

ХИМИЯ
CHEMISTRY

УДК 544.723.2.023.2+577.3.085

Поступило в редакцию 23.12.2016

Received 23.12.2016

**В. И. Куликовская¹, К. С. Гилевская¹, С. В. Пинчук², А. Н. Красковский¹, И. Б. Василевич²,
К. А. Матиевский², академик В. Е. Агабеков¹, академик И. Д. Волотовский²**

*¹Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

*²Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

**БИОПОЛИМЕРНЫЕ МУЛЬТИСЛОЙНЫЕ ПЛЕНКИ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЕЙ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Получены мультислойные пленки: (хитозан/декстран)_n, (хитозан/пектин)_n, (хитозан/карбоксиметилцеллюлоза)_n, (полиэтиленимин/декстран)_n, (полиэтиленимин/пектин)_n, (полиэтиленимин/карбоксиметилцеллюлоза)_n ($n = 4; 4,5$) с толщиной от 8,5 до 396,3 нм. Установлена взаимосвязь между физико-химическими характеристиками пленок и адгезией на них мезенхимальных стволовых клеток. Показано, что мезенхимальные стволовые клетки эффективно адгезируют на вязкоэластичных бездефектных ультратонких мультислойных хитозан-содержащих пленках и формируют на их поверхности монослойную культуру фибробластоподобных клеток с высокой жизнеспособностью.

Ключевые слова: полисахариды, мультислойные пленки, мезенхимальные стволовые клетки, адгезия, атомно-силовая микроскопия, фазово-контрастная микроскопия, флуоресцентная микроскопия

**Viktoryia I. Kulikouskaya¹, Kseniya S. Hileuskaya¹, Sergei V. Pinchuk², Aliaksandr N. Kraskouski¹,
Irina B. Vasilevich², Kirill A. Matievski², Academician Vladimir E. Agabekov¹, Academician Igor D. Volotovskii²**

¹Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Institute Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

BIOPOLYMER MULTILAYER FILMS AS SUBSTRATES FOR MESENCHYMAL STEM CELLS

Multilayer films (chitosan/dextran)_n, (chitosan/pectin)_n, (chitosan/carboxymethylcellulose)_n, (polyethyleneimine/dextran)_n, (polyethyleneimine/pectin)_n, (polyethyleneimine/carboxymethylcellulose)_n ($n = 4; 4.5$) with a thickness of 8.5 to 396.3 nm have been obtained. The relationship between the physicochemical characteristics of the films and the adhesion of mesenchymal stem cells to them has been determined. It has been shown that the mesenchymal stem cells effectively adhere to defect-free ultrathin multilayer viscoelastic chitosan-containing films and form on their surface a monolayer culture of fibroblast-like cells with high viability.

Keywords: polysaccharides, multilayer films, mesenchymal stem cells, adhesion, atomic force microscopy, phase contrast microscopy, fluorescence microscopy

Введение. В последние годы к наиболее бурно прогрессирующим направлениям относится регенеративная медицина. В значительной мере это обусловлено успехами в области восстановления патологически измененных тканей и органов с помощью трансплантированных в организм разнообразных, в том числе мезенхимальных стволовых клеток (МСК). На практике используют два основных приема трансплантации МСК:

1) введение в организм (внутривенно или внутрь органов) суспензии исходных или соответственно дифференцированных стволовых клеток;

2) введение в организм композитов (носитель-скаффолд + стволовая клетка, исходная или дифференцированная).

Использование носителей получило в последние годы широкое распространение, что послужило основанием для выделения внутри регенеративной медицины особого направления «биоматериалы – тканеинженерные конструкции». Оказалось, что в составе композита мезенхимальные стволовые клетки, с одной стороны, лучше делятся и, с другой – более активно выполняют свойственную им паракринную функцию. Кроме того, введенные в организм в составе тканеинженерной конструкции стволовые клетки менее подвержены миграции, обеспечивая этим усиление терапевтического действия в месте приложения вследствие пролонгированного влияния на прилегающие ткани [1–3].

Цель работы – создание биосовместимых носителей, к которым МСК проявляют высокую адгезию без потери своих функциональных свойств.

Материалы и методы исследования. В качестве биосовместимых носителей МСК использовали мультислойные пленки, которые получали методом послойного осаждения полиэлектролитов путем чередующейся адсорбции поликатионов (хитозана (Хит) или полиэтиленimina (ПЭИ)) и полианионов (пектина цитрусового (Пект), сульфатированного декстрана (Декст), карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ)), из их водных растворов с концентрацией 1,0–2,0 мг/мл на поверхность гидрофильного кремния (1×1 см) или стекла ($2,5 \times 1,5$ см) [4]. Морфологию поверхности полиэлектролитных пленок изучали атомно-силовой микроскопией (АСМ) в контактном режиме на сканирующем зондовом микроскопе MultiMode III (Veeco, USA). Шероховатость (Rms) поверхности пленок рассчитывали по АСМ-данным. Закономерности формирования мультислойных пленок изучали методом кварцевого микровзвешивания в жидкостной проточной ячейке на QCM-200 (Stanford Research Systems, USA). Для определения массы пленки использовали уравнение Сауэрбрея (Sauerbrey), при расчете толщины слоев h плотность материала пленок принимали равной $1,3 \pm 0,1$ г/см³ [4].

Обработку пленок стерилизующими агентами (1,5 мл 3 %-ного раствора H₂O₂ или 70 %-ного водного раствора C₂H₅OH) проводили в ламинарном боксе в чашках Петри в течение 3 или 24 ч. После инкубации пленки промывали стерильным фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Для определения микробиологической чистоты их помещали в чашки Петри, содержащие 3 мл ростовой среды, инкубировали в течение 3 или 6 суток при 37 °С, затем отбирали 1,5 мл ростовой среды и доводили ее объем до 4 мл стерильным ФСБ. Далее отбирали аликвоты 2 мл во флаконы для последующей детекции в образцах аэробных или анаэробных микроорганизмов. Флаконы помещались в микробиологический анализатор BacT/ALERT 3D 60 (bioMérieux, Франция), длительность анализа составляла 7 суток.

Для выделения МСК проводилась ферментативная обработка гомогената жировой ткани крысы линии Вистар в 0,1 %-ном растворе коллагеназы при постоянном перемешивании в течение 30 мин при 37 °С. Затем клеточную суспензию фильтровали через капроновый фильтр (100 мкм), центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об/мин, удаляли супернатант, осадок заливали ростовой средой (ДМЕМ или альфа-МЕМ, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 0,01 мл базового раствора комплексного антибиотика-антимикотика). Клетки высевали в количестве $8 \cdot 10^4$ кл/мл на адгезионные пластиковые чашки Петри (Sarstedt, Германия). Культивирование клеток проводили в CO₂-инкубаторе при 37 °С во влажной атмосфере при постоянном давлении 5 % CO₂. Полную смену ростовой среды проводили каждые 72 ч. МСК крыс пассировали через 10–14 дней. Для этого монослой МСК промывали фосфатным буфером (pH 7,2) и обрабатывали раствором трипсин-ЭДТА (0,02–0,25 %) в течение 3 мин при 37 °С. Для исследования адгезии МСК на мультислойных пленках использовались клетки 2–3 пассажей. Анализ иммунофенотипа МСК, проведенный с помощью проточного цитофлуориметра (FACSCanto II, Becton Dickinson, США), показал, что клетки культуры экспрессируют маркеры CD90 (>95 %), CD105 (>99 %), CD29 (>85 %) и CD44 (>95 %), типичные для МСК, в то время как экспрессия маркеров гемопоэтических клеток была незначительна: CD34 (<3 %), CD45 (<2 %). Эти данные свидетельствовали о высокой гомогенности культуры МСК и крайне низком содержании иных клеток.

В качестве носителей МСК использовали 4-бислойные пленки, содержащие в качестве поликатиона хитозан или полиэтиленimin, а в качестве полианиона – пектин цитрусовый, сульфати-

рованный декстран или карбоксиметилцеллюлозу: (Хит/Декст)₄, (Хит/Пект)₄, (Хит/КМЦ)₄, (ПЭИ/Декст)₄, (ПЭИ/Пект)₄, (ПЭИ/КМЦ)₄, (Хит/Декст)₄/Хит, (Хит/Пект)₄/Хит, (Хит/КМЦ)₄/Хит, (ПЭИ/Декст)₄/ПЭИ, (ПЭИ/Пект)₄/ПЭИ, (ПЭИ/КМЦ)₄/ПЭИ. Предварительно пленки обрабатывали стерилизующим раствором, промывали ФСБ и высушивали при 37 °С. Далее пленки помещали в чашки Петри, наносили 0,1 мл суспензии МСК (10⁴ клеток) в ростовой среде и инкубировали в термостате при 37 °С в течение 3 ч. После этого в каждую чашку Петри добавляли 2 мл ростовой среды и далее культивировали при 37 °С во влажной воздушной атмосфере при 5 % CO₂. После 5 суток культивирования ростовую среду удаляли, в чашки добавляли 2 мл ФСБ и анализировали морфологию клеточной культуры методом световой фазово-контрастной микроскопии. В качестве контроля МСК культивировали на пластиковой поверхности чашки Петри для адгезионных культур.

Микроскопию МСК в режиме флуоресценции после культивирования клеток на носителях проводили на инвертированном микроскопе Olympus IX71, используя флуоресцентный фильтр-куб для зеленой и красной областей с параметрами возбуждения флуоресценции 420–495 и 520–560 нм и ее регистрации при 505–560 и 620–720 нм соответственно. Пленки с МСК помещали в чашки Петри, содержащие 2 мл ФСБ, добавляли флуоресцентные красители (0,5 мкг/мл флуоресцеиндиацетата (ФДА) и 5 мкг/мл пропидиумиодида), инкубировали 10 мин в темноте при комнатной температуре. Флуоресценцию регистрировали цифровой камерой DP72. Полученные изображения анализировали с помощью программного обеспечения Cell F (Olympus, Япония).

Результаты и их обсуждение. Известно, что эффективность адгезии и функционирование животных клеток на полиэлектролитных мультислойных пленках зависят от толщины, вязкоэластичности, смачиваемости, шероховатости и заряда поверхности последних [5–8]. Сформированные 4-бислойные пленки имеют толщину от 8,5 до 396,3 нм, причем на основе хитозана формировались значительно более тонкие мультислои по сравнению с полиэтиленимином (таблица).

Характеристики мультислойных пленок
Characteristics of multilayer films

Показатель Index	(Хит/Пект) ₄ (chitosan/pectin) ₄	(Хит/Декст) ₄ (chitosan/dextran) ₄	(Хит/КМЦ) ₄ (chitosan/ carboxymethyl cellulose) ₄	(ПЭИ/Пект) ₄ (polyethyleneimine/ pectin) ₄	(ПЭИ/Декст) ₄ (polyethyleneimine/ dextran) ₄	(ПЭИ/КМЦ) ₄ (polyethyleneimine/ carboxymethyl cellulose) ₄
<i>h</i> , нм	32,1 ± 1,4	8,5 ± 1,7	18,3 ± 0,7	396,3 ± 62,5	26,1 ± 2,7	78,3 ± 12,0
Rms _{исходная} , нм	2,6 ± 0,9	1,5 ± 0,8	1,9 ± 0,4	19,8 ± 9,3	9,8 ± 0,6	4,8 ± 1,5
Rms _{EtOH} , нм	1,8 ± 0,4	1,7 ± 0,9	1,3 ± 0,4	15,3 ± 5,0	3,3 ± 0,4	5,9 ± 0,5
Rms _{H2O2} , нм	2,0 ± 1,2	1,2 ± 0,7	1,1 ± 0,2	17,4 ± 5,2	3,5 ± 1,0	6,7 ± 5,0
Rms _{р.ср.} , нм	2,5 ± 0,4	3,1 ± 0,3	3,9 ± 0,8	15,7 ± 3,9	11,6 ± 1,0	2,1 ± 0,3

Примечания: Rms_{исходная}, Rms_{EtOH}, Rms_{H2O2}, Rms_{р.ср.} – шероховатость поверхности исходных пленок и пленок, выдержанных в 70 %-ном этиловом спирте (24 ч), 3 % H₂O₂ (3 ч) и ростовой среде (3 суток) соответственно.

Note: Rms_{исходная}, Rms_{EtOH}, Rms_{H2O2}, Rms_{р.ср.} – are the surface roughness of the initial films and the films maintained in 70 % ethyl alcohol (24 hours), 3 % H₂O₂ (3 hours) and in the growing medium (3 days) respectively.

Для сформированных мультислойных покрытий характерна зернистая структура поверхности с выпуклостями овальной формы (рис. 1). Пленки на основе хитозана (рис. 1, *a–c*) являются более гладкими и однородными по сравнению с ПЭИ-содержащими (рис. 1, *d–f*). Так, значение Rms для пленок, при формировании которых в качестве поликатиона использовали ПЭИ, было в 3–8 раз больше, чем для покрытий, для которых использовали хитозан (таблица). Мультислойные хитозан-содержащие пленки имеют однородную бездефектную поверхность вне зависимости от входящего в их состав полианиона (рис. 1, *a–c*), в то время как морфология мультислоев на основе полиэтиленимиона существенно зависит от полианиона. Ультратонкие (26,1 нм) покрытия на основе полиэтиленимиона и декстрана достаточно однородны и имеют зернистую структуру (рис. 1, *d*). Более толстые (78,3 нм) пленки (ПЭИ/КМЦ)₄ обладают рыхлой структурой

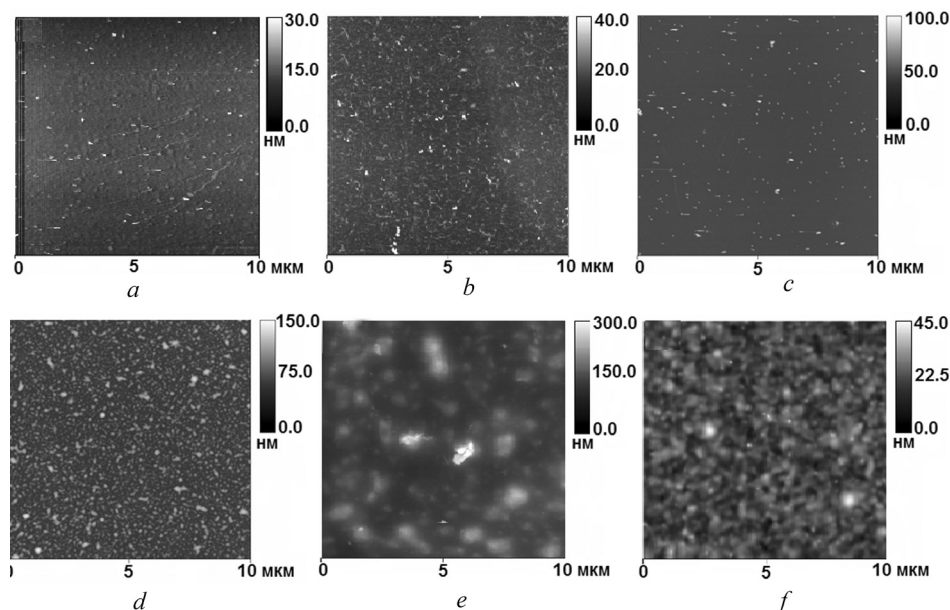


Рис. 1. АСМ-изображения пленок (Хит/Декст)₄ (a), (Хит/Пект)₄ (b), (Хит/КМЦ)₄ (c), (ПЭИ/Декст)₄ (d), (ПЭИ/Пект)₄ (e), (ПЭИ/КМЦ)₄ (f)

Fig. 1. Atomic-force microscopy of the images of the films (chitosan/dextran)₄ (a), (chitosan/pectin)₄ (b), (chitosan/carboxymethylcellulose)₄ (c), (polyethyleneimine/dextran)₄ (d), (polyethyleneimine/pectin)₄ (e), (polyethyleneimine/carboxymethylcellulose)₄ (f)

(рис. 1, f). Мультислои (ПЭИ/Пект)₄ характеризуются зернистой морфологией поверхности с размерами агрегатов ~1,0–2,0 мкм и перепадом по высоте ~75,0 нм (рис. 1, e). Мультислоистые пленки, содержащие хитозан, проявляют более вязкие свойства по сравнению с покрытиями на основе полиэтиленимина. Эластичность пленок увеличивается в ряду (Хит/КМЦ)₄ < (Хит/Пект)₄ < (Хит/Декст)₄ < (ПЭИ/Пект)₄ < (ПЭИ/Декст)₄ < (ПЭИ/КМЦ)₄ [9].

Стерильность пленок, используемых в качестве матрицы для фиксации МСК, является необходимым условием для культивирования клеток. В лабораторных условиях и мелкосерийном производстве предпочтительно применять методы обеззараживания на основе дезинфицирующих растворов. После обработки пленок (Хит/Декст)₄, (Хит/Пект)₄, (Хит/КМЦ)₄, (ПЭИ/Декст)₄, (ПЭИ/Пект)₄, (ПЭИ/КМЦ)₄, (Хит/Декст)₄/Хит, (Хит/Пект)₄/Хит, (Хит/КМЦ)₄/Хит, (ПЭИ/Декст)₄/ПЭИ, (ПЭИ/Пект)₄/ПЭИ, (ПЭИ/КМЦ)₄/ПЭИ в течение 24 ч стерилизующими агентами (3 %-ным раствором H₂O₂ или 70 %-ным этанолом) бактериальной микрофлоры в ростовой среде через 7 суток не обнаружено. Результаты тестов свидетельствуют об отсутствии бактерий, способных развиваться в условиях, благоприятных для активной пролиферации МСК. Эффективная стерилизация носителей также возможна и при сокращении времени обработки стерилизующими растворами до 3 ч. С помощью атомно-силовой микроскопии показано, что после выдерживания пленок в дезинфицирующих растворах (70 % C₂H₅ОН или 3 % H₂O₂), а также в ростовой среде целостность покрытий не нарушается, сохраняется их однородность, шероховатость поверхности практически не меняется (таблица), либо происходит сглаживание рельефа. Следовательно, такие носители можно использовать для культивирования МСК.

Результаты световой микроскопии через 3 суток после нанесения МСК на поверхность носителей свидетельствуют о том, что на пленках (Хит/КМЦ)₄, (Хит/Пект)₄ и (Хит/Декст)₄ образуется монослойная культура клеток (рис. 2, фазово-контрастная микроскопия). Клетки имеют размер и фибробластоподобную морфологию, соответствующую МСК, культивированным на поверхности чашки Петри (рис. 2, фазово-контрастная микроскопия). Для установления влияния заряда пленки на адгезию МСК были сформированы пленки с верхним слоем поликатиона (хитозан). Показано, что на пленках (Хит/КМЦ)₄/Хит, (Хит/Пект)₄/Хит и (Хит/Декст)₄/Хит мезенхимальные стволовые клетки также формируют монослойную культуру клеток фибробластоподобной морфологии, как и на четырехслойных системах с верхним слоем отрицательно заряженных полисахаридов.

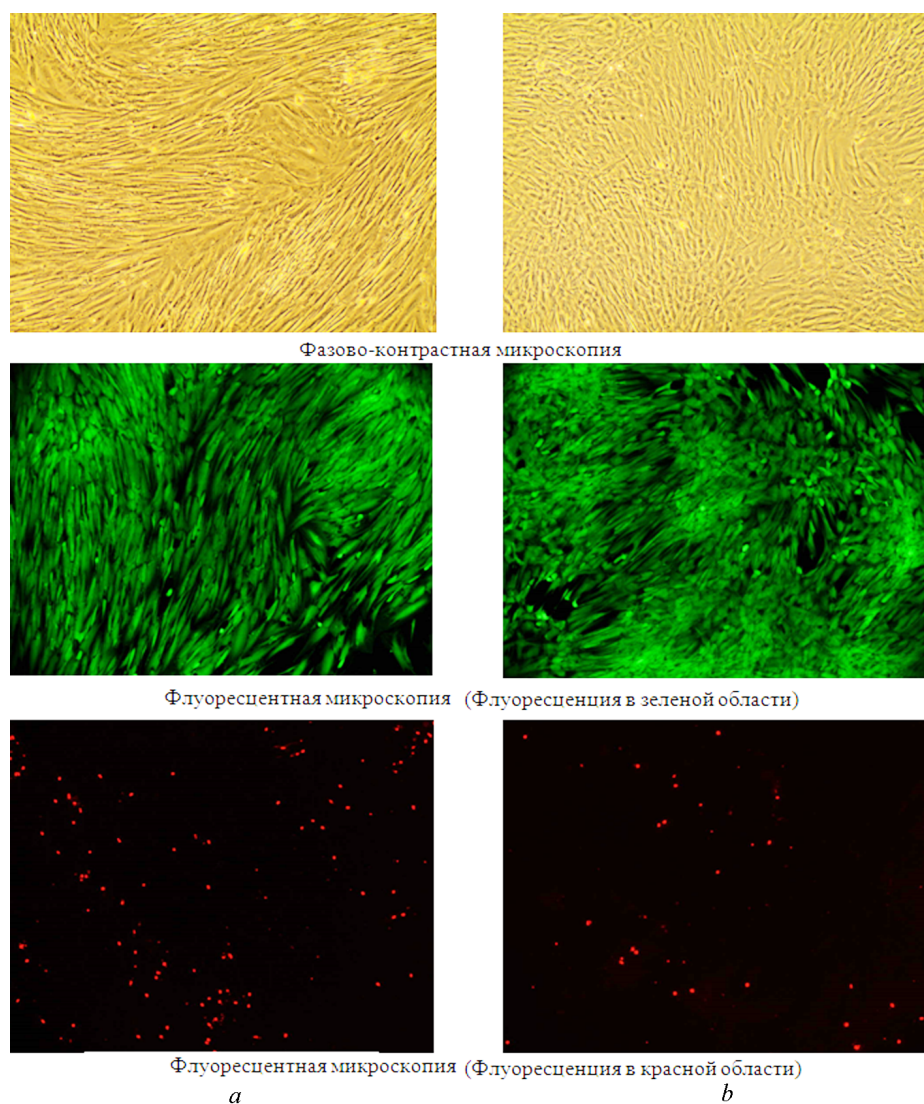


Рис. 2. Микрофотография культуры МСК через 3 суток после их нанесения на поверхность пластика культурального флакона (а) и пленку (Хит/Декст)₄ (b). Увеличение $\times 100$

Fig. 2. Microphotograph of the culture of mesenchymal stem cells in 3 days after applying the cells over the plastic surface of cultured vial (a) and film (chitosan/dextran)₄ (b). Magnification $\times 100$

В зависимости от типа полианионного компонента пленки на основе полиэтиленimina МСК либо не прикрепляются к пленке ((ПЭИ/Пект)₄), либо прикрепляются, но не распластаются ((ПЭИ/КМЦ)₄) (рис. 3, фазово-контрастная микроскопия). В случае пленки (ПЭИ/Декст)₄ регистрируются отдельные (до 2–3 %) **неполноценно распластанные (маленькие, мало отростков, отростки короткие и узкие) клетки**. В то же время на пленках, в которых верхний слой образован положительно заряженным полиэтиленимином ((ПЭИ/Декст)₄/ПЭИ, (ПЭИ/КМЦ)₄/ПЭИ и (ПЭИ/Пект)₄/ПЭИ), методом светлой микроскопии обнаруживаются отдельные маленькие колонии прикрепленных клеток, которые хоть и имеют фибробластоподобную форму, но характеризуются более узкими отростками и меньшим размером по сравнению с контролем (МСК, культивируемые на чашке Петри). Кроме того, на этих пленках в культурах МСК присутствует множество мелких, округлых клеток.

В клетках, культивируемых на пленках (Хит/КМЦ)₄, (Хит/Пект)₄, (Хит/Декст)₄, (Хит/КМЦ)₄/Хит, (Хит/Пект)₄/Хит и (Хит/Декст)₄/Хит, происходит активный гидролиз ФДА: регистрируется интенсивная флуоресценция клеток в зеленой области спектра (505–560 нм) (рис. 2, флуоресцентная микроскопия, зеленая область). Это указывает на высокую активность внутри-

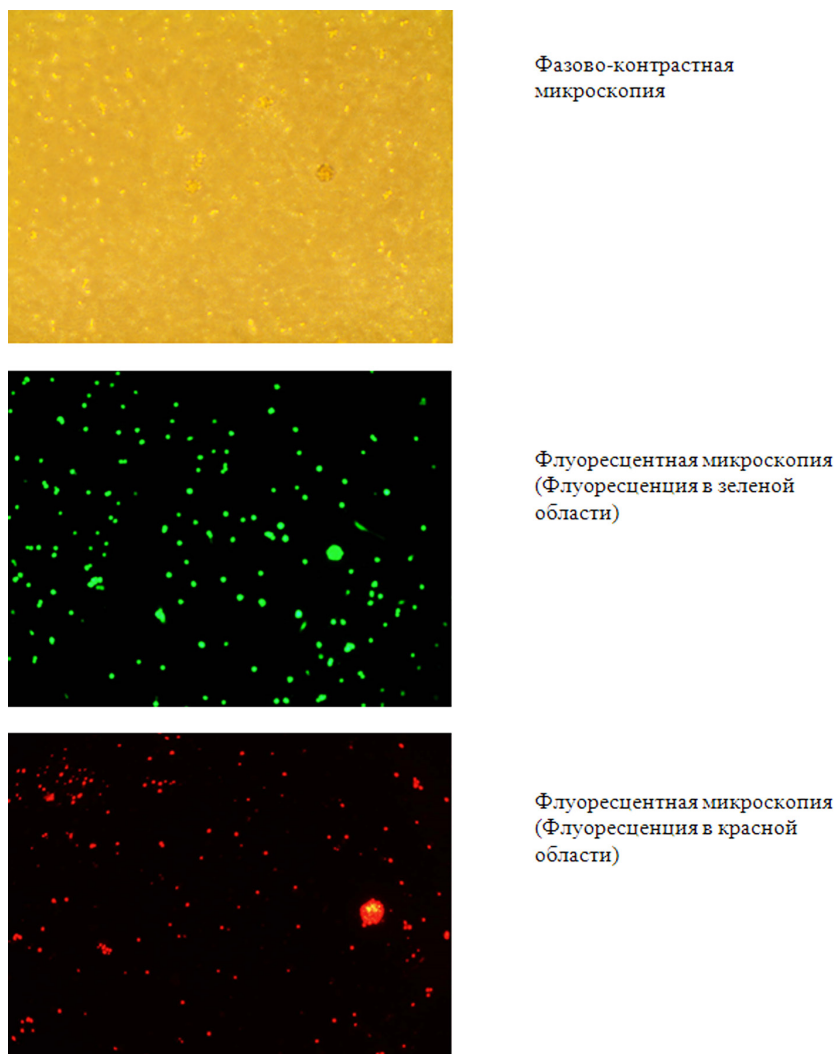


Рис. 3. Микрофотография культуры МСК через 3 суток после нанесения клеток на пленку (ПЭИ/КМЦ)₄. Увеличение $\times 100$

Fig. 3. Microphotograph of the culture of mesenchymal stem cells in 3 days after applying the cells over the film (polyethyleneimine/carboxymethyl cellulose)₄. Magnification $\times 100$

клеточных эстераз и свидетельствует о наличии в культуре преимущественно жизнеспособных клеток [10]. Поскольку флуоресцирующий продукт гидролиза ФДА равномерно распределяется в клеточной цитоплазме, то флуоресцентное изображение отражает реальную форму клеток. Флуоресцирующие клетки на носителях (Хит/КМЦ)₄, (Хит/Пект)₄, (Хит/Декст)₄, (Хит/КМЦ)₄/Хит, (Хит/Пект)₄/Хит и (Хит/Декст)₄/Хит имеют вытянутую по поверхности пленки фибробластоподобную морфологию, которая соответствует таковой для МСК, культивированных на чашке Петри (рис. 2, флуоресцентная микроскопия, зеленая область), и согласуется с данными фазово-контрастной спектроскопии. На пленках (ПЭИ/КМЦ)₄ и (ПЭИ/Декст)₄ зеленой флуоресценцией обладали единичные клетки, имеющие округлую форму и небольшой размер (рис. 3, флуоресцентная микроскопия, зеленая область). Вероятнее всего данная флуоресценция принадлежит МСК, находящимся, по-видимому, в предапоптотическом состоянии, поскольку признаком апоптоза – программируемой клеточной гибели, является конденсирование внутриклеточного содержимого и уменьшение размера клетки. На пленках (ПЭИ/Декст)₄/ПЭИ, (ПЭИ/КМЦ)₄/ПЭИ и (ПЭИ/Пект)₄/ПЭИ зеленую флуоресценцию проявляют как мелкие клетки, имеющие округлую форму, так и клетки, вытянутые по поверхности носителя, однако их количество по сравнению с пленками (Хит/КМЦ)₄, (Хит/Пект)₄, (Хит/Декст)₄, (Хит/КМЦ)₄/Хит, (Хит/Пект)₄/Хит, (Хит/Декст)₄/Хит и контролем было незначительным (<20 %).

При возбуждении излучением в области 520–580 нм и регистрацией в красной области (620–720 нм) фиксируется флуоресценция клеток, окрашенных пропидиум йодидом. Такой флуоресценцией обладают клетки в состоянии некроза, мембранные структуры которых проницаемы для пропидиум йодида, что приводит к проникновению красителя внутрь клеток, связыванию его с ДНК и появлению флуоресценции в виде небольшого пятна, ограниченного размерами ядра. В жизнеспособных клетках ДНК недоступно для пропидиум йодида и флуоресценция отсутствует [10]. На хитозан-содержащих мультислойных пленках клетки с флуоресценцией, характерной для некротических клеток, регистрируются в незначительном количестве (рис. 2, флуоресцентная микроскопия, красная область). Проведенный анализ показывает, что по отношению к количеству клеток, обладающих зеленой флуоресценцией (жизнеспособные), количество некротических клеток в них составляет 2–5 %. В контроле количество некротических клеток составляло около 5 %. Следует отметить, что монослой жизнеспособных МСК сохранялся на хитозан-содержащих пленках при культивировании в течение 7 суток.

На пленке (ПЭИ/Пект)₄ некротических клеток, как и жизнеспособных, не обнаружено. Это позволяет предполагать, что данный носитель в проведенной серии экспериментов проявляет либо токсическое действие на МСК, что привело к быстрой их гибели с последующим полным лизисом клеток и выходом внутриклеточного содержимого, либо препятствует адгезии. На (ПЭИ/КМЦ)₄ и (ПЭИ/Декст)₄ регистрируется наличие некротических клеток (рис. 3, флуоресцентная микроскопия, красная область). В данных образцах полного лизиса клеток не происходит и культура представлена МСК, находящимися в основном в состоянии некроза (60–80 %). Значительное количество некротических клеток (30–50 %) обнаруживается на пленках (ПЭИ/Декст)₄/ПЭИ, (ПЭИ/КМЦ)₄/ПЭИ и (ПЭИ/Пект)₄/ПЭИ.

Заключение. Таким образом, мезенхимальные стволовые клетки эффективно адгезируют на вязкоэластичных бездефектных ультратонких (<35 нм) мультислойных хитозан-содержащих пленках и формируют монослойную культуру фибробластоподобных клеток с высокой жизнеспособностью, при этом заряд поверхности не оказывает существенного влияния на их адгезию. К пленкам, сформированным на основе ПЭИ, МСК обладают крайне низкими адгезионными свойствами: визуализируются лишь отдельные жизнеспособные клетки и большое количество клеток, находящихся в состоянии некроза.

Благодарности. Авторы выражают благодарность младшему научному сотруднику Е. А. Грачевой за проведение АСМ-исследований пленок.

Acknowledgements. The authors acknowledge junior researcher E. A. Gracheva for the research films by atomic-force microscopy.

Список использованных источников

1. Entrapment of embryonic stem cells-derived cardiomyocytes in macroporous biodegradable microspheres: preparation and characterization / A. A. Akasha [et al.] // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2008. – Vol. 22, N 5–6. – P. 665–672. doi.org/10.1159/000185550
2. Богдан, В. Г. Выбор внеклеточной матрицы многокомпонентного биологического трансплантата с мезенхимальными стволовыми клетками из жировой ткани для пластики обширных дефектов передней брюшной стенки / В. Г. Богдан, М. М. Зафранская, Ю. М. Гаин // *Военная медицина.* – 2014. – № 1. – С. 88–93.
3. Клинические возможности применения аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани при лечении пациентов с трофическими язвами нижних конечностей / Е. В. Баранов [и др.] // *Клеточ. транспл. ткан. инж.* – 2013. – Т. VIII, № 2. – С. 79–84.
4. Hileuskaya, K. Formation and Properties of Protamine/Pectin LbL-Coatings / K. Hileuskaya, V. E. Agabekov // *Physics Procedia.* – 2013. – Vol. 40. – P. 84–92. doi.org/10.1016/j.phpro.2012.12.012
5. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification / C. Boura [et al.] // *Biomaterials.* – 2003. – Vol. 24, N 20. – P. 3521–3530. doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00214-x
6. Layer by Layer Buildup of Polysaccharide Films: Physical Chemistry and Cellular Adhesion Aspects / L. Richert [et al.] // *Langmuir.* – 2004. – Vol. 20. – P. 448–458. doi.org/10.1021/la035415n
7. Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films / P. Tryoen-Tóth [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2002. – Vol. 60, N 4. – P. 657–667. doi.org/10.1002/jbm.10110
8. Rigidity-patterned polyelectrolyte films to control myoblast cell adhesion and spatial organization / C. Monge [et al.] // *Adv. Funct. Mater.* – 2013. – Vol. 23, N 27. – P. 3432–3442. doi.org/10.1002/adfm.201203580
9. Marx, K. A. Quartz Crystal Microbalance: A Useful Tool for Studying Thin Polymer Films and Complex Biomolecular Systems at the Solution-Surface Interface / K. A. Marx // *Biomacromolecules.* – 2003. – Vol. 4, N 5. – P. 1099–1120. doi.org/10.1021/bm020116i

10. Estimation of cell survival by flow cytometric quantification of fluorescein diacetate/propidium iodide viable cell / D. R. Ross [et al.] // *Cancer Res.* – 1989. – Vol. 49, N 14. – P. 3776–3782.

References

1. Akasha A. A., Sotiriadou I., Doss M. X., Halbach M., Winkler J., Baunach J. J. S., Katsen-Globa A., Zimmermann H., Yen Choo, Hescheler J., Sachinidis A. Entrapment of embryonic stem cells-derived cardiomyocytes in macroporous biodegradable microspheres: preparation and characterization. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2008, vol. 22, no. 5–6, pp. 665–672. doi.org/10.1159/000185550
2. Bogdan V. G., Zafranskaya M. M., Gain Yu. M. Choice of the extracellular matrix of the multicomponent biological transplant with mesenchymal stem cells from the adipose tissue for plastic of extensive defects of the forward belly wall. *Voennaia meditsina* [Military medicine], 2014, no. 1, pp. 88–93 (in Russian).
3. Baranov E. V., Tretyak S. J., Vasilevich I. B., Lobanok E. S., Volotovskii I. D. The clinical application of autologous mesenchymal stem cells isolated from fat tissue for the treatment of patients with trophic ulcers of lower extremities. *Kletochnaia transplantologiya i tkanevaia inzheneriya* [Cellular Transplantation and Tissue Engineering], 2013, vol. VIII, no 2, pp. 79–84 (in Russian).
4. Hileuskaya K., Agabekov V. E. Formation and Properties of Protamine/Pectin LbL-Coatings. *Physics Procedia*, 2013, vol. 40, pp. 84–92. doi.org/10.1016/j.phpro.2012.12.012
5. Boura C., Menu P., Payan E., Picart C., Voegel J. C., Muller S., Stoltz J. F. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. *Biomaterials*, 2003, vol. 24, no. 20, pp. 3521–3530. doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00214-x
6. Richert L., Lavalley P., Payan E., Xiao Zheng Shu, Prestwich G. D., Stoltz J.-F., Schaaf P., Voegel J.-C., Picart C. Layer by Layer Buildup of Polysaccharide Films: Physical Chemistry and Cellular Adhesion Aspects. *Langmuir*, 2004, vol. 20, pp. 448–458. doi.org/10.1021/la035415n
7. Tryoen-Tóth P., Vautier D., Youssef H., Voegel J.-C., Schaaf P., Chluba J., Ogier J. Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, vol. 60, no. 4, pp. 657–667. doi.org/10.1002/jbm.10110
8. Monge C., Naresh S., Thomas B., Pózos-Vásquez C., Dulong V., Glinel K., Picart C. Rigidity-patterned polyelectrolyte films to control myoblast cell adhesion and spatial organization. *Advanced Functional Materials*, 2013, vol. 23, no. 27, pp. 3432–3442. doi.org/10.1002/adfm.201203580
9. Marx K. A. Quartz Crystal Microbalance: A Useful Tool for Studying Thin Polymer Films and Complex Biomolecular Systems at the Solution-Surface Interface. *Biomacromolecules*, 2003, vol. 4, no. 5, pp. 1099–1120. doi.org/10.1021/bm020116i
10. Ross D. R., Joneckis C. C., Ordonez J. V., Sisk A. M., Wu R. K., Hamburger A. W., Nora R. E. Estimation of cell survival by flow cytometric quantification of fluorescein diacetate/propidium iodide viable cell. *Cancer Research*, 1989, vol. 49, no. 14, pp. 3776–3782.

Информация об авторах

Куликовская Виктория Игоревна – канд. хим. наук, заведующая лабораторией. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kulikouskaya@gmail.com.

Гилевская Ксения Сергеевна – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: k_hilevskay@mail.ru.

Пинчук Сергей Владимирович – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: pinchuksv@mail.ru.

Красковский Александр Николаевич – мл. науч. сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: aleks.kraskovsky@gmail.com.

Василевич Ирина Борисовна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: irina-vasilevich@yandex.by.

Матиевский Кирилл Александрович – лаборант. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kirill.matievskiy@mail.ru.

Information about the authors

Kulikouskaya Viktoryia Igaraua – Ph. D. (Chemistry), Head of the Laboratory. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skoryna Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kulikouskaya@gmail.com.

Hileuskaya Kseniya Syargeevna – Ph. D. (Chemistry), Senior researcher. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skoryna Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: k_hilevskay@mail.ru.

Pinchuk Sergei Vladimirovich – Ph. D. (Biology), Senior researcher. Institute Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pinchuksv@mail.ru.

Kraskouski Aliaksandr Mikalaevich – Junior researcher. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skoryna Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aleks.kraskovsky@gmail.com.

Vasilevich Irina Borisovna – Junior researcher. Institute Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: irina-vasilevich@yandex.by.

Агабеков Владимир Еноквич – академик, д-р хим. наук, профессор, директор. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ichnm@ichnm.basnet.by.

Волотовский Игорь Дмитриевич – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: volotovski@yahoo.com.

Для цитирования

Биополимерные мультислойные пленки в качестве носителей мезенхимальных стволовых клеток / В. И. Куликовская [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 3. – С. 38–46.

Matievski Kirill Aleksandrovich – Assistant. Institute Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kirill.matievskiy@mail.ru.

Agabekov Vladimir Enokovich – Academician, D. Sc. (Chemistry), Professor, Director. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skoryna Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ichnm@ichnm.basnet.by.

Volotovski Igor Dmitrievich – Academician, D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Laboratory. Institute Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: volotovski@yahoo.com.

For citation

Kulikouskaya V. I., Hileuskaya K. S., Pinchuk S. V., Kraskouski A. N., Vasilevich I. B., Matievski K. A., Agabekov V. E., Volotovski I. D. Biopolymer multilayer films as substrates for mesenchymal stem cells. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2017, vol. 61, no. 3, pp. 38–46 (in Russian).