

Культивирование криоконсервированных стромальных клеток на углеродных микрофибрах

UDC 615.361.018.46.085.23.014.41:677.463

Yu.A. PETRENKO^{1*}, I.V. GURIN², A.YU. PETRENKO¹, B.P. SANDOMIRSKY¹

Culturing of Cryopreserved Stromal Cells on Carbon Microfibers

Исследовали особенности поведения стромальных клеток при культивировании на микрофибрах углеродного материала. Показано, что при использовании углеродного материала со сравнительно большим радиусом волокон не было выявлено каких-либо значительных изменений в метаболической активности стромальных клеток при совместном культивировании. Клетки прикреплялись и распластывались на поверхностях углеродных нитей, были способны пролиферировать, заполнять пространства среди нитей и в дальнейшем формировать моно- и многослойные пласты. Таким образом, микрофибра углерода является перспективным материалом для создания биоинженерных конструкций соединительной ткани.

Ключевые слова: стромальные клетки, углеродные микрофибра, культивирование *in vitro*, биоинженерные конструкции.

Вивчали особливості поведінки стромальних клітин при культивуванні на мікрофібрах вуглецевого матеріалу. Показано, що при використанні вуглецевого матеріалу з порівняно великим радіусом волокон не було отримано значних змін у метаболічній активності стромальних клітин при сумісному культивуванні. Клітини прикріплювались і розпластувались на поверхні вуглецевих ниток, були здатні проліферувати, заповнювати простір між нитками і в подальшому формувати моно- і багатoshарові пласти. Таким чином, мікрофібра вуглецю є перспективним матеріалом для створення біоінженерних конструкцій сполучної тканини.

Ключові слова: стромальні клітини, вуглецеві мікрофібра, культивування *in vitro*, біоінженерні конструкції.

There were investigated the stromal cell properties during culturing on carbon microfibers. It has been shown during application of carbon material with comparatively bigger radius of fibers any significant changes in metabolic activity of stromal cells at a combined culturing were not found out. The cells attached and spread on the surfaces of carbon fibers, enabled the proliferation, filling volumes among fibers and hereafter the formation of mono- and multiple layers. So, the carbon microfibers are perspective material for development of bioengineered constructs of conjunctive tissue.

Key-words: stromal cells, carbon microfibers, culturing *in vitro*, bioengineered constructs.

Тканевая инженерия объединяет области клеточной биологии, инженерии, материаловедения и хирургии для создания *in vitro* биоинженерных конструкций, состоящих из живых клеток и различных матриц, созданных из материалов органической и неорганической природы. Биоинженерные конструкции, способные выполнять заданные функции, могут быть использованы для восстановления поврежденных тканей. Считается, что носитель для тканевой инженерии должен быть нетоксичным, обеспечивать хорошую адгезию клеток, их пролиферацию, дифференцировку, а также секрецию внеклеточного вещества [1]. Кроме того, иметь большую площадь поверхностей относительно своего объема. Данными свойствами обладают волокна (fibres), изготовленные из различных материалов.

Цель работы – исследовать особенности поведения стромальных клеток (СК) при культивировании на микрофибрах углеродного материала.

Материалы и методы

В работе использовали СК 4–6 пассажей, предварительно криоконсервированных по 2-этапной программе (со скоростью 1°C/мин до –80°C, после чего погружали в жидкий азот при –196°C) под защитой 10% ДМСО. Суспензию клеток хранили в низкотемпературном банке 1–2 года. Клетки размораживали на водяной бане при 37°C, отмывали от криопротектора холодной средой 199, после чего центрифугировали при 150 g в течение 10 мин. Осадки ресуспендировали в среде Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM), содержащей 15% эмбриональной сыворотки (ЭС) крупного рогатого ско-

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Национальный научный центр "Харьковский физико-технический институт" НАН Украины

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 706-74-35, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²National Sciences Centre Kharkov Institute of Physics and Technology of National Academy of Sciences of Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 372 7435, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

та, 50 ед/мл пенициллина, 50 мг/мл стрептомицина и 2 мМ/мл L-глутамин. Клетки культивировали при 37°C, 5% CO₂ в воздухе и 95% влажности. Замену среды проводили через 48 ч культивирования и далее каждые 3–4 дня. После образования 70% монослойного роста клетки снимали с культурального пластика смесью растворов трипсина и версена (1:4) и рассеивали с коэффициентом 1:3.

В работе использовали волокна вискозной углеродной ткани “Урал-Т22” (Светлогорское ПО “Химволокно”, Беларусь), предварительно обработанные при 2200–2500°C. Перед использованием вискозную углеродную ткань дополнительно распускали до получения микроволокон (с диаметром ~5 мкм) углерода (МВУ) и стерилизовали при 160°C в течение 90 мин.

Стромальные клетки 4-го пассажа разводили средой культивирования до получения концентрации 5×10⁵ клеток/мл, после чего помещали по 0,5 мл в лунки 24-луночного планшета, в которых находились МВУ. Клетки в присутствии МВУ культивировали в течение 10 недель при 37°C, 5% CO₂ в воздухе и 95% влажности. Замену среды производили каждые 3–4 суток.

При определении метаболической активности СК, культивированных в присутствии МВУ, использовали окислительно-восстановительный индикатор Alamar Blue (AB, Serotec). В лунки с исследуемыми образцами помещали среду культивирования, дополненную 10% AB и инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Уровень восстановления AB определяли на планшетном флуориметре Tecan GENios (Австралия) при волне возбуждения 550 нм и эмиссии 590 нм. Данные представляли как разность опытной и холостой пробы (без клеток) и выражали в условных единицах флуоресценции.

После 10 недель культивирования стромальные клетки, культивированные на МВУ, фиксировали 4% нейтральным забуференным формалином. Образцы обезживали спиртами восходящих концентраций, заключали в парафин и готовили срезы толщиной 8–12 мкм. Полученные гистологические срезы окрашивали азур-эозином или гематоксилин-эозином для получения обзорных препаратов или альциановым синим для выявления мукополисахаридов.

Результаты и обсуждение

Необходимо было определить токсичность МВУ по отношению к стромальным клеткам. Для этого клетки инкубировали в присутствии волокон углеродного материала. В течение 7 суток культивирования жизнеспособность и морфология клеток не изменялись. Для определения метаболической и пролиферативной активности СК при наличии

или отсутствии МВУ использовали индикатор Alamar Blue (AB). Данный индикатор интегрально отражает активность окислительно-восстановительных ферментов в клетках и применяется рядом авторов для определения метаболической и пролиферативной активности различных типов клеток [2, 3]. Было установлено, что при культивировании СК в присутствии углеродных материалов в течение 4 и 7 суток не наблюдалось угнетения метаболической и пролиферативной активности клеток, оцененных по восстановлению AB. Формирование монослоя стромальными клетками происходило идентично тому, как это было в контроле (при отсутствии МВУ). На основании этого можно сделать предположение о биоинертности углеродного материала. При культивировании СК в присутствии МВУ уже на 1-е сутки после посева наблюдалась адгезия единичных клеток к нитям МВУ. В течение 1-й недели культивирования была отмечена миграция клеток на контактирующие с монослоем МВУ. Последующее заселение этих волокон происходило как за счет миграции, так и пролиферации клеток на углеродном субстрате.

На протяжении 2-й недели культивирования клетки продолжали заселять углеродные нити, формируя однослойные мембраны и тяжи между отдельными волокнами. К концу 4-й недели культивирования наблюдалось активное заселение волокон пролиферирующими СК человека: клетки заполняли пространства и промежутки между поддерживающими углеродными нитями. В дальнейшем СК образовывали плоский пласт, толщина которого зависела от расположения нитей. В процессе культивирования удавалось получать двумерные структуры, состоящие из углеродных нитей, заключенных в плотно упакованные ряды клеток.

Были проведены эксперименты, в которых из 2-мерных структур, содержащих СК и МВУ, формировали полые цилиндры. Пленки клеток с заключенными в них МВУ оказались пластичными и были способны сохранять сформированную архитектуру. По истечении 6 недель культивирования клетки, растущие на углеродных нитях, фиксировали нейтральным 4%-м формалином и заключали в парафин. Результаты гистологических исследований показали, что клетки полностью заполняли стенки полых цилиндров и продуцировали внеклеточный матрикс, состоящий из волокнистой стромы и основного вещества, представленного мукополисахаридами, что подтверждало позитивное окрашивание альциановым синим.

Таким образом, углеродные волокна обладают биосовместимостью с СК, а также высокими адгезивными свойствами. В работе [1] при исследовании влияния природы и свойств различных

гидрофильных и гидрофобных волокон на адгезию мышечных фибробластов линии L929 было показано, что углеродные волокна имеют наиболее адгезивную поверхность. Кроме того, уменьшение диаметра волокон до наноразмеров, а следовательно увеличение площади поверхностей, позволяет повысить адгезию клеток [4]. В работе [5] было показано, что углеродные нановолокна радиусом до 20 нм (Single-wall carbon nanotubes) обладали большей цитотоксичностью по сравнению с волокнами радиусом 500 нм.

Выводы

При использовании углеродного материала со сравнительно большим радиусом волокон не было выявлено каких-либо значительных изменений в метаболической активности стромальных клеток. Клетки прикреплялись и распластывались на поверхностях углеродных нитей, были способны пролиферировать, заполнять пространства среди нитей и в дальнейшем формировать моно- и многослойные пласты. Кроме того, культивирование стромальных клеток на углеродных волокнах в трехмерных условиях приводило к продукции экстрацеллюлярного матрикса стромальными клетками, что необходимо для формирования

тканеподобного микроокружения. Таким образом, МВУ являются перспективным материалом для создания биоинженерных конструкций соединительной ткани.

Работа выполнена при поддержке гранта УНТЦ № 4913.

Литература

1. *Edwards S.L., Mitchell W., Matthews J.B. et al.* Design of nonwoven scaffold structures for tissue engineering of the anterior cruciate ligament // *AUTEX Research Journal.* – 2004. – Vol. 4, N2. – P. 86–94.
2. *Gloeckner H., Jonuleit T., Lemke H.D.* Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue // *J. Immunol. Methods.* – 2001. – Vol. 252, N1–2. – P. 131–138.
3. *Petrenko Yu.A., Gorokhova N.A., Tkachova E.N., Petrenko A.Yu.* The reduction of Alamar Blue by peripheral blood lymphocytes and isolated mitochondria // *Укр. біохім. журн.* – 2005. – Т. 77, N5. – P. 100–105.
4. *Price R. L., Haberstroh K.M., Webster T.J.* Enhanced functions of osteoblasts on nanostructured surfaces of carbon and alumina // *Med. Biol. Eng. Comput.* – 2003. – Vol. 41, N3. – P. 372–375.
5. *Tian F., Cui D., Schwarz H. et al.* Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts // *Toxicol. In Vitro.* – 2006. – Vol. 20, N7. – P. 1202–1212.

Поступила 10.07.2008