

Ю.Б. Басок, А.М. Григорьев, Л.А. Кирсанова, А.Д. Кириллова, В.И. Севастьянов

Перфузионный биореактор для длительного исследования динамики формирования тканевых эквивалентов

Аннотация

Представлены результаты по модифицированию перфузионного биореактора, предназначенного для формирования тканевых эквивалентов в условиях длительного культивирования с возможностью оксигенации среды. Конструкция устройства позволяет исследовать морфологию клеточно-инженерных конструкций на четырех сроках культивирования в условиях потока, а также в постоянном режиме проводить мониторинг pH, содержания O₂, CO₂ и основных метаболитов в культуральной среде на протяжении всего эксперимента. Функциональная эффективность биореактора подтверждена на примере «выращивания» тканевого эквивалента хряща в течение 25 суток с сохранением жизнеспособности клеточной культуры, постоянных значений основных параметров и стерильности культуральной среды.

Введение

В организме все органы подвергаются воздействию биомеханических сил, таких как направленное сжатие, растяжение, сила сдвига, гидростатическое давление, причем для каждого органа комплекс воздействий индивидуален [1]. В связи с этим для создания функционально активных клеточно-инженерных конструкций (КИК), основными элементами которых являются клетки и клеточные носители (матрикс, скаффолды), необходимо как можно точнее воспроизвести не только биохимические, но и биомеханические стимулы, обеспечивающие жизнедеятельность клеток [2]-[4]. Для имитации физических воздействий *in vitro* используют специальные устройства – биореакторы [4]-[6].

Для стабильной и эффективной работы биореактор должен соответствовать следующим требованиям: биосовместимость и антикоррозийность элементов, герметичность, совместимость с различными клеточными носителями, экономич-

ность расходования культуральных сред, режим потока, непрерывный контроль условий культивирования. Кроме того, анализ динамики формирования тканевого эквивалента в процессе культивирования в биореакторе возможен лишь при независимом изъятии КИК из системы циркуляции. Важным аспектом является и возможность длительного проведения эксперимента, что связано с высоким риском контаминации.

За последнее десятилетие были разработаны усовершенствованные биореакторы, позволяющие поддерживать устойчивые и воспроизводимые условия, соответствующие физиологической клеточной нише *in vivo*. Отметим, что усложнение системы приводит к приближению условий к естественным, а упрощение делает устройство более надежным. В связи с этим актуальной выглядит задача поиска компромисса между простотой биореактора и функциональными параметрами желаемого конечного продукта [7]. Одним из наиболее подходящих объектов для валидации конструкции биореактора является хондрогенная дифференцировка мезенхимальных стромальных

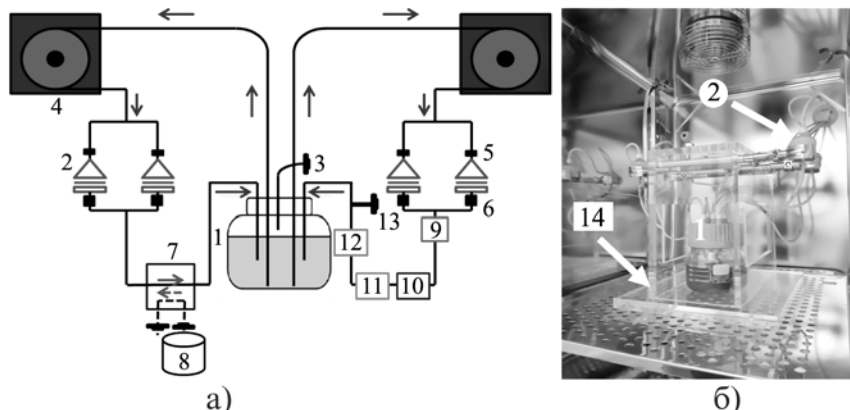


Рис. 1. Перфузионный биореактор: а) система циркуляции; б) штатив для крепления культуральных камер; 1 – резервуар с культуральной средой; 2 – культуральная камера; 3 – стерильный фильтр; 4 – перистальтический насос; 5, 6 – коннекторы; 7 – оксигенатор; 8 – баллон с газовой смесью; 9 – датчик давления; 10 – датчик O₂; 11 – датчик CO₂; 12 – датчик pH; 13 – блок отбора проб; 14 – штатив для крепления культуральных камер

клеток (МСК), так как она представляет собой длительный процесс и механотрансдукция играет важную роль в формировании нормального фенотипа хондроцитов [8], [9]. Ранее разработанный перфузионный биореактор позволял культивировать до 14 суток параллельно 4 образца КИК без возможности их независимого изъятия из системы циркуляции и мониторинга параметров культуральной среды [10]. Однако культивирование более 14 суток предполагает многократную замену культуральной среды, что увеличивает риск контаминации и попадания воздуха в магистраль.

Цель работы состояла в модифицировании конструкции перфузионного биореактора для проведения длительных исследований с возможностью оксигенации культуральной среды и ее замены без контакта с воздухом.

Материалы и методы

Модифицированный вариант перфузионного биореактора представлен на *рис. 1а*. Его существенными преимуществами по сравнению с прототипом [10] являются: наличие датчиков O_2 , CO_2 , pH, блока отбора проб и оксигенатора, подключенного к баллону с газовой смесью. Было уменьшено количество резервуаров с дорогостоящей культуральной средой при сохранении числа включенных параллельно в систему циркуляции культуральных камер. Блок отбора проб позволяет исследовать образцы культуральной среды и заменять ее в стерильных условиях. Культуральные камеры и резервуар со средой помещали в инкубатор, где поддерживали температуру 37 °С, относительную влажность – 90...100 %, содержание CO_2 – 5 % и O_2 – 20 %.

За узлом, соединяющим две культуральные камеры, по направлению течения среды расположен оксигенатор «Nemofilter D150» («Medica S.p.a.», Италия), сообщающийся с баллоном с газовой смесью и атмосферой через стерильные фильтры. На параллельной магистрали были установлены последовательно: датчик давления («PendoTECH», США), датчик O_2 , датчик CO_2 , датчик pH (все – «PolestarTechnologies», США) и блок отбора проб. Для упорядоченного размещения элементов биореактора в инкубаторе и облегчения доступа к культуральным камерам и резервуару с культуральной средой был разработан штатив для крепления культуральных камер (*рис. 1б*).

Функциональную эффективность модифицированного биореактора исследовали в эксперименте по хондрогенной дифференцировке МСК жировой ткани человека (МЧК ЖТч) в составе КИК. Для экспериментов брали клетки 3-го пассажа, выделенные и культивированные в полной ростовой среде (ПРС) по стандартной методике [10]. В качестве матрикса был выбран биополимерный микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ) «Сферо@ГЕЛЬ» (АО «Биомир сервис», Россия). Ранее была показана способность БМКГ поддерживать хондрогенную дифференцировку МСК ЖТч [11]. В качестве индуктора хондрогенной дифференцировки использовали TGF- β 1 («PerproTech», США). Замену среды осуществляли каждые 7 суток.

Схема получения тканевого эквивалента хряща включала в себя несколько этапов. В 1-е сутки каждую КИК, содержащую 1 мл БМКГ и 6×10^6 МСК ЖТч в 0,5 мл ПРС, помещали в культуральную камеру биореактора и инкубировали в течение суток без потока. На 2-е сутки камеры с КИК помещали в систему циркуляции биореактора при скорости потока 1,0 мл/мин. На 4-е сутки среду заменяли на дифференцировочную. На 4-е, 11-е, 18-е и 25-е сутки КИК извлекали из био-

реактора и отбирали пробы культуральной среды для мониторинга микробной контаминации по стандартной методике методом посева на триптиказо-соевый бульон. На 18-е и 25-е сутки определяли глюкозу на анализаторе «KonelabPrime 60i» («ThermoFisher Scientific», Финляндия).

Морфологию образцов оценивали окрашиванием гематоксилином и эозином и альциановым синим. Жизнеспособность клеток определяли методом флуоресцентного окрашивания Calcein AM («Life Technologies», США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием «Microsoft Excel». Для определения достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Были проведены испытания модифицированного перфузионного биореактора, включающего в себя четыре независимые культуральные камеры, заполненные модельным раствором. Задачей было проверить способность биореактора обеспечивать оксигенацию среды, контроль содержания O_2 , CO_2 и pH культуральной среды.

Табл. 1 демонстрирует эффективность использования блока насыщения культуральной среды в системе циркуляции биореактора газами и датчиков содержания O_2 , CO_2 и pH при заполнении как модельным раствором (вода), так и питательной средой Дульбекко. Отметим, что для ряда клеточных культур принципиальное значение имеет насыщение культуральной среды газами: например, гипероксия (O_2 40 %) увеличивала активность цикла мочевины и цитохрома P450, синтез желчных кислот и выведение аммиака на 165...266 % у клеток гепатомы человека линии НераRG [12].

В эксперименте по формированию тканевого эквивалента хряща дополнительное насыщение культуральной среды газами не проводили, так как хондрогенную дифференцировку МСК проводят при стандартных условиях культивирования (CO_2 5 %, O_2 20 %) [13]. После первых суток эксперимента клетки прикреплялись к БМКГ, распластывались (*рис. 2*).

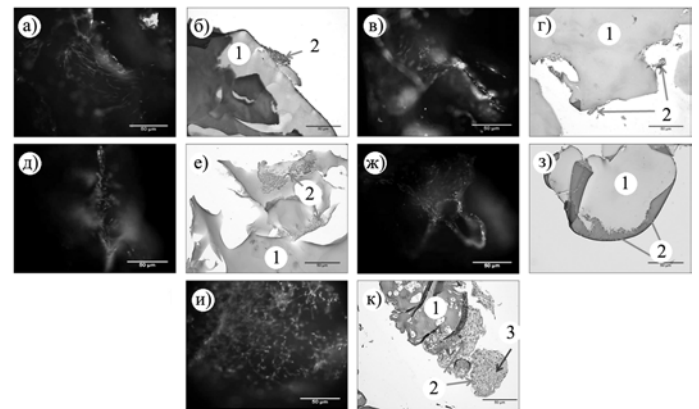


Рис. 2. Динамика хондрогенной дифференцировки МСК ЖТч при культивировании на БМКГ в условиях потока со скоростью 1,0 мл/мин: окрашивание флуоресцентным красителем Calcein AM (а, в, д, ж, и); окрашивание гематоксилином и эозином (б, г, е, з, к); 1-е сутки (а, б); 4-е сутки (в, г); 11-е сутки (д, е); 18-е сутки (ж, з); 25-е сутки (и, к); 1 – БМКГ; 2 – клетки; 3 – структуры, схожие с микросферами. Размер масштабной линейки – 50 мкм

Таблица 1

Концентрация O_2 , CO_2 и pH в системе биореактора до и после насыщения жидкости газовой смесью с 5 % CO_2

Описание среды в системе циркуляции биореактора	O_2 , %	CO_2 , %	pH
Вода	20,4 ± 0,3	0,0	6,37 ± 0,01
Вода + насыщение жидкости газовой смесью с содержанием CO_2 5 %	21,2 ± 0,2	4,9 ± 0,1	6,34 ± 0,01
Питательная среда для культивирования DMEM	17,8 ± 0,5	0,0	7,84 ± 0,03
Питательная среда для культивирования DMEM + насыщение жидкости газовой смесью с содержанием CO_2 5 %	20,5 ± 0,3	5,1 ± 0,1	7,62 ± 0,01

Окрашивание красителем Calcein AM выявило наличие живых клеток на поверхности БМКГ во всех КИК (рис. 2а, в, д, ж, и). В течение 4-х суток культивирования в ПРС клеточная масса на поверхности гидрогеля была незначительной (рис. 2б, з). После замены ПРС на дифференцировочную наблюдали рост клеток (рис. 2е, з, к), а к 25-м суткам активную наработку ВКМ, что доказывало как пролиферативную, так и функциональную активность (рис. 2к). Также в препаратах определяли клетки с лакунообразной структурой – молодые хондроциты (рис. 2к). Клетки располагались на поверхности и в объеме матрикса. Положительное окрашивание на гликозаминоглики (ГАГ) появилось на 11-е сутки. Используя программу «ImageJ» («НИН», США) по микрофотографиям гистологических препаратов ($n = 10$) рассчитывали соотношение площади ВКМ, положительно окрашенного на ГАГ, к количеству клеток (КК). Активность наработки клетками ГАГ увеличилась с 18-х по 25-е сутки [(107 ± 24) и (224 ± 65) мкм²/КК соответственно], что указывает на дифференцировку МСК ЖТч в хондрогенном направлении.

Контроль pH культуральной среды является важным и информативным параметром. Накопление метаболитов, например лактата, и использование бессывороточных сред, лишенных буферного воздействия сыворотки, ведет к его снижению [14]. Изменение pH может указывать на контаминацию. pH культуральной среды во время эксперимента значимо не менялся, находясь в пределах 7,5 ± 0,5, как и содержание O₂ и CO₂ (19 и 0 %). Содержание глюкозы в среде является индикатором уровня метаболизма клеток и указывает на необходимость замены среды. Уровень глюкозы сохранялся постоянным: на 18-е сутки он составил (24 ± 1) ммоль/л, на 25-е сутки – (23 ± 1) ммоль/л.

Микробиологическое исследование образцов среды подтвердило способность конструкции биореактора предупреждать попадание бактерий в культуральную среду.

На 21-е сутки культивирования МСК ЖТч проявили высокую пролиферативную активность, приобрели характерную для хондроцитов морфологию и синтезировали ВКМ, содержащий ГАГ, что свидетельствует о формировании тканевого эквивалента хряща. Кроме того, настоящее исследование явилось валидацией разработанного биореактора и продемонстрировало возможность его использования в долговременных экспериментах (не менее 25 суток) по «выращиванию» 4 КИК в одинаковых условиях с возможностью их независимого изъятия.

Выводы

Таким образом, показано, что модифицированный биореактор в условиях потока позволяет длительно (не менее 25 суток) культивировать и независимо анализировать процессы формирования тканевых эквивалентов в четырех культуральных камерах при сохранении стерильности, мониторинге таких параметров культуральной среды, как значение pH, концентрация газов и уровень основных метаболитов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-15-00251, <https://rscf.ru/project/21-15-00251/>.

Список литературы:

1. Ravichandran A., Liu Y., Teoh S.H. Review: Bioreactor design towards generation of relevant engineered tissues: Focus on clinical translation // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2018. Vol. 12. № 1. PP. e7-e22.
2. Pennarossa G., Arcuri S., De Iorio T., Gandolfi F., Brevini T.A.L. Current advances in 3D tissue and organ reconstruction // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22. № 2. P. 830.
3. Гуллер А.Е., Гребенюк П.Н., Шехтер А.Б., Звягин А.В., Деев С.М. Тканевая инженерия опухолей с использованием биореакторных технологий // *Acta Naturae* (русскаяязычная версия). 2016. Т. 8. № 3 (30). С. 49-65.
4. Басок Ю.Б., Севастьянов В.И. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины в лечении дефектов хря-

щевой ткани суставов // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2016. Т. 18. № 4. С. 102-122.

5. Princz S., Wenzel U., Tritschler H., Schwarz S., Detmann C., Rotter N., Hessling M. Automated bioreactor system for cartilage tissue engineering of human primary nasal septal chondrocytes // *Biomed. Tech.* 2017. Vol. 62. № 5. PP. 481-486.
6. Nazempour A., Quisenberry C.R., Abu-Lail N.I., Van Wie B.J. Combined effects of oscillating hydrostatic pressure, perfusion and encapsulation in a novel bioreactor for enhancing extracellular matrix synthesis by bovine chondrocytes // *Cell Tissue Res.* 2017. Vol. 370. № 1. PP. 179-193.
7. Selden C., Fuller B. Role of bioreactor technology in tissue engineering for clinical use and therapeutic target design // *Bioengineering (Basel).* 2018. Vol. 5. № 2. P. 32.
8. Wang N., Tytell J.D., Ingber D.E. Mechanotransduction at a distance: Mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009. Vol. 10. № 1. PP. 75-82.
9. Aprile P., Kelly D.J. Hydrostatic pressure regulates the volume, aggregation and chondrogenic differentiation of bone marrow derived stromal cells // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021. Vol. 303. P. 619914.
10. Севастьянов В.И., Басок Ю.Б., Григорьев А.М., Кирсанова Л.А., Василец В.Н. Перфузионный биореактор для создания тканеинженерных конструкций // *Медицинская техника.* 2017. Т. 303. № 3. С. 9-11.
11. Sevastianov V.I., Basok Yu.B., Grigoriev A.M., Kirsanova L.A., Vasilets V.N. Application of tissue engineering technology for formation of human articular cartilage in perfusion bioreactor // *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs.* 2017. Vol. 19. № 3. PP. 81-92.
12. Van Wenum M., Adam A., van der Mark V.A., Chang J.C., Wildenberg M.E., Hendriks E.J., Jongejan A., Moerland P.D., van Gulik T.M., Oude Elferink R.P., Chamuleau R., Hoekstra R. Oxygen drives hepatocyte differentiation and phenotype stability in liver cell lines // *J. Cell Commun. Signal.* 2018. Vol. 12. № 3. PP. 575-588.
13. Ciuffreda M.C., Malpasso G., Musarò P., Turco V., Gnechi M. Protocols for in vitro differentiation of human mesenchymal stem cells into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages // *Methods Mol. Biol.* 2016. Vol. 1416. PP. 149-158.
14. Meenakshi A. Cell culture media: A review // *Mater. Methods.* 2013. Vol. 3. PP. 175-203.

Юлия Борисовна Басок,

д-р биолог. наук, зав. отделом,

Алексей Михайлович Григорьев,

канд. биолог. наук, ст. научный сотрудник,

Людмила Анфилофьевна Кирсанова,

канд. биолог. наук, ст. научный сотрудник,

Александра Дмитриевна Кириллова,

канд. биолог. наук, лаборант-исследователь,

отдел биомедицинских технологий

и тканевой инженерии,

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр

трансплантологии и искусственных органов

им. акад. В.И. Шумакова» Министерства

здравоохранения Российской Федерации,

Виктор Иванович Севастьянов,

д-р биолог. наук, профессор, гл. специалист,

отдел подготовки научных

и медицинских кадров,

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр

трансплантологии и искусственных органов

им. акад. В.И. Шумакова» Министерства

здравоохранения Российской Федерации,

АНО «Институт медико-биологических

исследований и технологий»,

г. Москва,

e-mail: bjb2005@mail.ru