

Перфузионный биореактор для создания тканеинженерных конструкций

Аннотация

Проведены эксперименты по разработке конструкции проточного биореактора. Собрана система, представляющая собой помещенный в CO_2 -инкубатор малогабаритный биореактор с четырьмя ячейками для создания тканеинженерных конструкций, позволяющий проводить долговременные эксперименты в условиях потока и стерильности при заданных параметрах влажности и температуры культуральной и газовой сред. Для минимизации отрицательного действия потока на жизнеспособность клеток были оптимизированы скорость циркуляции культуральной среды и избыточное давление в проточных ячейках. Функциональная эффективность разработанного биореактора была продемонстрирована на примере хондрогенной дифференцировки клеток в клеточно-инженерной конструкции, состоящей из биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогелевого матрикса, мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека и дифференцировочной хондрогенной среды.

Введение

Для создания *in vitro* биоинженерных конструкций органов и тканей используют различного типа биореакторы – многокомпонентные аппаратные системы, обеспечивающие необходимые условия для дифференцировки и пролиферации клеток с последующим формированием тканевых структур при их культивировании на 2D- или 3D-биосовместимых биостабильных или резорбируемых матриксах [1], [2]. В связи с этим описываемые устройства должны имитировать физиологические условия для формирования тканевого эквивалента, обеспечив питание клеток, транспорт к ним газов и выведение продуктов обмена веществ [2]. Большинство существующих биореакторов, например для создания хрящевой ткани, основаны на имитации механических нагрузок в суставе *in vivo*, тогда как биореакторы, предназначенные для выращивания кровеносных сосудов и клапанов сердца, призваны обеспечить соответствующие физиологическим гемодинамические и биомеханические условия [2], [3]. К ним относятся системы, основанные на перфузии, действии силы сдвига, гидростатического давления, растяжения, сжатия [4]. В литературе также описаны устройства, в которых в качестве стимулов при культивировании клеточно-инженерной конструкции (КИК) используют электрическое поле, ультразвук и центробежную силу [4], [5]. Кроме того, можно выделить системы, основанные на комбинации вышеперечисленных воздействий.

К недостаткам существующих биореакторов относят большой расход дорогостоящих культуральных сред, невозможность «выращивания» одновременно нескольких тканевых структур и сложность мониторинга процессов внутри систе-

мы. Также при культивировании клеток необходимо обеспечить стерильность, что может быть достигнуто лишь в закрытой системе, к которой можно отнести замкнутый проточный биореактор [4]. Отметим, что постоянная замена культуральной среды при перфузии позволяет наиболее эффективно, по сравнению с другими системами, обеспечивать транспорт питательных веществ и газов к клеткам, а также выведение от них продуктов обмена веществ.

Целями рассматриваемой работы являются разработка и апробирование компактного перфузионного биореактора с несколькими ячейками (рабочими камерами) для формирования тканевых структур.

Материалы и методы

Для проведения долговременных проточных экспериментов по выращиванию тканеинженерных конструкций (ТИК) нами была разработана ячейка для биореактора, схема которой представлена на *рис. 1*. На пористую подложку нижней части держателя помещали мембраны из поликарбоната или нейлона с размером пор 5 и 10 мкм («Merck Millipore Ltd.», Ирландия), которые удерживали матрикс с клетками.

Биореактор включал в себя две системы циркуляции (*рис. 1*). В каждой из них к резервуару с культуральной средой параллельно подключали две ячейки. Для переноса культуральной среды применяли шланги «Pharm® BPT» («Saint-Gobain Performance Plastics», Франция), способные поддерживать скорость потока от 0,018 до 18 мл/мин. Общая длина шлангов для перфузии одной ячейки составляла 2,2 м. Ячейки и резервуары со средой помещали в инкубатор, где поддерживали температуру 37 °C, относительную влажность 90...100 %, состав

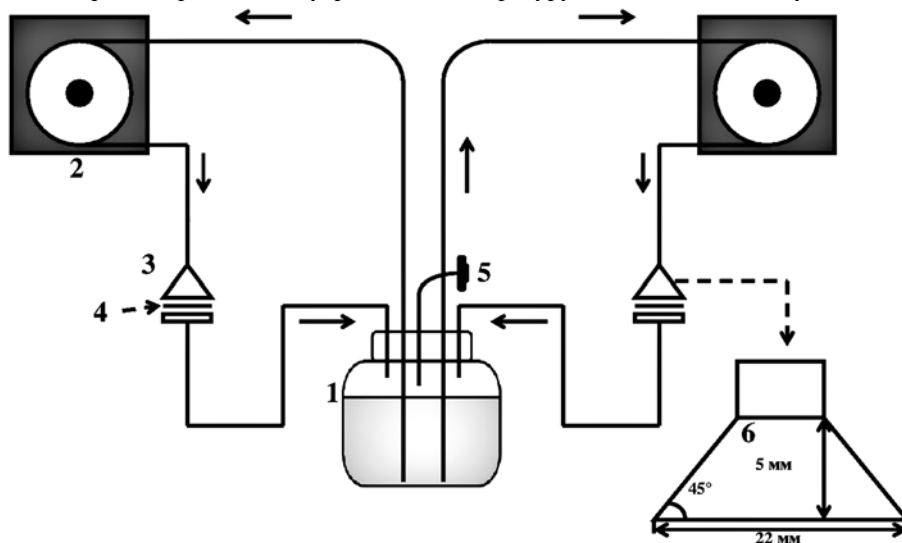


Рис. 1. Система циркуляции биореактора: 1 – резервуар со средой; 2 – перистальтический насос; 3 – ячейка; 4 – мембрана, удерживающая ТИК; 5 – стерильный фильтр; 6 – внутреннее пространство ячейки

газовой смеси $\text{CO}_2 - 5\%$ и $\text{O}_2 - 20\%$. Емкость с культуральной средой через стерильные фильтры сообщалась с атмосферой в инкубаторе. Постоянную циркуляцию среды с заданной скоростью обеспечивали четырьмя перистальтическими насосами («MasterFlex», США), размещенными снаружи CO_2 -инкубатора. Управление потоком осуществляли через связанный с компьютером контроллер («Harvard Apparatus», США) с помощью программного обеспечения «ORCA Controller Software».

Емкости для циркулирующей среды, крышки для них и шланги автоклавились в течение 45 мин при температуре 121°C . Соединительные элементы из полипропилена и полиалломера помещали на 2 ч в 10%-ный раствор гипохлорита натрия ОЧ («Sharlau», Испания). Далее их промывали стерильным 0,9%-ным раствором хлорида натрия, а затем переносили в 70%-ный раствор этанола. После сборки системы в CO_2 -инкубаторе через нее в течение 1 ч прокачивали 70%-ный раствор этанола, который смывали в течение 3 ч стерильным 0,9%-ным раствором хлорида натрия.

Цитотоксичность и матричные свойства (способность поддерживать прикрепление, адгезию и пролиферацию клеток) мембран из поликарбоната и нейлона, используемых в качестве подложек для каркаса при проведении долговременных проточных экспериментов в биореакторе, исследовали на культуре фибробластов мыши линии NIN 3T3 [6]. Для оценки морфологических изменений и/или уменьшения плотности клеток микроскопически клетки окрашивали 0,1%-ным раствором витального красителя трипанового синего.

Выбор оптимального размера пор в мембране, служащей подложкой для КИК, был сделан по величине создаваемого давления в описываемой системе, заполненной модельным раствором. Для этого в схему биореактора перед ячейкой устанавливали подключенный к контроллеру датчик давления с сенсором «PendoTECH Pressure Sensor Polycarbonate» («PendoTECH», США).

Функциональную эффективность разработанного биореактора оценивали на примере процесса дифференцировки клеток в хондрогенном направлении из КИК хрящевой ткани человека (КИК ХТч), состоящей из каркаса (матрикса), мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч), получаемых по стандартной методике [7], и соответствующих культуральных сред.

В качестве матрикса КИК ХТч был выбран биополимерный микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ) из линейного ряда композиции имплантируемого гетерогенного геля (производитель АО «Биомир сервис», г. Краснознаменск) [8] со следующими характеристическими свойствами: средний размер микрочастиц – $(145,79 \pm 0,09)$ мкм; модуль упругости – (1170 ± 12) Па; модуль вязкости – $(62,9 \pm 7,9)$ Па; набухаемость – не ниже $(86,6 \pm 3,0)\%$ мас.; время биорезорбции БМКГ – до 9 мес.

Композиция БМКГ разрешена к клиническому применению (рег. уд. № ФСР 2012/13033 от 15.07.2015 г.) для замещения дефектов мягких тканей [9]. Кроме того, была доказана эффективность использования БМКГ в качестве матрикса в клеточно-инженерных конструкциях – биомедицинских клеточных продуктах для регенерации поврежденных суставного хряща, печени и поджелудочной железы [10].

В многосуточном эксперименте на каждую мембрану из нейлона наносили 1,5 мл суспензии МСК ЖТч, послонно смешанной с БМКГ-матриком, с конечной концентрацией клеток в смеси $2 \text{ г } 10^6 \text{ кл/мл}$. Четыре нейлоновые мембраны с нанесенными конструкциями инкубировали в течение суток в ростовой среде MesenPRO RS™ («Gibco® by Life Technologies™», США) в ячейках биореактора без потока. Далее ячейки с КИК ХТч помещали в предварительно заполненную ростовой средой систему биореактора, находящуюся в CO_2 -инкубаторе (37°C , относительная влажность 90...100 %, состав газовой смеси $\text{CO}_2 - 5\%$ и $\text{O}_2 - 20\%$), и устанавливали поток 0,5 мл/мин. При этом объем циркулирующей среды составлял 110 мл. Через сутки первые образцы извлекали из биореактора и проводили замену среды на дифференцировочную

STEMPRO® («Gibco® by Life Technologies™», США) с последующей ее сменой через неделю циркуляции в системе на свежую дифференцировочную среду. На 14-е сутки культивирования в дифференцировочной среде (на 16-е сутки эксперимента) оставшиеся ячейки с образцами извлекали из биореактора.

Гистологическое исследование образцов проводили путем окрашивания гематоксилином и эозином согласно стандартной методике. Анализ и фотосъемку полученных препаратов проводили, используя микроскоп «Nikon eclipse» («Nikon Corporation», Япония), оснащенный цифровой фотокамерой.

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

В ходе эксперимента на культуре фибробластов мыши линии NIN 3T3 было показано, что мембраны из нейлона и поликарбоната нецитотоксичны. При исследовании адгезии клеток на поверхности материалов было установлено, что поликарбонат обладает определенными матричными свойствами. Это проявлялось в том, что значительное количество клеток после нанесения прикрепилась к поликарбонатной подложке. При этом наблюдали не только адгезию клеток на поверхности матрикса, но и последующий их рост и пролиферацию.

Нейлон, напротив, не обладал матричными свойствами. Только единичные клетки были способны прикрепиться к поверхности, дальнейшего роста и пролиферации клеток не наблюдалось.

На основании полученных данных в качестве материала подложки для КИК нами были выбран нейлон, проявляющий биологическую инертность, так как мембраны из поликарбоната, обладающие матричными свойствами, могли бы повлиять на развитие КИК.

Давление в описываемой системе для мембран с размером пор 5 и 10 мкм определяли в модельных экспериментах с водным раствором вместо культуральной среды и БМКГ вместо КИК при скоростях потока 0,3; 0,5 и 1 мл/мин (табл. 1).

Таблица 1

Давление в системе с использованием в качестве подложки для КИК ХТч мембран с порами 5 и 10 мкм при разных скоростях потока

Скорость потока, мл/мин	Давление в системе с размером пор мембраны 5 мкм, кПа ($n = 3$)	Давление в системе с размером пор мембраны 10 мкм, кПа ($n = 3$)
0,3	$7,0 \pm 3,0$	$1,3 \pm 0,4$
0,5	$9,8 \pm 2,9$	$1,5 \pm 0,5$
1,0	$13,5 \pm 3,5$	$1,7 \pm 0,4$

Как видно из таблицы, мембрана с размером пор 5 мкм создавала большее давление, чем мембрана с размером пор 10 мкм, в 5,4; 6,5 и 7,9 раза при скорости потока 0,3, 0,5 и 1,0 мл/мин соответственно. При этом давление на клетки в системе с размером пор мембраны 5 мкм превысило среднюю нагрузку на тазобедренный и коленный суставы при обычной ходьбе – 0,5...7,7 МПа [11], что свидетельствует в пользу подложки с пористостью 5 мкм.

В результате проведенных предварительных экспериментов с биореактором, содержащим одну ячейку с КИК ХТч и имеющим объем циркулирующей среды 150 мл, была выбрана оптимальная скорость потока 0,5 мл/мин, что подтверждается литературными данными. Baumgartner et al. при культивировании МСК в перфузионном биореакторе показали, что плотность клеток значительно выше при малых скоростях потока (0,3 и 0,5 мл/мин), чем при больших (2 мл/мин) [12].

Испытания на стерильность образцов культуральной среды из биореактора после 16 суток культивирования КИК ХТч показали отсутствие контаминации микроорганизмами.

Гистологический анализ срезов гидрогелевого матрикса с внесенной клеточной культурой МСК ЖТч показал, что через

двое суток культивирования в ростовой среде MesenPRO RS™ (одни сутки в статических условиях и одни сутки в условиях потока) клеточная масса, образующаяся на поверхности гидрогеля, незначительна. Через две недели инкубации в дифференцировочной среде STEMPRO® (на 16-е сутки эксперимента) наблюдали прогрессивное нарастание клеточной массы со значительным образованием внеклеточного матрикса (ВКМ), причем форма клеток изменилась до уплощенной и вытянутой, а соотношение клеток и ВКМ поменялось в пользу последнего (рис. 2).



Рис. 2. Гистологическая картина КИК ХТс через 14 суток культивирования в дифференцировочной среде STEMPRO®: скорость потока – 0,5 мл/мин; окрашивание гематоксилином и эозином; увеличение x200; 1 – БМКГ; 2 – ВКМ; 3 – клетка

Заключение

На основе разработанной ячейки собрана проточная схема для одновременного культивирования четырех ТИК, в которой биореактор помещен в СО₂-инкубатор, что позволило проводить долговременные проточные эксперименты в соответствующей газовой атмосфере. Проведена оценка цитотоксичности поликарбонатных и нейлоновых мембран на культуре фибробластов мыши NIN 3Т3 с целью их применения в составе проточной ячейки в качестве опорных компонентов для матриц различной природы (биогидрогели, каркасные биополимерные матрицы). Оптимизированы основные параметры биореактора: скорость потока и избыточное давление жидкости. Показано, что МСК ЖТс в БМКГ проявляют высокую пролиферативную активность с формированием собственного внеклеточного матрикса, что указывает на перспективность описываемой системы для создания ТИК хрящевой ткани.

Исследование выполнено частично за счет средств гранта Российского фонда фундаментальных исследований (номер проекта 16-29-07322).

Список литературы:

1. Sart S., Agathos S.N., Li Y., Ma T. Regulation of mesenchymal stem cell 3D microenvironment: From macro to microfluidic bioreactors // *Biotechnol. J.* 2016. Vol. 11. № 1. PP. 43-57.
2. Jin G., Yang G.H., Kim G. Tissue engineering bioreactor systems for applying physical and electrical stimulations to cells // *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2015. Vol. 103. № 4. PP. 935-948.
3. Massai D., Cerino G., Gallo D., Pennella F., Deriu M.A., Rodriguez A., Montevicchi F.M., Bignardi C., Audenino A., Morbiducci U. Bioreactors as engineering support to treat cardiac muscle and vascular disease // *J. Healthc. Eng.* 2013. Vol. 4. № 3. PP. 329-370.
4. Schulz R.M., Bader A. Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes // *Eur. Biophys. J.* 2007. Vol. 36. № 4-5. PP. 539-568.
5. Guha Thakurta S., Kraft M., Viljoen H.J., Subramanian A. Enhanced depth-independent chondrocyte proliferation and phenotype maintenance in an ultrasound bioreactor and an assessment of ultrasound dampening in the scaffold // *Acta. Biomater.* 2014. Vol. 10. № 11. PP. 4798-4810.
6. ГОСТ Р ИСО 10993.5-99 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*.
7. Егорова В.А., Пономарева А.С., Богданова Н.Б. и др. Характеристика фенотипа мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани человека методом проточной цитометрии // *Технологии живых систем.* 2009. Т. 6. № 5. С. 40-46.
8. Севастьянов В.И. Биоматериалы, системы доставки лекарственных веществ и биоинженерия // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2009. Т. XI. № 3. С. 69-80.
9. Севастьянов В.И., Перова Н.В. Биополимерный гетерогенный гидрогель Сферо®ГЕЛЬ – инъекционный биодеградируемый имплантат для заместительной и регенеративной медицины // *Практическая медицина.* 2014. Т. 84. № 8. С. 120-126.
10. Севастьянов В.И. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2014. Т. 16. № 3. С. 93-108.
11. Heiner A.D., Martin J.A. Cartilage responses to a novel triaxial mechanostimulatory culture system // *Journal of Biomechanics.* 2004. Vol. 37. PP. 689-695.
12. Baumgartner W., Welti M., Hild N., Hess S.C., Stark W.J., Bürgisser G.M., Giovanoli P., Buschmann J. Tissue mechanics of piled critical size biomimetic and biomineralizable nanocomposites: Formation of bioreactor-induced stem cell gradients under perfusion and compression // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2015. Vol. 47. PP. 124-134.

Виктор Иванович Севастьянов,
д-р биол. наук, профессор,
зав. отделом биомедицинских технологий
и тканевой инженерии,
Юлия Борисовна Басок,
канд. биол. наук, ст. научный сотрудник,
Алексей Михайлович Григорьев,
канд. биол. наук, ст. научный сотрудник,
Людмила Анафилофьевна Курсанова,
канд. биол. наук, ст. научный сотрудник,
Виктор Николаевич Василец,
д-р хим. наук, вед. научный сотрудник,
ФГБУ «ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова»
Минздрава России,
г. Москва,
e-mail: viksev@yandex.ru