases. The use of hydrogel with considerable acrylic acid content is limited by pH decrease in cultivation medium, which is incompatible with life activity maintenance of the cells under investigation.*

*Key words: hydrogel, stem cells, immobilization, cultivation medium.*

*O. O. Косенко, Л. Л. Лукаш, Ю. М. Самченко, Т. А. Рубан, З. Р. Ульберг, С. И. Лукаш*

Кополімерные гидрогелевые мембраны для иммобилизации и культивирования стволовых клеток человека

#### Резюме

*На основе акриламида, акрилонитрила и акриловой кислоты методом радикальной кополимеризации синтезированы гидрогелевые мембраны для культивирования стволовых клеток. В результате сравнительных исследований установлено, что оптимальные параметры, определенные иммобилизацией мезенхимальных стволовых клеток человека, присущи неионогенным кополимерным гидрогелям на основе акриламида и акрилонитрила. Использование гидрогелей со значительным содержанием акриловой кислоты ограничено снижением величины рН культуральной среды, что несовместимо с поддержанием жизнедеятельности исследуемых клеток.*

*Ключевые слова: гидрогель, стволовые клетки, иммобилизация, питательная среда.*

## ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Лукаш Л. Л., Василовская С. В. Стволовые клетки млекопитающих *in vitro* как основа для создания современных биотехнологий // Биополимеры и клетка.—2001.—17, № 3.—С. 203—211.
2. Burczak K., Camian E., Kochman A. Long-term *in vivo* performance and biocompatibility of poly (vinyl alcohol) hydrogel macrocapsules for hybrid-type artificial pancreas // Biomaterials.—1996.—17.—P. 2351—2356.
3. Rosiak J., Burczak K., Pekala W. Polyacrylamide hydrogels as sustained release drug delivery dressing materials // Radiat. Phys. Chem.—1983.—22.—P. 907—915.
4. Филиппова О. Е. «Восприимчивые» полимерные гели // Высокомолекуляр. соединения.—2000.—42, № 12.—С. 2328—2352.
5. Chen J., Park K. Superporous hydrogels: fast responsive hydrogel systems // J. Macromol. Sci.-Pure and Appl. Chem.—1999.—36.—P. 917—930.
6. Самченко Ю. М., Ульберг З. Р., Комарський С. А. Кополімерні гідрогелі медичного призначення — наукові основи розробки лікарських препаратів.—Харків: Основа, 1998.—С. 159—177.
7. Lu Zhaoxin, Fujimura T. Immobilization of yeast cells with ionic hydrogel carriers by adhesion- multiplication // J. Agr. and Food Chem.—2000.—48.—P. 5929—5932.
8. Pat. USA N 6171610. Guided development and support of hydrogel-cell compositions / C. Vacanti, J. Vacanti, M. Vacanti // Publ.
9. Venkata S. Thiagarajan, Zhisong Huang, L. E. Scriven, Janet L. Schottel, Michael C. Flickinger. Microstructure of a biocatalytic latex coating containing viable Escherichia coli cells // J. Colloid and Interface Sci.—1999.—N 215—P. 244—257.
10. Бужиевская Т. И., Лукаш Л. Л., Подольская С. В. Экспериментальные модели для изучения мутагенеза и трансформации, индуцированных вирусами и нуклеиновыми кислотами // Методы молекуляр. биологии.—Киев: Наук. думка, 1986.—С. 147—158.

УДК 541.182.644

Надійшла до редакції 28.07.05