

Свойства мезенхимальных стромальных клеток при объемном культивировании в составе трехмерных носителей различной природы[#]

UDC 611.018.46.085.23:014.41:018.2/6:57.08

YU.A. PETRENKO

Properties of Mesenchymal Stromal Cells During 3D Culturing Within Scaffolds of Different Origin[#]

Тканевая инженерия – междисциплинарное направление биотехнологии, основанное на принципах биологии, химии, медицины, технических наук и направленное на создание *in vitro* биологических эквивалентов для восстановления и поддержания функции тканей или органов. Данное направление включает в себя несколько основных составляющих: выбор биосовместимых носителей, способствующих адгезии, пролиферации и дифференцировке клеток, а также выбор адекватного типа и источника клеток [1].

В данной работе проведено изучение свойств мезенхимальных стромальных клеток (МСК) при монослойном и объемном культивировании в составе трехмерных матриц-носителей различной природы.

В работе использовали МСК, выделенные из различных источников. Исследования были одобрены Биоэтическим комитетом ИПКиК НАН Украины.

Культивирование клеток проводили в среде α -MEM («Sigma», США), дополненной 10% эмбриональной сыворотки (ЭС) крови крупного рогатого скота («Биолот», Россия), 2 мМ *L*-глутамина, 50 ед./мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности.

Метаболическую и пролиферативную активность клеток оценивали с использованием Alamar Blue- и МТТ-тестов.

Иммунофенотипические исследования проводили методом проточной цитометрии при окрашивании клеток на CD29, CD34, CD73, CD90, CD105.

Для индукции остеогенеза применяли среду α -MEM, содержащую 10% ЭС, 0,1 мкМ дексаметазона, 0,05 мМ аскорбиновой кислоты, 10 мМ глицеролфосфата. Остеогенез выявляли по экспрессии щелочной фосфатазы и наличию минерализации внеклеточного матрикса (окрашивание по von Kossa).

Tissue engineering is an interdisciplinary field of biotechnology based on the principles of biology, chemistry, medicine and technical sciences, and is directed to the development of biological equivalents *in vitro* to recover and maintain the functions of tissues and organs *in vivo*. This direction includes several basic components: the selection of biocompatible carriers enabling cell adhesion, proliferation and differentiation as well as selection of adequate type and source of cells [1].

This research was directed to the assessment of the properties of mesenchymal stromal cells (MSCs) during 2D and 3D culture within scaffolds of different nature.

The investigation was performed using MSCs isolated from different sources. The studies were approved by the Committee on Bioethics of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Cell culturing was performed in α -MEM (Sigma, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Biolog, Russia), 2 mM of *L*-glutamine, 50 units/ml of penicillin and 50 mg/ml of streptomycin under 37°C, 5% CO₂ and of 95% humidity.

Cell metabolic and proliferative activity was assessed by Alamar Blue- and MTT-tests.

Immunophenotypic analysis was carried-out by flow cytometry with staining the cells for CD29, CD34, CD73, CD90, CD105.

Induction of osteogenesis was made in α -MEM medium containing 10% FBS, 0.1 mM of dexamethasone, 0.05 mM of ascorbic acid, 10 mM of glycerol-phosphate. Osteogenesis was revealed by expression of alkaline phosphatase and presence of extracellular matrix mineralization (staining according to von Kossa method).

Adipogenesis induction was prepared in α -MEM medium with 0.5 mM of 3-isobutyl-1-methyl-xanthine,

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-30-34, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: yu.a.petrenko@gmail.com

[#] Данное исследование было представлено на мини-симпозиуме «День стволовой клетки», проходившем 22 мая 2012 года в г. Харькове.

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

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3034, fax: +380 57 373 3084, e-mail: yu.a.petrenko@gmail.com

[#] This research was presented at minisymposium Stem Cell Day, held in Kharkov, Ukraine, on the 22nd of May, 2012.

Индукцию адипогенеза проводили в среде α -MEM, содержащей 0,5 мМ 3-изобутил-1-метил-ксантина, 1 мкМ дексаметазона («Sigma-Aldrich», США), 10 мкг/мл инсулина и 100 мкМ индометацина («Sigma-Aldrich»). Адипогенную дифференцировку клеток определяли по накоплению внутриклеточных нейтральных липидов (окрашивание Oil Red O и нильским красным).

Хондрогенную дифференцировку проводили после перевода клеточной суспензии в плотный осадок и последующего его культивирования в присутствии TGF- β 3 (10 нг/мл).

В качестве трехмерных носителей использовали широкопористые криогелевые скаффолды на основе альгината и агарозы (ИНЭОС РАН, Москва), углеродные волокна на основе каталитических осадков углерода (ННЦ «ХФТИ», Украина), а также композитные osteoconductive материалы на основе гидроксиапатита «Колапол» («Полистом», Россия), «Стимул-Осс» («Белкозин», Россия), «Bio-Oss[®]» («Geistlich», Германия) и «OssaBase[®]-HA» («LASAK Ltd.», Чешская республика).

При культивировании МСК в составе широкопористых криогелевых скаффолдов на основе агарозы или альгината адгезия клеток не наблюдалась, что потребовало модификации трехмерных матриц. Использовали 2 метода модификации носителей – механическое введение в состав носителей желатина либо химическое присоединение желатина к поверхности пор носителя. Установлено, что механическое введение желатина не влияло на адгезивные свойства матрицы, клетки формировали агрегаты и не пролиферировали. В то же время химическое присоединение желатина к поверхностям пор носителей значительно улучшало их адгезивные свойства – клетки распластывались и пролиферировали в объеме носителей, при этом пролиферативные свойства не отличались от монослойной культуры [2, 3]. Дальнейшие исследования показали, что МСК сохраняют способность к направленной дифференцировке в адипо-, остео- и хондрогенном направлениях при объемном культивировании в составе модифицированных широкопористых альгинатных матриц [2], а также способны к адипогенной дифференцировке в составе матриц на основе агарозы [3].

Отдельная серия экспериментов была проведена для оценки биосовместимости и адгезивных свойств osteoconductive носителей на основе гидроксиапатита и коллагена «Колапол», «Стимул-Осс», «Bio-Oss[®]» и «OssaBase[®]-HA». Выявлено, что губки «Колапол», гранулы «OssaBase[®]-HA» и «Bio-Oss[®]» не влияли на жизнеспособность и метаболическую активность МСК, а губки «Стимул-Осс» вызывали дегенеративные изменения в клетках при совместном культивировании. При заселении губок «Колапол», гранул

1 mM of dexamethasone (Sigma-Aldrich, USA), 10 g/ml of insulin and 100 M of indomethacine (Sigma-Aldrich). Adipogenic differentiation was revealed by accumulation of intracellular neutral lipids (staining with Oil Red O and Nile Red).

Chondrogenic differentiation was performed after sedimentation of cell suspension and following culturing with TGF- β 3 (10 ng/ml).

As 3D scaffolds the macroporous alginate and agarose cryogel scaffolds (A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences, Moscow), carbon fibers based on carbon catalytic deposits (National Science Center Kharkov Institute of Physics and Technology, Ukraine) as well as the composite osteoconductive materials based on hydroxyapatite: Kolapol (Polistom, Russia), Stimul-Oss (Belkozine, Russia), Bio-Oss[®] (Geistlich, Germany), and OssaBase[®]-HA (LASAK Ltd., Czech Republic) were applied.

Culturing of MSCs in macroporous agarose and alginate cryogel scaffolds did not result in cell adhesion, determining the necessity for the modification of 3D matrices. Two methods of scaffold modification were applied: mechanical introduction of gelatin into carriers or chemical coupling of gelatin to the carrier pore surface. It was established that mechanical introduction of gelatin did not affect the adhesive properties of the matrix, the cells formed aggregates and did not proliferate. At the same time the chemical coupling of gelatin to the pore surfaces of the carriers significantly improved their adhesive properties: the cells flattened and proliferated inside the scaffolds, thereat the proliferative properties did not differ from MSCs during the monolayer culture [2, 3]. Further investigations showed that MSCs preserved the ability to a directed differentiation towards adipo-, osteo- and chondrogenic lineages during 3D culturing inside the modified macroporous alginate matrices [2] as well as they were able for adipogenic differentiation inside agarose-based matrices [3].

Separate set of the experiments was performed to estimate biocompatibility and adhesive properties of osteoconductive carriers based on the hydroxyapatite and collagen: Colapol, Stimul-Oss, Bio-Oss[®], OssaBase[®]-HA. We have revealed that the sponges Colapol, granules OssaBase[®]-HA and Bio-Oss[®] did not affect the viability and metabolic activity of MSCs, however the sponges Stimul-Oss caused degenerative changes in the cells during co-culturing. Under culture inside the sponges Colapol, granules OssaBase[®]-HA and Bio-Oss[®] the MSCs attached to the carrier's surface, flattened and proliferated during culturing, that testified to the perspective of application of these materials for development of bioengineered constructs using MSCs to recover bone defects in maxillofacial surgery and dentistry.

Application of carbon materials as 3D carriers for mesenchymal stromal cells is promising for tissue engi-

OssaBase®-НА и Bio-Oss® МСК прикреплялись к поверхностям носителя, распластывались и пролиферировали в ходе культивирования, что свидетельствовало о перспективности применения этих материалов для разработки биоинженерных конструкций с использованием МСК для восстановления костных дефектов в челюстно-лицевой хирургии и стоматологии.

Использование углеродных материалов в качестве трехмерных носителей для мезенхимальных стромальных клеток является перспективным для тканевой инженерии костной или хрящевой ткани, однако поведение и свойства МСК при объемном культивировании в составе углеродных скаффолдов изучены недостаточно. В наших экспериментах по культивированию МСК на углеродных волокнах на основе каталитических осадков углерода клетки адгезировали к поверхностям волокон, распластывались и пролиферировали, формируя мембраны между близлежащими волокнами. После проведения направленной хондрогенной дифференцировки МСК было выявлено накопление внеклеточного матрикса, позитивного по окраске альциановым синим. Таким образом, углеродные волокна на основе каталитических осадков углерода являются биосовместимым по отношению к МСК материалом, позволяющим обеспечить адгезию, пролиферацию, распределение и индуцированную дифференцировку клеток в трехмерном носителе, что свидетельствует о перспективности его использования в тканевой инженерии [4].

Одним из важнейших этапов создания биоинженерных конструкций является выбор метода заселения трехмерного носителя клетками, поскольку особенности распределения клеток по объему матрицы в дальнейшем определяют успешность формирования полноценной ткани. Нами было проведено сравнительное исследование локализации, распределения, метаболической активности и поверхностных свойств МСК при статическом и перфузионном заселении широкопористых альгинатных криогелей. Для выполнения перфузионного метода заселения использовали 2 шприца объемом 1 мл, соединенных между собой эластичной пластиковой трубкой. В один из шприцов помещали пористый альгинатный носитель, диаметр которого совпадал с внутренним диаметром шприца. Во второй шприц помещали суспензию клеток, после чего путем поочередных мягких поступательно-возвратных туров поршней шприцов медленно насыщали носитель клетками [5]. Предложенная перфузионная система заселения МСК в широкопористые губки на основе альгинатного криогеля позволяла быстро и равномерно распределить клетки по всему объему носителя, сохраняя при этом их функциональные и морфологические свойства.

Таким образом, в работе рассмотрены пролиферативно-дифференцировочные свойства мезенхи-

neering of bone and cartilaginous tissues, but the behavior and properties of MSCs during 3D culturing within carbon scaffolds have been studied insufficiently.

During the culturing of MSCs on carbon fibers based on the carbon catalytic deposits the cells adhered to the fibers surfaces, flattened and proliferated forming the membranes between neighboring fibers. After performing the directed chondrogenic differentiation the accumulation of extracellular matrix positive by alcian blue was revealed. Thus the carbon fibers based on carbon catalytic deposits are biocompatible with MSCs materials that can provide the adhesion, proliferation, allocation and induced differentiation of cells inside the 3D carrier that attests its prospect application in tissue engineering [4].

One of the most important stages in the development of bioengineered constructs is the selection of method for seeding cells to the 3D carriers, since the peculiarities of cell allocation within the matrix volume determine the success of following formation of functional tissue. The comparative study of localization, allocation, metabolic activity and surface properties of MSCs after their static and perfusion seeding to macroporous alginate cryogels was prepared.

The perfusion seeding was performed using two 1 ml syringes connected together with elastic plastic pipe. One of the syringes contained porous alginate carrier, with diameter equal to the inner diameter of the syringe. The cell suspension was supplied from the second syringe to slowly enrich the carrier with cells by repeated mild back-and-forward syringe plunger movements [5]. The suggested perfusion system for seeding of MSCs into macroporous alginate cryogel sponges enabled the rapid and homogeneous allocation of cells within the whole volume of a carrier preserving their functional and morphological properties.

Hereby this investigation outlined the proliferative-differential properties of mesenchymal stromal cells during 3D culturing inside the carriers of different structure and nature as well as demonstrated several methods of the improvement of 3D culturing technique. These data may serve as the basis for the development of different tissue bioequivalents utilizing tissue engineering approaches.

The investigation was supported by the grant of President of Ukraine for young scientists Nr. GP/F36/123.

References

1. Langer R., Vacanti J.P. Tissue engineering // Science. – 1993. – Vol. 260, N5110. – P. 920–926.
2. Petrenko Y.A., Ivanov R.V., Petrenko A. Y., Lozinsky V.I. Coupling of gelatin to inner surfaces of pore walls in spongy alginate-

мальных стромальных клеток при объемном культивировании в составе трехмерных носителей различной структуры и природы, а также описаны некоторые методические приемы, позволяющие совершенствовать технику объемного культивирования. Эти данные могут послужить основой для разработки биоэквивалентов различных тканей с использованием подходов тканевой инженерии.

Данное исследование проведено при поддержке Гранта Президента Украины для молодых ученых №GP/F36/123.

Литература

1. Langer R., Vacanti J.P. Tissue engineering // Science. – 1993. – Vol. 260, №5110. – P. 920–926.
2. Petrenko Y.A., Ivanov R.V., Petrenko A.Y., Lozinsky V.I. Coupling of gelatin to inner surfaces of pore walls in spongy alginate-based scaffolds facilitates the adhesion, growth and differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 2011. – Vol. 22, №6. – P. 1529–1540.
3. Petrenko Y.A., Petrenko A.Y., Damshkaln L.G., et al. Growth and adipogenic differentiation of mesenchymal stromal bone marrow cells during culturing in 3D macroporous agarose cryogel sponges // Bull. Exp. Biol. Med. – 2008. – Vol. 146, №1. – P. 129–132.
4. Petrenko Y.A., Gurin I.V., Volkova N.A. et al. The use of catalytic carbon deposits as 3D carriers for human bone marrow stromal cells // Bull. Exp. Biol. Med. – 2011. – Vol. 151, №4. – P. 539–542.
5. Petrenko Y.A., Ivanov R.V., Lozinsky V.I., Petrenko A.Y. Comparison of the methods for seeding human bone marrow mesenchymal stem cells to macroporous alginate cryogel carriers// Bull. Exp. Biol. Med. – 2011. – Vol. 150, №4. – P. 543–546.

Accepted 01.06.2012

Поступила 01.06.2012