

ТЕОРИЯ И КОНСТРУИРОВАНИЕ

*Е.В. Кудан, Е.А. Буланова, Ф.Д.А.С. Перейра, В.А. Парфенов, В.А. Касьянов,
Ю.Д. Хесуани, В.А. Миронов*

Распластывание тканевых сфероидов на электроспинновом полиуретановом матриксе

Аннотация

Тканевые сфероиды, сформированные из фибробластов с помощью микромолдного неадгезивного гидрогеля, были расположены с помощью трехмерного биопринтера на поверхности нановолокнистого полиуретанового матрикса, полученного методом электроспиннирования. Было показано, что тканевые сфероиды прикрепляются к поверхности матрикса в течение всего нескольких часов и полностью распластываются в течение нескольких дней, что указывает на высокую биосовместимость использованного матрикса. Тканевые конструкции, образующиеся при прикреплении и распластывании тканевых сфероидов на электроспинновом матриксе, являются новой технологической платформой для биофабрикации и трехмерной биопечати тканей и органов.

Введение

Биопечать трехмерных тканей и органов можно определить как роботическую послойную биофабрикации функциональных трехмерных тканевых и органных конструкций на основе цифровой модели с использованием тканевых сфероидов в качестве строительных блоков [1]. Фундаментальным биологическим принципом технологии биопечати является феномен тканевого слияния, который часто наблюдается в ходе эмбрионального развития, например при слиянии нервной трубки, неба или двух аорт в одну [2]. Считается, что близко расположенные тканевые сфероиды сливаются в результате действия сил поверхностного натяжения [3]. Тканевое слияние сфероидов происходит, однако, только в том случае, если они удерживаются в непосредственном контакте друг с другом. Для удерживания тканевых сфероидов рядом друг с другом в заданном месте в трехмерном пространстве используются с разной степенью эффективности напечатанные методом трехмерной печати синтетические каркасы [4], [5], разнообразные гидрогели [6] и даже металлические стержни [7].

Электроспиннирование позволяет создавать тонкие нановолокнистые матриксы, которые очень напоминают по своей структурной организации натуральный экстраклеточный матрикс и широко используются в тканевой инженерии [8], [9]. Недавно было продемонстрировано, что тканевые сфероиды прикрепляются к электроспинновым матриксам [10], которые могут удерживать тканевые сфероиды в прикрепленном [11] или распластанном состоянии [12]. Более того, было показано, что прикрепленные к электроспинновому матриксу тканевые сфероиды могут сливаться [12], однако кинетике процесса распластывания и слияния прикрепленных тканевых сфероидов в данных публикациях не было уделено достаточного внимания.

Главной задачей настоящего исследования было изучение кинетики распластывания тканевых сфероидов, сформирован-

ных из фибробластов на электроспинновом биосовместимом полиуретановом матриксе. Нановолокнистый матрикс был получен методом электроспиннирования, и тканевые сфероиды сформированы с использованием микромолдного неадгезивного гидрогеля. Было продемонстрировано, что тканевые сфероиды из фибробластов довольно быстро прикрепляются в течение всего нескольких часов, а затем в течение нескольких дней полностью распластываются на электроспинновом полиуретановом матриксе, что указывает на его высокую биосовместимость и, что особенно важно, на способность удерживать в заданной позиции и переносить расположенные на нем тканевые сфероиды.

Тканевые сфероиды, прикрепленные и распластанные на электроспинновых матриксах, являются, по сути, новой технологической платформой для разработки методов трехмерной биофабрикации и оптимизации технологии биопечати тканей и органов. Кроме того, анализ кинетики распластывания тканевых сфероидов может быть использован для количественной оценки тканевой биосовместимости *in vitro* различных электроспинновых биоматериалов.

Материалы и методы

Биосовместимый полиуретан (EG-85A, «Lubrizol», США), разрешенный для клинического использования в США, был подарен профессором Сюдженом Веном (США). Нановолокнистый полиуретановый матрикс получали методом электроспиннирования с использованием коммерческой установки для электроспиннирования («Yflow», Испания).

Тканевые сфероиды получали из клеточной суспензии фибробластов с помощью микромолдного неадгезивного гидрогеля (агарозы) согласно протоколу компании «Microtissue Inc.», США.

Полученные тканевые сфероиды размещали на поверхности электроспиннованного полиуретанового матрикса с по-

мощью оригинального трехмерного мультифункционального биопринтера «Фабион» («ЗД Биопринтинг Солюшенс», Москва, Россия).

Для сканирующей электронной микроскопии образцы предварительно высушивались и напылялись золотом. Обезвоживание биологических образцов проводилось методом критической точки на установке HCP-2 («НИТАСНИ», Япония). Напыление золотом при ионном токе 6 мА в течение 8 мин проводилось на установке ионного напыления ИВ-3, («ЕИКО», Япония). Напыленные образцы изучались под сканирующим электронным микроскопом JSM-6510 LV («JEOL», Япония). Наблюдение образцов проводилось в режиме вторичных электронов, рабочее расстояние – 10 мм, ускоряющее напряжение – 30 кВ, ток зонда – 85 мкА.

Кинетика распластывания тканевых сфероидов на электроспиннированном полиуретановом матриксе оценивалась путем измерения их диаметра в процессе прикрепления и распластывания. Статистический анализ полученных данных проводился с помощью стандартных программ *Anova* (США) для статического анализа.

Результаты

Нановолокнистый полиуретановый матрикс был получен методом электроспиннирования с помощью коммерческой установки («Yflow», Малага, Испания). Сканирующая электронная микроскопия показала, что электроспиннированные полиуретановые волокна имеют регулярный диаметр (рис. 1а), сливаются в точках пересечения (рис. 1б) и образуют гомогенную плотную сеть, на которой фибробласты полностью распластываются (рис. 1в).

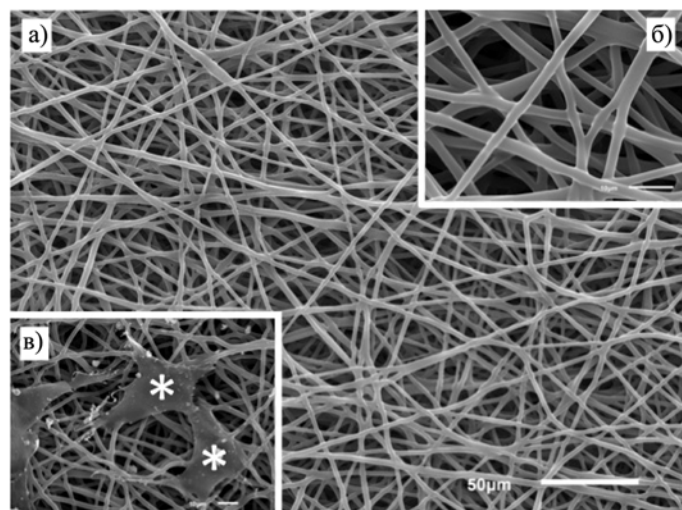


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия электроспинного полиуретанового нановолокнистого матрикса: а) матрикс с волокнами регулярного диаметра; б) слившиеся пересекающиеся волокна матрикса; в) распластанные на матриксе фибробласты. Звездочки (*) указывают на фибробласты

Тканевые сфероиды шарообразной формы и стандартного размера были сформированы из суспензии фибробластов с использованием микромолдного неадгезивного гидрогеля (агарозы) согласно протоколу компании «Microtissue Inc.» (США). Они были размещены на поверхности электроспиннированного полиуретана с помощью оригинального трехмерного биопринтера «Фабион» (рис. 2).

Наблюдение за поведением тканевых сфероидов показало, что они довольно быстро (в течение всего нескольких часов) прикрепляются к поверхности электроспиннированного полиуретанового матрикса и в течение нескольких дней полностью распластываются, что свидетельствует о высокой степени биосовместимости электроспинного полиуретанового матрикса (рис. 3).

При полном распластывании диаметр распластванного сфероида превышает изначальный диаметр нераспластванного сфероида в несколько раз (табл. 1).

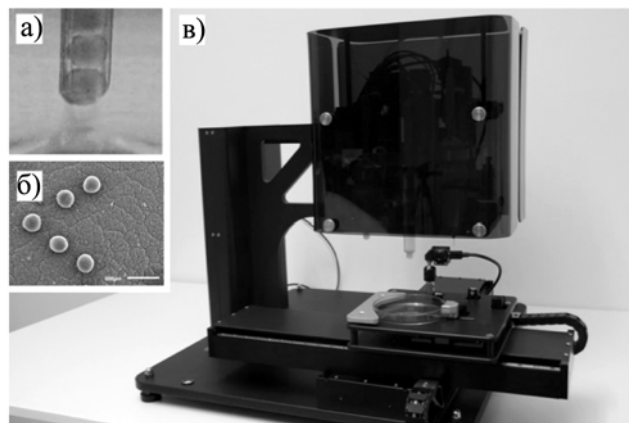


Рис. 2. Биопечать тканевых сфероидов: а) диспенсирование тканевых сфероидов; б) напечатанные на электроспинном полиуретановом матриксе тканевые сфероиды; в) оригинальный мультифункциональный трехмерный биопринтер «Фабион», разработанный компанией «ЗД Биопринтинг Солюшенс» (Москва, Россия)

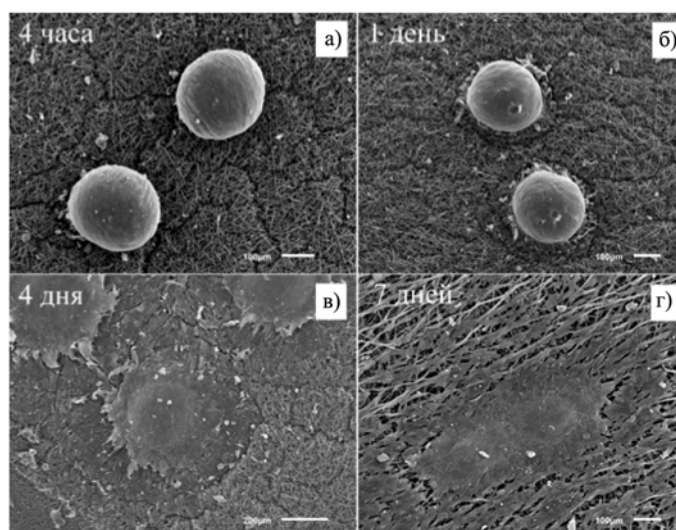


Рис. 3. Кинетика распластывания тканевых сфероидов: а) 4 часа; б) 1 день; в) 4 дня; г) 7 дней. Демонстрируется слияние двух распластавшихся сфероидов (сканирующая электронная микроскопия)

Таблица 1

Кинетика распластывания тканевых сфероидов на полиуретановом электроспиннированном матриксе

| Диаметр сфероида, мМ, 4 часа распластывания | Диаметр сфероида, мМ, 1 день распластывания | Диаметр сфероида, мМ, 2 дня распластывания | Диаметр сфероида, мМ, 7 дней распластывания |
|---|---|--|---|
| 180,9 ± 14,8 | 316,4 ± 53,9 | 461,2 ± 108,2 | 1525,4 ± 531,9 |

Кинетика, или скорость распластывания тканевого сфероида, – это результат баланса физических сил, оперирующих на границе клеток и матрикса и между самими клетками внутри тканевого сфероида [13]. Если клеточно-матриксоевые взаимодействия (адгезия к матриксу) намного сильнее, чем клеточно-клеточные взаимодействия (когезия, или материальные свойства сфероидов), то результатом является наблюдаемое полное распластывание вплоть до уровня клеточного монослоя (рис. 3г). С другой стороны, слабые силы взаимодействия между клетками и матриксом (слабая адгезия) и сильные клеточно-клеточные взаимодействия между клетками внутри сфероида (сильная когезия) ведут к образованию так называемых

прикрепленных (tethered), но не распластанных тканевых сфероидов [11].

Заключение

Полиуретановый матрикс был создан методом электроспиннингования. Тканевые сфероиды были сформированы из суспензии фибробластов с помощью микромолдного неадгезивного гидрогеля. Было показано, что тканевые сфероиды, созданные из фибробластов и на поверхности матрикса с помощью трехмерного биопринтера, могут прикрепляться и распластываться на биосовместимом электроспинновом полиуретановом матриксе, что свидетельствует о его высокой биосовместимости. Процесс прикрепления тканевых сфероидов осуществляется в течение нескольких часов, и они полностью распластываются в течение нескольких дней. Кинетику распластывания тканевых сфероидов из фибробластов можно использовать в качестве количественного показателя для оценки тканевой биосовместимости новых электроспинновых биоматериалов. Механизм взаимодействия клеток тканевых сфероидов с электроспинновым полиуретановым матриксом безусловно заслуживает дальнейшего изучения с помощью современных методов трехмерной реконструкции серийных ультратонких срезов, таких, например, как сканирующая зондовая нанотомография. Тканевые конструкции, образующиеся в результате прикрепления и распластывания тканевых сфероидов на электроспинновом матриксе, могут служить новой технологической платформой в тканевой инженерии и трехмерной биопечати (рис. 4а) и использоваться для биофабрикации бесклеточных коллагеновых заплаток (рис. 4б), кожи (рис. 4в), сухожилий (рис. 4г), кровеносных сосудов и трубчатых органов (рис. 4д), хряща (рис. 4е).

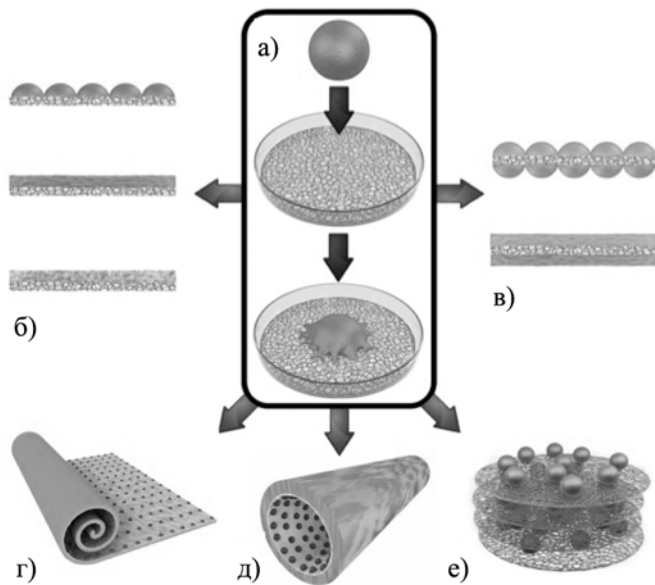


Рис. 4. Сфероиды на электроспинновом матриксе как новая технологическая платформа: а) тканевый сфероид на электроспинновом матриксе – технологическая платформа; б) бесклеточные заплатки; в) кожа; г) четырехмерная биопечать – сухожилие; д) центрифугальное кастингование – кровеносный сосуд и трубчатые органы; е) трехмерная биопечать – хрящ

Магнитная функционализация полиуретанового электроспиннового матрикса с помощью магнитных наночастичек [14] или использование тканевых сфероидов, сформированных из клеток, меченых магнитными наночастичками [15], открывает принципиально новые возможности для быстрой послойной роботизированной биофабрикации человеческих тканей и органов методом трехмерной магнитной биопечати. При этом роботически расположенные, согласно цифровой модели органа на электроспинновом матриксе, тканевые сфероиды сначала прикрепляются и распластываются (как это детально описано в данной статье), а затем приготовленные таким

образом биолисты накладываются последовательно один на другой с помощью трехмерного магнитного биопринтера и склеиваются специально разработанным для данной цели расплываемым гидрогелем. Полученные данные представляют собой важный этап на пути к разработке принципиально нового метода трехмерной магнитной биопечати человеческих тканей и органов.

Благодарности

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 15-15-00173).

Список литературы:

1. Mironov V., Visconti R.P., Kasyanov V., Forgacs G., Drake C.J., Markwald R.R. Organ printing: Tissue spheroids as building blocks // *Biomaterials*. 2009 Apr. Vol. 30 (12). PP. 2164-2174.
2. Pérez-Pomares J.M., Foty R.A. Tissue fusion and cell sorting in embryonic development and disease: Biomedical implications // *Bioessays*. 2006 Aug. Vol. 28 (8). PP. 809-821. Review.
3. Foty R.A., Pflieger C.M., Forgacs G., Steinberg M.S. Surface tensions of embryonic tissues predict their mutual envelopment behavior // *Development*. 1996 May. Vol. 122 (5). PP. 1611-1620.
4. Huang G.S., Tseng C.S., Linju Yen B., Dai L.G., Hsieh P.S., Hsu S.H. Solid freeform-fabricated scaffolds designed to carry multicellular mesenchymal stem cell spheroids for cartilage regeneration // *Eur. Cell Mater*. 2013 Oct 13. Vol. 26. PP. 179-194; discussion 194.
5. Schon B.S., Schrobback K., van der Ven M., Stroebel S., Hooper G.J., Woodfield T.B. Validation of a high-throughput microtissue fabrication process for 3D assembly of tissue engineered cartilage constructs // *Cell Tissue Res*. 2012 Feb 1.
6. Jakab K., Neagu A., Mironov V., Markwald R.R., Forgacs G. Engineering biological structures of prescribed shape using self-assembling multicellular systems // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004 Mar 2. Vol. 101 (9). PP. 2864-2869.
7. Itoh M., Nakayama K., Noguchi R., Kamohara K., Furukawa K., Uchihashi K., Toda S., Oyama J., Node K., Morita S. Scaffold-Free Tubular Tissues Created by a Bio-3D Printer Undergo Remodeling and Endothelialization when Implanted in Rat Aortae // *PLoS One*. 2015 Sep 1. Vol. 10 (9): e0136681.
8. Pham Q.P., Sharma U., Mikos A.G. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: A review // *Tissue Eng*. 2006 May. Vol. 12 (5). PP. 1197-1211.
9. Mironov V., Kasyanov V., Markwald R.R. Nanotechnology in vascular tissue engineering: From nanoscaffolding towards rapid vessel biofabrication // *Trends Biotechnol*. 2008 Jun. Vol. 26 (6). PP. 338-344.
10. Chua K.N., Lim W.S., Zhang P., Lu H., Wen J., Ramakrishna S., Leong K.W., Mao H.Q. Stable immobilization of rat hepatocyte spheroids on galactosylated nanofiber scaffold // *Biomaterials*. 2005 May. Vol. 26 (15). PP. 2537-2547.
11. Xia L., Sakban R.B., Qu Y., Hong X., Zhang W., Nugraha B., Tong W.H., Ananthanarayanan A., Zheng B., Chau I.Y., Jia R., McMillian M., Silva J., Dallas S., Yu H. Tethered spheroids as an in vitro hepatocyte model for drug safety screening // *Biomaterials*. 2012 Mar. Vol. 33 (7). PP. 2165-2176.
12. Beachley V., Kasyanov V., Nagy-Mehesz A., Norris R., Ozolanta I., Kalejs M., Stradins P., Baptista L., da Silva K., Grainjero J., Wen X., Mironov V. The fusion of tissue spheroids attached to pre-stretched electrospun polyurethane scaffolds // *J. Tissue Eng*. 2014 Nov 6. Vol. 5: 2041731414556561.
13. Ryan P.L., Foty R.A., Kohn J., Steinberg M.S. Tissue spreading on implantable substrates is a competitive outcome of cell-cell vs. cell-substratum adhesivity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001 Apr 10. Vol. 98 (8). PP. 4323-4327.
14. Lee H.J., Lee S.J., Uthaman S., Thomas R.G., Hyun H., Jeong Y.Y., Cho C.S., Park I.K. Biomedical Applications of Magnetically Functionalized Organic/Inorganic Hybrid

15. *Whatley B.R., Li X., Zhang N., Wen X.* Magnetic-directed patterning of cell spheroids // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2014 May. Vol. 102 (5). PP. 1537-1547.

Елизавета Валерьевна Кудан,
канд. хим. наук, ст. научный сотрудник,
Елена Анатольевна Буланова,
канд. биолог. наук,
зав. лабораторией клеточных технологий,
Перейра Фредерико Давид Аленсар ди Сена,
магистр, инженер,
Владислав Александрович Парфенов,
ведущий инженер,
ЧУ «ЗД Биопринтинг Солоушенс»,
г. Москва,

Владимир Александрович Касьянов,
д-р техн. наук, профессор,
руководитель лаборатории биомеханики,
Рижский университет им. П. Страдиньша,
ст. научный сотрудник,
Рижский технический университет,
г. Рига, Латвия,
Хесуани Юсеф Джорджевич,
исполнительный директор,
Владимир Александрович Миронов,
канд. мед. наук, научный руководитель,
ЧУ «ЗД Биопринтинг Солоушенс»,
г. Москва,
e-mail: info@bioprinting.ru

Л.А. Бокерия, О.Л. Бокерия, К.Г. Потловский, И.И. Аверина, М.Ю. Мироненко, А.С. Сатюкова, Л.А. Глушко, Т.Г. Ле, В.А. Шварц

Результаты экспериментального исследования неинвазивной оценки кинематической активности интактного левого желудочка сердца

Аннотация

Исследование направлено на изучение топологии энергоэффективных зон на поверхности эпикарда. Полученные данные позволяют определять оптимальные участки для имплантации микроэлектромеханических систем (МЭМС), в том числе и для электротерапии сердца. Использован неинвазивный метод оценки кинематической активности эпикарда ЛЖ сердца у пациентов с различной сердечно-сосудистой патологией для прогнозирования места локализации имплантируемых устройств.

Введение

В настоящее время в высокотехнологичной медицине широкое применение находят имплантируемые устройства для замещения функций некоторых органов, например электрокардиостимуляторы [1]. Так, имплантация ЭКС в Российской Федерации на 2012 год составила 33827 операций, по сравнению с 2007 годом частота имплантации ЭКС возросла на 61 % (на 12868 операций). Частота имплантации ЭКС у детей на 2012 год составила 386 операций [2]. Срок службы современных ЭКС ограничен сроком службы батареи и в среднем составляет 5-7 лет, затем требуется смена ЭКС, т. е. повторная операция. Следовательно, увеличение срока службы имплантируемых устройств необходимо как с медицинской, так и с экономической точки зрения. В то же время габариты и срок их службы в значительной степени зависят от емкости используемого источника тока. Особенно это критично для имплантируемых устройств, расположенных на поверхности сердца, где масса не должна превышать 15 г. Поиск новых путей получения источника энергии – батареи, работающей более 10-15 лет, является ключевым [3], [4]. В настоящее время активно исследуются методы и устройства для генерирования электрической энергии, использующие энергию возвратно-поступательного, колебательного или вибрационного движения объектов [5]. Разработка устройств микроэлектромеханического преобразования сокращений сердца в электрическую энергию является перспективным направлением совершенствования эпикардиальных систем кардиостимуляции [6].

На сегодняшний день в мире существуют микроэлектромеханические системы (МЭМС), которые теоретически возможно использовать в имплантируемых устройствах для электротерапии сердца. Такие МЭМС представляют собой интегрированные микроустройства или системы, сочетающие электрические и механические компоненты, изготовленные по технологиям, совместимым с технологией интегральных схем, и имеющие размеры от нескольких микрометров до нескольких миллиметров. Для расширения области применения МЭМС в медицинской электронике требуются разработки

новых научных подходов для исследования энергии работы сердца.

Использование МЭМС-преобразователя в кардиохирургии возможно в эпикардиальных кардиостимуляторах, которые непосредственно имплантируются на стенку левого желудочка сердца. Кинематической энергии сердца достаточно для увеличения срока службы батареи ЭКС минимум в 2 раза. Учитывая использование ЭКС с МЭМС-преобразователем у людей и тот факт, что эффективность МЭМС-преобразователя зависит от его локализации, необходимо проведение неинвазивного анализа количества кинематической энергии, вырабатываемой разными участками ЛЖ.

Доступные на сегодняшний день неинвазивные методы исследования электрокардиографии и эхокардиографии сердца, согласно нашим предположениям, могут быть использованы для неинвазивной оценки кинематической активности миокарда с использованием векторного анализа движения различных участков миокарда по данным эхокардиографии сердца. Данный подход позволяет проводить как качественную, так и количественную неинвазивную оценку кинематики стенок ЛЖ.

Задачей нашего исследования является изучение топологии энергоэффективных зон на поверхности эпикарда неинвазивными методами для локализации наиболее энергоэффективных зон, достаточных для имплантации медицинских устройств различного назначения, по оценке кинематической активности эпикарда на лабораторных животных.

Материалы и методы

Материалы

Объектом исследования были лабораторные животные – свиньи домашние. Всего было обследовано 15 животных в возрасте 6...9 месяцев, средним весом (56 ± 5) кг. Исследование проводилось на базе ФГБУ «НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева» МЗ РФ. Использование лабораторных животных (свиньи домашние) было одобрено этической экспертизой. План и дизайн был согласован и одобрен этическим комитетом