

УДК 616.1.9-055.5

©Коллектив авторов

## КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ НА ПОЛИМЕРНЫХ ПЛЕНКАХ

*М.С. Долгих\*, Д.Н. Ливак, М.Е. Крашенинников, Н.А. Онищенко*

ФГУ Научно-исследовательский институт трансплантологии и искусственных органов Росмедтехнологий, Москва, Щукинская, 1;  
тел.: 499-190-45-31, 499-190-42-67; эл. почта: marindolgik@ya.ru

При культивировании мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (ММСК КМ), а также клеток линий А-431, MDCK, Vero, 3Т3, 373 и Нер-G<sub>2</sub> в среде ДМЕМ на полимерных пленках в качестве подложек, синтезированных на основе поливинилового спирта (ПВС) с привязкой различных жирных кислот и имеющих различную гидрофобность, было показано, что различные типы клеток способны расти на этих пленках с разной интенсивностью, в большинстве случаев соизмеримой с контролем культивации на пластике.

**Ключевые слова:** подложки, культивирование, поливиниловый спирт (ПВС), клетки костного мозга, клеточные линии.

**ВВЕДЕНИЕ.** В последнее время большое внимание уделяется развитию клеточных технологий и методов тканевой инженерии с целью их применения для репарации поврежденных органов и тканей. Особенно важное значение приобретает разработка этих технологий в связи с дефицитом органов для трансплантации во всём мире, а также в связи с необходимостью иммуносупрессии реципиента из-за возможности развития реакции отторжения трансплантата.

Клеточные технологии включают экстракорпоральную искусственную печень, клеточную трансплантацию и тканевую инженерию. Во всех случаях необходимым требованием является адекватная поддержка выживания клеток и обеспечение стабильности их специфических функций.

В случае лечения острой печеночной недостаточности, в том числе после объёмной гепатэктомии при онкологических операциях, уже давно используются методы экстракорпоральной терапии, когда кровь больного пропускают через биоискусственную печень, в которой активным началом служат ауто-, алло- или ксено-гепатоциты. Делаются попытки создания генно-изменённых ксенотрансплантатов, однако эти работы пока носят экспериментальный характер [1-4].

Активно изучаются стволовые клетки и возможности их применения для терапии различных наследственных и приобретенных заболеваний. Хотя экспериментальные разработки идут очень интенсивно, клиническое применение клеточных технологий пока носит ограниченный характер. Получены первые успешные клинические результаты терапии с помощью стволовых клеток (гемопоетической и мезенхимальной природы) сердечно-сосудистых заболеваний [5], ожогов [6] и костных нарушений [7]. Есть попытки применения генно-клеточной терапии для лечения тяжелых наследственных поражений [8], лечения печеночной недостаточности и диабета [9, 10].

В последние годы активно разрабатываются культуральные модели, основанные на особенностях архитектуры органа, для воссоздания сложного

---

\* - адресат для переписки

микроокружения клеток, экстрацеллюлярного матрикса и обеспечения межклеточного взаимодействия. Многослойные культуры (sandwich cultures) имитируют микроокружение гепатоцитов *in vivo* путем внедрения клеток между слоями коллагенового геля. Для имитации межклеточного взаимодействия, улучшающего выживаемость и функциональность клеток, применяют создание сфероидных агрегатов, в том числе клеток разного типа [2-4, 11].

Создание биоинженерной ткани требует использования большого количества клеток, но это требование трудно удовлетворить при работе с дифференцированными клетками, которые обладают ограниченным числом удвоений в культуре. Решением этой проблемы может быть использование стволовых клеток или линий ранее дифференцированных клеток. Пространственное микроокружение клеток играет важную роль в пролиферации и дифференцировке стволовых клеток. Подложки, состоящие из различных материалов - металлов и других природных материалов, а также синтетических полимеров - организуют стволовые клетки в сложные пространственные группы, которые имитируют природную ткань. Клеточные сигналы от ковалентно связанных лигандов и медленно выделяющихся регуляторных факторов в подложках определяют судьбу стволовых клеток. Будущие достижения в клеточной биологии и прогресс в дизайне подложек (матриков), несомненно, улучшат эффективность заместителей ткани в качестве имплантатов и в качестве экстракорпоральных устройств. В настоящее время разрабатываются техника послойной стереолитографии, а также лазерные технологии конструирования матриков, имитирующих конфигурации и свойства биологических структур. Саморегулируемые матриксы способны под действием небольших изменений во внешней среде (рН, температур, концентрации химических веществ, механических нагрузках, при воздействии электромагнитного поля, радиации и т.д.) изменять свои свойства и влиять на поведение клеток [2-4, 11, 12].

Первый класс подложек - металлические подложки, например, титановые волокна, а также керамика, являются биосовместимыми. Но для направленной дифференцировки стволовых клеток металлическую поверхность покрывают природными материалами (экстрацеллюлярный матрикс), стимулирующими дифференцировку в определенный тип клеток. Второй класс подложек - природные органические материалы (гиалуроновая кислота, коллаген, липополисахариды, гиалуронат-желатин, полигидроксibuтират-гидроксивалерат, бактериальные полиэфиры-полиоксидоксиды и др.), обеспечивающие имитацию природного окружения для стволовых клеток. Стволовые клетки костного мозга человека участвуют в регенерации кости в присутствии скелетов морских губок, хрящ образуется на волокнах шелка, а жировая ткань - в желатине. Помимо механической поддержки, природные подложки могут содержать биологические агенты, которые влияют на судьбу стволовых клеток. Например, скелеты морских губок содержат белки клеточной адгезии - фибронектин и тенасцин. Третий класс подложек - синтетические материалы, которые лучше обеспечивают контролируемые механические свойства и деградативность. Это могут быть полимолочная кислота, полигликолевая кислота, полиэтиленгликоль, модернизированные хитозановые мембраны. Самособирающиеся пептидные подложки состоят из супергибких нано-волокон, которые поддерживают дифференцировку, например, предполагаемых прогениторных клеток печени в функциональные гепатоцито-подобные сфероиды. Сополимеры поли-ε-капролактона и полиэтиленгликоля обеспечивают прикрепление, пролиферацию и образование экстрацеллюлярного матрикса стволовых клеток костного мозга человека и крысы, причем полимерная подложка такого типа деградирует на протяжении 60 недель [2, 3, 11-13]. Поливиниловый спирт (Unipoint Ind. High point NC) успешно использовался в работах Kaufman P.M., Uyama S.D. et al. для культивирования и последующей трансплантации гепатоцитов грызунам в качестве модели для терапии заболеваний печени [14, 15].

Поскольку синтетические материалы способны вызывать хронические воспалительные реакции, в последнее время большой интерес проявляется к природным материалам и, в частности, к бактериальным полиэфирам - полиоксисиланоатам [12].

Лигандное связывание и контролируемое выделение регуляторных факторов может улучшить степень контроля пространственной организации и дифференцировки стволовых клеток внутри матрикса. Передовые технологии помогают создавать подложки заданной толщины, с заданным размером пор и с заданной направленной их ориентацией, причем для каждого типа клеток оптимальными являются определенные типы подложек. Например, для воссоздания сердечных клапанов использовали подложку из полигликолевой кислоты, покрытую поли(4-гидроксипропаном) для медленной скорости деградации. Подложки могут стимулировать дифференцировку в определенные типы клеток путем механического воздействия. Например, сжатие способствует образованию хряща, а растяжение - образованию мышечных клеток [16].

Применяют также биоинкапсулирование клеток для организации более функциональных "органов" (например, гепатоцитов) и с целью их изоляции от иммунной системы хозяина. Для этой цели используют альгинат, альгинат-полилизин и полиэлектролитный комплекс альгината натрия, сульфата целлюлозы и поли-(метилена-ко-гуанидин-) гидрохлорида [2, 3, 11, 12].

Цель нашего исследования заключалась в испытании синтетических подложек на основе ПВП и ПВС, обладающих различной гидрофобностью, адгезивностью и физико-химическими свойствами, на которых клетки различных линий могут пролиферировать и формировать монослой.

**МЕТОДИКА.** Для заселения подложек использовали мезенхимальные клетки костного мозга крыс линии Вистар (МСК КМ), а также линии клеток млекопитающих, происходящие из разных зародышевых лепестков: а) из эктодермы - клетки астроцитомы человека 373; б) из мезодермы - фибробласты мышцы 3Т3, эпителий почки обезьяны Vero, эпителий почки собаки MDCK; из энтодермы - гепатома человека Hep-G<sub>2</sub>, аденокарцинома лёгкого человека A-431. Культивирование проводили на среде ДМЕМ или Iscov с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки. После предварительного культивирования на пластике и достижения логарифмической фазы роста клетки пересевали на стерильные подложки. Культивирование проводили под контролем фазово-контрастной микроскопии. По достижении 75-80% заселения на контрольном культуральном пластике без подложки проводили пересев клеток на пленки. Равное количество клеток (составляющее 25-30% от монослоя) высевали на одинаковые по площади, стерилизованные и выдержанные в питательной среде пленки, предварительно помещенные в лунки планшета (24 или 96-луночного фирмы Costar). Часть лунок оставляли без плёнки в качестве контроля.

Предварительно вырезанные и стерилизованные пленки закрепляли на пластике раствором коллагена. Затем приклеенные пленки стерилизовали, заливали бессывороточную культуральную среду и выдерживали в течение ночи (12 часов) для увлажнения и отмывки пленки от растворимых компонентов. Клетки выращивали обычно в течение 4-5 дней, не меняя среды. Если культивирование длилось 7 дней, среду меняли. Через 4-5 дней, когда в контрольной лунке (без пленки) клетки составляли около 80% монослоя, оценивали состояние культур под микроскопом и определяли количество живых клеток измерением митохондриального дыхания стандартным методом Мосман и Монкс, для чего по окончании культивирования раствор после добавления МТТ переносили в другой планшет для измерения, или проводили измерения непосредственно в опытном планшете.

Полимерные плёнки с основой из поливинилового спирта (ПВС) синтезировали в лаборатории РХТУ им. Д.И.Менделеева методом сшивания поливинилового спирта (MW 85000-124000, характеристическая вязкость

## КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК НА ПОЛИМЕРНЫХ ПЛЕНКАХ

28-30 сПз) глутаровым диальдегидом (10 вес.% от ПВС) в водной среде при pH 5 в присутствии добавок жирных кислот в качестве гидрофобизатора (5 вес.% от ПВС). После отливки пленки термостатировали при 90-100°C в течение 2 часов [16]. Влагосодержание пленок оставляет 25-35%. Толщина 100-140 мкм. Прочность при разрыве 7-10 МПа. Плёнки стерилизовали выдерживанием 3-4 часа под УФ.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Необходимо было подобрать матрикс подходящей плотности, удобный в хирургической работе - не сворачивающийся самопроизвольно и пригодный для подшивания, оптически прозрачный под микроскопом, адгезивный и не токсичный для клеток, на котором клетки прикреплялись бы, распластывались и делились с нормальной скоростью, соизмеримой со скоростью деления на культуральном пластике.

Было испытано 11 плёнок на основе поливинилового спирта (ПВС), как без каких-либо привязок, так и с привязками различных многоатомных жирных кислот, обеспечивающих различную гидрофобность. В таблице 1 приведены изученные синтетические пленки на основе поливинилового спирта, их состав, некоторые свойства и результаты культивирования. Результаты опытов показывают, что для разных типов клеток оптимальные результаты культивирования получены на различных пленках, хотя на всех плёнках этого типа рост всех типов клеток был хороший. Для стромальных клеток костного мозга крысы оптимальными оказались плёнки с 5% добавки ундециловой кислоты (98%), затем - с 5% миристиновой кислоты (82,4%), а плёнки с 12% добавки жирных кислот были малоприспособлены для культивирования. В случае клеток линии Нер-G<sub>2</sub> оптимальными для роста оказались плёнки с добавками 5% ундециловой кислоты (94,6%), 12% стеариновой (89,5%) и без добавки жирных кислот (88,6%). Клетки линии А-431 достаточно хорошо росли на всех типах плёнок, причём наилучшей была пленка с 12% стеариновой кислоты, а также плёнки с 5% ундециловой и ундециленовой кислот.

*Таблица 1.* Свойства пленок разных типов на основе поливинилового спирта с различными гидрофобными привязками.

<b>№№ плёнок</b>	<b>Добавка при синтезе</b>	<b>Содерж. добавки, вес. %</b>	<b>Влагосодержание плёнки, вес. %</b>
<b>5</b>	<b>Без добавки</b>	<b>0</b>	<b>28,0</b>
<b>5-30</b>	<b>Ундециленовая к-та</b>	<b>5,0</b>	<b>11,4</b>
<b>5-31</b>	<b>Стеариновая к-та</b>	<b>5,0</b>	<b>10,0</b>
<b>5-32</b>	<b>Ундециловая к-та</b>	<b>5,0</b>	<b>15,2</b>
<b>5-34</b>	<b>Миристиновая к-та</b>	<b>5,0</b>	<b>14,4</b>
<b>59</b>	<b>Лауриновая к-та</b>	<b>5,0</b>	<b>13,3</b>
<b>171</b>	<b>Ундециловая к-та</b>	<b>12,0</b>	<b>7,4</b>
<b>186</b>	<b>Каприновая к-та</b>	<b>12,0</b>	<b>11,7</b>
<b>189</b>	<b>Стеариновая к-та</b>	<b>12,0</b>	<b>7,2</b>
<b>191</b>	<b>Ундециленовая к-та</b>	<b>12,0</b>	<b>9,3</b>
<b>192</b>	<b>Миристиновая к-та</b>	<b>12,0</b>	<b>8,9</b>

В эксперименте ставились параллельные опыты и в каждом опыте на плёнку каждого типа делали по 7 параллельных посевов (7 лунок).

В первой серии опытов использовали культуры клеток линий MDCK, 3T3, Vero и Нер-G<sub>2</sub>. Были апробированы разные схемы постановки опытов и разные серии плёнок. В последующих опытах применялась техника, давшая наилучшие результаты. На рисунках 1-3 приведены сравнительные результаты культивирования некоторых типов клеток на разных плёнках на основе поливинилового спирта (ПВС), полученные в едином опыте с использованием параллельных посевов.

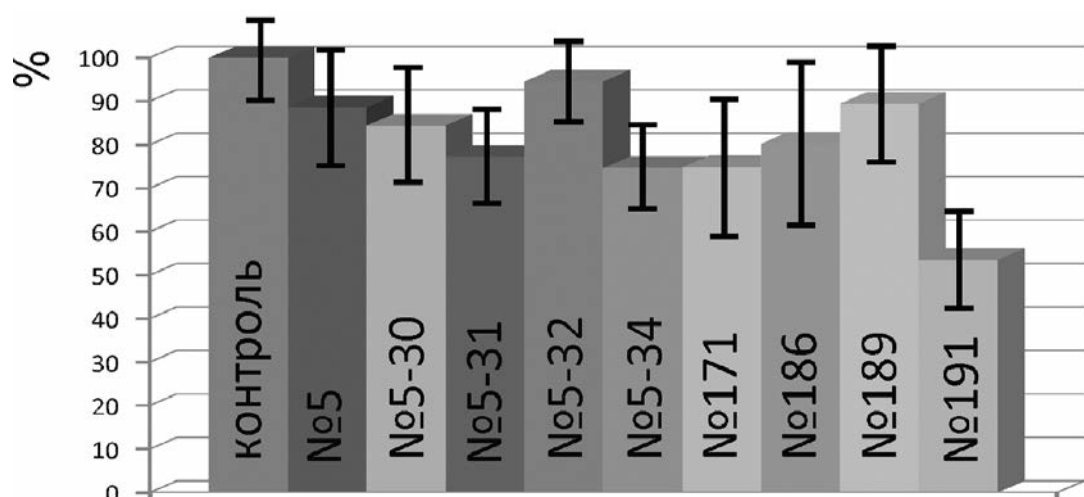


Рисунок 1.

Оценка жизнеспособности клеток линии Нер-G<sub>2</sub> на разных плёнках на основе ПВХ методом МТТ.

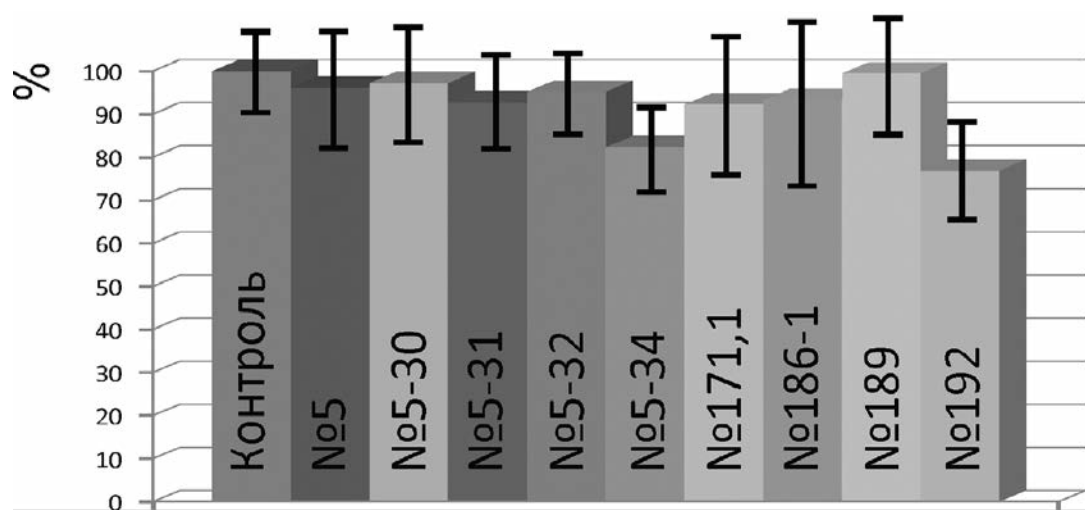


Рисунок 2.

Оценка жизнеспособности клеток линии A431 на разных плёнках на основе ПВХ методом МТТ.

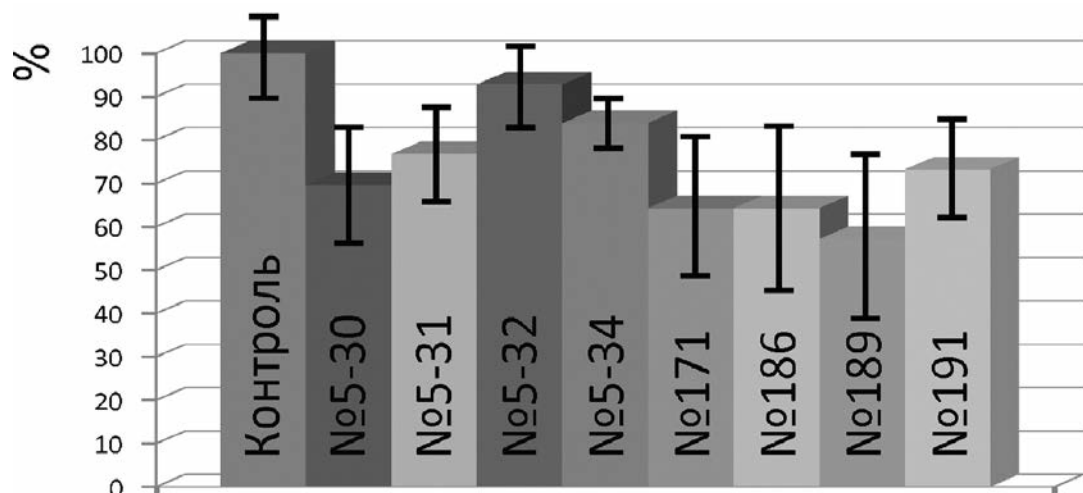


Рисунок 3.

Оценка жизнеспособности клеток костного мозга крыс на разных плёнках на основе ПВХ методом МТТ.



## КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК НА ПОЛИМЕРНЫХ ПЛЕНКАХ

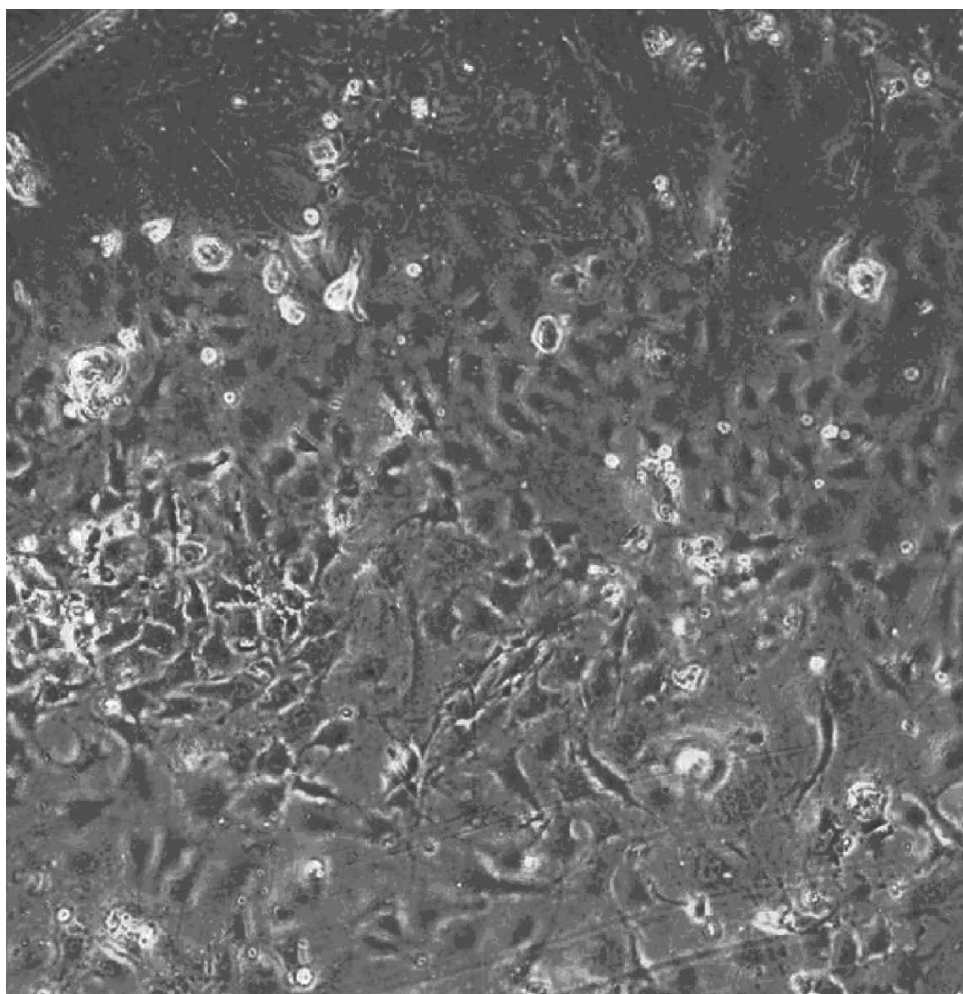
Для статистической обработки данных был применен метод множественных сравнений - критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони (табл. 2).

Таблица 2. Статистическая обработка данных методом множественных сравнений.

Сравнение	Разность средних	t	p<,05
№5-30 и контроль	0,41 - 0,5685 = -0,1585	16,110	Да
№5-31 и контроль	0,438 - 0,5685 = -0,1305	13,264	Да
№5-34 и контроль	0,499 - 0,5685 = -0,0695	7,064	Да
№171 и контроль	0,3795 - 0,5685 = -0,189	19,210	Да
№186 и контроль	0,346 - 0,5685 = -0,2225	22,615	Да
№189 и контроль	0,3455 - 0,5685 = -0,223	22,666	Да
№191 и контроль	0,4345 - 0,5685 = -0,134	13,620	Да

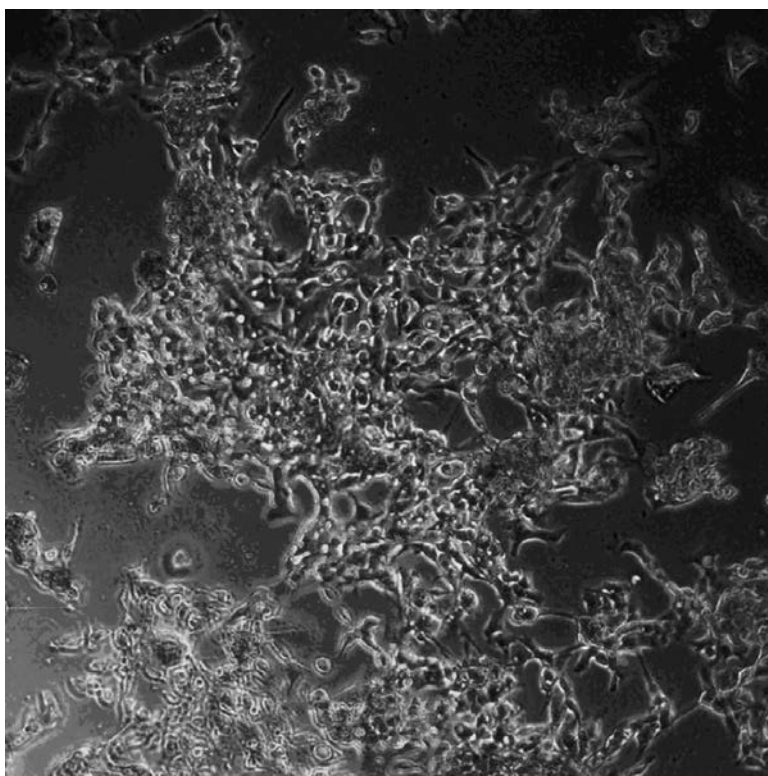
Средние показатели рассчитывались из 7 параллельных опытов.

Некоторая разница полученных результатов объясняется разной физико-химической природой поверхностных клеточных структур. На рисунках 4-6 показано состояние клеточных культур клеток разных типов и их морфология в динамике. Видно, что клетки хорошо прикреплялись, распластывались, пролиферировали и имели характерную морфологию.



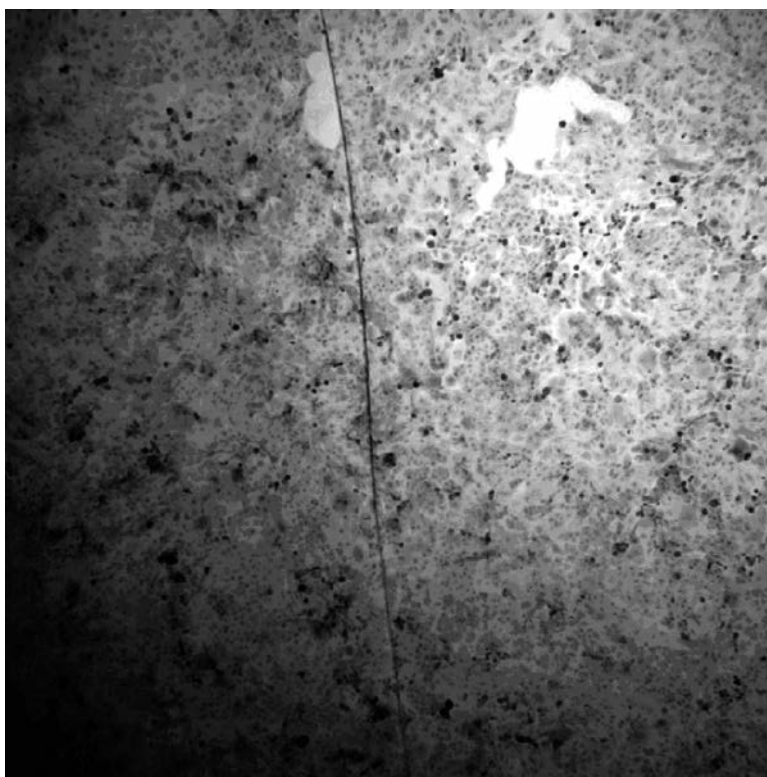
**Рисунок 4.**

Клетки 3ТЗ, 5 дней культивирования на плёнке 5. Увеличение (×100).



**Рисунок 5.**

Культивирование клеток линии Нер- $G_2$  на плёнке 5 в течение 5 дней. Увеличение ( $\times 100$ ).



**Рисунок 6.**

Плёнка 59. Культура клеток - MDCK. Слева плёнка, полученная методом прямой заливки раствора полимера с последующим испарением растворителя. Справа контроль. Окрашивание гематоксилином и эозином ( $\times 50$ ).

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, на плёнках с основой из поливинилового спирта (ПВС) хорошо росли клетки разных типов. Используемые плёнки нетоксичны для клеток, достаточно адгезивны, не меняли pH культуральной среды, оптически прозрачны под микроскопом, удобны в работе и поэтому могут служить моделью для работы по конструированию искусственных органов. Ковалентное “привязывание” к ПВС различных жирных кислот показывает возможность гибкого изменения свойств плёнок, их гидрофобности и адгезивности, а следовательно, возможность создания оптимальных условий прикрепления и роста для клеток разного типа.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Шумаков В.И. (ред.)* (1998) Очерки по физиологическим проблемам трансплантологии и применения искусственных органов. Тула. с. 338-367.
2. *Allen J.W., Bhatia S.N.* (2002) *Tissue Engineering*, **8**, 725-737.
3. *Allison D.D., Grande-Allen K.J.* (2006) *Tissue Engineering*, **12**, 2131-2140.
4. *Barrilleaux B., Phinney D.G., Prockop D.J., O'Connor K.C.* (2006) *Tissue Engineering*, **12**, 3007-3019.
5. *Шумаков В.И., Казаков Э.Н., Онищенко Н.А., Гуреев С.В., Остроумов Е.Н., Честухин В.В., Крашенинников М.Е., Миронков Б.Л., Хубутия А.Ш.* (2003) Российский кардиологический журнал, **5**, 42-50.
6. *Шумаков В.И., Онищенко Н.А., Расулов М.Ф., Крашенинников М.Е., Зайденев В.А.* (2003) Бюлл. эксперим. биол. мед., **162**(4), 38-42.
7. *Чайлахян Р.К.* (2000) Патент 2167662 от 27.07.2000. Способ восстановления целостности костей и трансплантат для его осуществления.
8. *Dhawan A., Mitry R.R., Hughes R.D., Lehec S., Terry C., Bansal S., Arya R., Wade J.J., Verma A., Heaton N.D., Rela M., Mieli-Vergani G.* (2004) *Transplantation*, **78**(12), 1812-1814.
9. *Esch II J.S., Knoefel W.T., Klein M., Ghodsizad A., Fuerst G., Poll L.W., Piechaczek C., Burchardt E.R., Feifel N., Stoldt V., Stockschröder M., Stoecklein N., Tustas R.Y., Eisenberger F., Peiper M., Houssinger D., Hosch S.B.* (2005) *Stem Cells*, **23**(4), 463-470.
10. *Shapiro A.M., Lakey J.R., Ryan E.A., Korbitt G.S., Toth E., Warnock G.L., Kneteman N.M., Rajotte R.V.* (2000) *N. Engl. J. Med.*, **343**(4), 230-238.
11. *Долгих М.С.* (2008) Биомед. химия, **54**, 376-392.
12. *Волова Т.Г., Севастьянов В.И., Шишацкая Е.И.* (2003) Полиоксикалканоаты (ПОА) - биоразрушаемые полимеры для медицины. Новосибирск. Изд-во СО РАН.
13. *Kaufmann P.M., Kneser U., Fiegel H.C., Kluth D., Herbst H., Rogiers X.* (1999) *Transplant. Proceedings*, **31**, 1928-1929.
14. *Uyama S., Kaufman P-M., Takeda T., Vacanti J.P.* (1993) *Transplantation*, **55**(4), 932-935.
15. *Glicklis R., Shapiro L., Agbaria R., Merchuk J.C., Cohen S.* (2000) *Biotechnol. Bioeng.*, **67**, 344-353.
16. *Сорокин А.Я., Кузнецова В.В., Розенберг М.Э., Корчагин А.Г.* (1990) Гидрофильные полимеры медицинского назначения. Сб. научн. тр., Л.: ОНПО “Пластполимер”, с. 23-28.

Поступила: 08. 07. 2009.



**THE CULTIVATION OF BONE MARROW CELLS AND CELL LINES  
ON POLYMERIC FILMS**

***M.S. Dolgikh, D.N. Livak, M.E. Krashennnikov, N.A. Onishchenko***

Institute of Transplantology and Artificial Organs, ul. Shchukinskaya, 1, Moscow, Russia;  
tel.: 499-190-45-31, 499-190-42-67; e-mail: marindolgik@ya.ru

The cultivation of multipotent mesenchymal stromal bone marrow cells and cells of A-431, MDCK, Vero, 3T3 and Hep-G<sub>2</sub> was performed on polymeric films (PVA) with different hydrophobic fatty acid residues. The cells of different types grew on these films with different intensity, but in the most cases comparable with the cultivation control on usual plastic. The examined films were nontoxic to cells and sufficiently adhesive. They did not changed pH of cultural media, were optically transparent under microscope and comfortable in the experimental work. These films can be used as a model for the artificial organ construction. The covalent binding of different fatty acids to PVA shows possibility of the adaptable changes of films properties (hydrophobity and adhesiveness), and therefore possibility of the creation of optimal conditions for different cell types attachment and growth.

**Key words:** substrates, cultivation, polyvinyl alcohol (PVA), bone marrow cells, cell lines.