

УДК 576.5:57.085.23: 611.013.395
doi:10.22494/cot.v6i2.91

3D культивування мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини мишей в гідрогелі з карбомеру 974P



Кирик В. М.¹, Кучук О. В.¹, Мамчур А. А.¹, Устименко А. М.¹, Луценко Т. М.¹, Цупиков О. М.^{1,2}, Яценко К. В.², Скибо Г. Г.^{1,2}, Білько Д. І.³, Білько Н. М.³

¹ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини Національної академії медичних наук України», Київ, Україна

²Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця Національної академії наук України, Київ, Україна

³Центр молекулярних і клітинних досліджень Національного університету «Києво-Могилянська академія», Київ, Україна

e-mail: labcellculture@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Актуальним питанням під час регенерації тканин залишається забезпечення виживання трансплантованих клітин у місці їх застосування та подальшого функціонування, особливо з врахуванням таких локальних патологічних змін як запалення та ішемія. З цією метою розробляються матрикси, здатні не лише заповнювати дефекти тканин, а й бути носіями для клітин.

МЕТА – оцінити ефективність 3D культивування мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) з жирової тканини мишей у складі гідрогелю з карбомеру 974P.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. ММСК отримували з жирової тканини мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFP)5Nagy/J, трансгенних за геном зеленого флуоресцентного білка (GFP). Клітини фенотипували методом проточної цитометрії та направлено диференціювали в остеогенному та адипогенному напрямку для підтвердження мультипотентних властивостей. Отримані ММСК культивували та направлено диференціювали *in vitro* в умовах тривимірних гідрогельних носіїв. Для приготування гідрогелю було використано карбомер 974P у комбінації з гліцеролом, пропіленгліколом, триетиламіном і агарозою в оригінальних пропорціях.

РЕЗУЛЬТАТИ. Отримано об'ємні носії на основі гідрогелю з карбомеру 974P для подальшого заселення ММСК. Розроблено модифіковані протоколи приготування гідрогелів на основі карбомеру і агарози та їх регідратації поживним середовищем для 3D культивування ММСК жирової тканини. Підібрано оптимальну концентрацію ММСК та ін'єкційний метод заселення ними гідрогелів необхідної форми та розміру. Показано, що ММСК жирової тканини в умовах об'ємного тривимірного культивування в дослідженому гідрогелі зберігають потенціал направленої остеогенної диференціювання.

ВИСНОВКИ. Об'ємні носії на основі гідрогелю з карбомеру 974P здатні здійснювати механічну підтримку клітин, забезпечувати формування необхідної цитоархітекtonіки, підтримувати міжклітинні взаємодії, що може сприяти подальшому довгостроковому виживанню та спеціалізації трансплантатів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини жирової тканини; тривимірне культивування клітин; гідрогель; карбомер 974P

Сучасні клітинні та тканинні технології є перспективним методом лікування багатьох важких захворювань, для яких існуючі медикаментозні та хірургічні підходи залишаються малоефективними. Трансплантація стовбурових клітин має на меті не лише заміщення втрачених структурних елементів організму, а й запуск ендогенних репаративних процесів за рахунок активації власних резидентних клітин-попередників. Проте, однією з головних проблем при регене-

рації тканин та органів є забезпечення виживання трансплантованих клітин у місці їх застосування для подальшого тривалого та ефективного функціонування, особливо з урахуванням таких локальних патологічних змін в осередку пошкодження, як запалення та ішемія [1].

Культури клітин *in vitro* мають широкий спектр використання з фундаментальними та прикладними цілями – від наукових досліджень та біотехнологічного виробництва до клінічного застосування

в регенеративній медицині. Більшість досліджень щодо властивостей клітинних культур були виконані на двовимірних (2D) поверхнях через легкість, зручність і високу життєздатність (2D). Такі моношарові культури суттєво поглибили розуміння основ клітинної біології. Проте, в організмі майже всі клітини оточені позаклітинним матриксом, який має складну 3D-волокнисту структуру, що забезпечує необхідний біохімічний і фізичний сигналінг між клітинами різних типів [3]. Тому останнім часом усе частіше використовують 3D культивування клітин у складі різноманітних матриксів і на сьогодні цей підхід вже застосовано для дослідження понад 380 клітинних ліній [4].

Експерименти *in vitro* показали, що культивовані в 3D умовах мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК) продукують більшу в порівнянні з 2D культурами кількість білків позаклітинного матриксу, зокрема колаген I типу, фібронектин, ламінін. При такому культивуванні посилюється паракринний ефект завдяки виділенню цитокінів та ростових факторів з ангіогенними (VEGF, bFGF), антиапоптичними (епідермальний фактор росту, фактор росту гепатоцитів) та антиоксидантними властивостями (IGF, TNF- α) [5]. Також відомо, що сфероїди мультипотентних клітин зберігають більшу здатність до мультилінійного диференціювання в порівнянні з клітинами в моношарі [6]. Адаптація кластерів клітин до сферичної форми може сприяти реорганізації цитоскелету та набуттю ними стовбурових властивостей завдяки білку клітинної адгезії E-cadherin, що залучений у регулювання міжклітинних взаємодій та проліферації [7].

Для того, щоб відтворити структурну цитоархітектуру тканини в 3D системах, повинні бути враховані певні основні характеристики матриксу: відповідні механічні параметри і хімічний склад, стимуляція клітинного росту та передачі сигналів, а також транспортування поживних речовин, газів і продуктів метаболізму [8]. За останній час багато біотехнологічних компаній запропонували десятки видів носіїв для потреб регенеративної медицини, які мають свої переваги та недоліки, враховуючи походження, спосіб отримання, фізико-хімічні властивості, біоінертність, здатність до резорбції, тощо. Зараз відомо більш ніж 100 різноманітних матриксів, як органічного (колаген, желатин, еластин, хітозан, хітин, фібрин, фібриноген і т.д.), так і неорганічного походження [9, 10, 11]. Також для 3D носіїв можуть одночасно використовуватися як природні, так і синтетичні речовини [12]. Такі композитні матеріали своєю пористістю, волокнистістю, проникністю і механічною стабільністю імітують нативний позаклітинний матрикс. Такі носії можуть створюватися у вигляді постійних трансплантатів, що виконують переважно механічну функцію при навантаженні, або можуть бути біодеградуєчими. Таким чином, 3D-матриця забезпечує оптимальне біологічно активне середовище для клітин, яке покращує їх біофізичну і біохімічну взаємодію, сприяє проліферації, диференціації та секреції клітинами компонентів природнього позаклітинного матриксу [13].

Як основа для 3D культур у біомедичних дослідженнях широко використовуються різноманітні гідрогелі. Загалом, гідрогелі з природних біополімерів, таких як альгінат і желатин – актуальний клас біоматеріалів завдяки їх біосумісності та здатності до біодеградації [14, 15]. Основними труднощами в застосуванні гідрогелів для конструювання 3D культур є контроль міжклітинної взаємодії, а також висока загальна пористість (більше 60 %) гідрогелів, що впливає на ефективність їх заселення клітинами [16, 17].

Одним із перспективних варіантів створення тривимірних матриксів є гідрогелі на основі агарози та карбомерів. Карбомери – це полімери на основі поліакрилової кислоти, які у водному розчині переходять зі стану золю в гель при підвищенні рН понад 5.5 [18]. Завдяки своїм властивостям вони реалізують потенціал носіїв природнього походження, забезпечуючи просторову структуру, подібну до живої тканини, залишаючись при цьому нетоксичними та неімуногенними [19]. З іншого боку, завдяки можливості регулювати фізико-хімічні параметри цих гідрогелів, змінюючи їх пропорції та модифікації складових компонентів, досягається необхідна кінетика деградації носія, що корелює з інтеграцією трансплантата в тканини реципієнта [20].

Мета роботи – оцінити ефективність 3D культивування мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини мишей у складі гідрогелю з карбомеру 974Р.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У дослідженні використані миші лінії FVB-C-Tg (GFP) 5Nagy/J, трансгенні за геном зеленого флуоресцентного білка (GFP). Тварини були люб'язно надані Європейською лабораторією молекулярної біології (Monterotondo, Італія) та утримувались в умовах експериментальної клініки Інституту генетичної та регенеративної медицини за стандартних умов з вільним доступом до води та їжі. Усі експерименти з використанням біологічного матеріалу від тварин виконані з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (European convention, Strasburg, 1986), статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV, 21.02.2006), а також усіх норм біоетики та біологічної безпеки.

ОТРИМАННЯ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН З ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ МИШЕЙ.

Самки мишей віком 4 міс. ($n = 3$) підлягали евтаназії шляхом цервікальної дислокації під ефірним наркозом. В стерильних умовах було виділено підшкірну жирову тканину з пахових ділянок, подрібнено ножицями на фрагменти розмірами 1x1 мм та оброблено 0,1 % розчином колагенази 1А в середовищі DMEM (*Sigma-Aldrich*, США) протягом 90 хв. при 37 °C з постійним перемішуванням на шейкері. Після відмивання та фільтрації через клітинний фільтр з діаметром пор 70 мкм отриману суспензію клітин культивували у повному поживному середовищі DMEM-LG, яке містило 15 % фетальної сироватки корів (*HyClone*, США), пеніцилін 100 од/мл, стрептоміцин 100 мкг/мл, 1:100 nonessential amino acids (все – *Sigma-Aldrich*, США) в CO₂ інкубаторі в умовах зволоженого повітря з 5 % CO₂ при температурі +37 °C. Пасажування культур проводили при досягненні 80 % конфлуентності моношару за допомогою 0,25 % розчину трипсину (*Sigma-Aldrich*, США). Для заселення гідрогелів використовували клітини 2-го пасажу.

Фенотипування отриманих культур клітин у динаміці культивування за маркерами CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD117 було виконано на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria (Becton Dickinson, США). Зразки по 2-10⁵ клітин в 50 мкл суспензії інкубували з відповідними моноклональними антитілами anti-CD44-PE, anti-CD73-PE, anti-CD90-PE, anti-CD45-PE, anti-CD117-PE-Cy7 та anti-CD34-APC (*BD Bioscience*, США), міченими флуорохромами, в робочій концентрації 0,5 мкг/10⁶ клітин протягом 30 хв та відмивали в буфері CellWash (*BD Bioscience*, США) шляхом центрифугування при 300хg протягом 5 хв. Дані аналізували з використанням програмного забезпечення BD FACSDiva 6.2.1 (*Becton Dickinson*, США), реєструючи не менше 2-10⁴ клітин на зразок. Для компенсації перекриття спектрів емісії флуорохромів при багатопараметричному аналізі використовували контрольні зразки без додавання антитіл (unstained control), з кожним з антитіл окремо (single stained control) та з додаванням комбінації антитіл без одного (fluorescence minus one control) [21]. Відносний вміст життєздатних клітин визначали за допомогою інкубації суспензії з 7-аміноактиноміцином D – 7-AAD (*BD Bioscience*, США) з подальшим аналізом на проточному цитометрі.

СПРЯМОВАНЕ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ В МОНОШАРІ

Остеогенне диференціювання клітин індукували за модифікованими методами Li та ін. [22]. Для спрямованого остеогенного диференціювання клітини культивували протягом двох пасажів і на стадії субконфлюентного моношару проводили заміну живильного

середовища для культивування на остеоіндуктивне, яке складалося з поживного середовища DMEM-F12 (*Sigma-Aldrich*, США) з додаванням 10 % фетальної сироватки корів (*HyClon*, США), а також 0,05 мМ L-аскорбінової кислоти 2-фосфату, 100 нМ дексаметазону та 10 мМ β -гліцерофосфату (все – *Sigma-Aldrich*, США). Заміну даного середовища проводили кожні три-чотири доби. Загалом клітини перебували під впливом середовища для остеогенного диференціювання протягом 21 доби за стандартних умов культивування. Через 21 добу моношар клітин промивали фосфатно-сольовим буфером, фіксували 4 % охолодженим розчином формальдегіду протягом 25-30 хв. та фарбували за допомогою алізаринового червоного Alizarine Red S (*Sigma-Aldrich*, США) для виявлення відкладень солей кальцію в позаклітинному матриксі, що є однією з ознак остеогенного диференціювання культури. Також фарбували клітини на виявлення лужної фосфатази. Для цього на зафіксований моношар клітин наносили BCIP/NBT (*Sigma-Aldrich*, США) на 20-30 хв. в захищеному від світла місці, відмивали дистильованою водою та оцінювали інтенсивність забарвлення [23].

Адипогенне диференціювання проводили за допомогою ростового середовища DMEM-HG (*Sigma*, США) з додаванням 10 % фетальної сироватки корів (*HyClon*, США), 1 мкМ дексаметазону, 200 мкМ індометацину, 500 мкМ ізобутилметилксантину та 5 мкг/мл інсуліну (все – *Sigma-Aldrich*, США) [24]. Середовище замінювали через кожні 3 доби та культивували клітини протягом 14 діб. Візуалізацію ліпідних гранул в цитоплазмі клітин проводили шляхом їх фарбування розчином Oil Red O (*Sigma-Aldrich*, США) після попередньої фіксації 4 % розчином охолодженого формальдегіду.

ПРИГОТУВАННЯ ГІДРОГЕЛЮ ТА КУЛЬТИВУВАННЯ ММСК У ГІДРОГЕЛІ.

Для приготування гідрогелю було використано карбомер 974P у комбінації з гліцеролом, пропіленгліколем, триетиламіном і агарозою в оригінальних пропорціях. Гель нагрівали до 83-85 °C та заливали у пластикові форми діаметром 10 мм та висотою 5 мм з подальшим охолодженням до кімнатної температури. Отримані носії були ліофілізовані та стерилізовані під ультрафіолетом протягом 2 год в умовах ламінарного боксу.

ММСК наносили на регідратовані в поживному середовищі гідрогелі за допомогою піпетки ($n = 8$), а також вводили за допомогою мікроін'єкції інсуліновим шприцом ($n = 8$) по всій площині носія в кількості $4 \cdot 10^4$, $2 \cdot 10^5$ та $1 \cdot 10^6$ клітин на 1 гідрогель. Культивування проводили в повному поживному середовищі DMEM з додаванням 10 % фетальної сироватки корів за стандартних умов CO₂ інкубатора. Середовище замінювали кожні 3-4 доби.

СПРЯМОВАНЕ ОСТЕОГЕННЕ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ ММСК ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ В КАРБОМЕРНОМУ ГІДРОГЕЛІ.

На 14-у добу культивування гідрогелів, заселених клітинами ($n = 4$), стандартне середовище для культивування замінювали на відповідне середовище для остеогенної індукції. Заміну даного середовища проводили кожні три-чотири доби. Загалом гідрогелі з клітинами перебували під впливом середовища для остеогенного

диференціювання протягом 14 або 21 доби. Для оцінки ефективності остеогенної індукції контрольний і дослідний зразки гідрогелів фіксували 4 % розчином параформальдегіду на 0,1 М ФСБ протягом 48 годин при температурі +4 °C та забарвлювали Alizarine Red S для виявлення солей кальцію та виявляли продукцію лужної фосфатази за допомогою барвника BCIP-NBT.

Моношарів культури клітин та гідрогелів, заселених клітинами, досліджували за допомогою інвертованого флуоресцентного мікроскопа IX-71 (*Olympus*, Японія) з камерою DP-20 (*Olympus*, Японія) за допомогою програмного забезпечення QuickPHOTO (*Promicra, s.r.o.*, Чехія).

СТАТИСТИЧНИЙ АНАЛІЗ.

Статистичний аналіз виконували за допомогою програмного забезпечення Statistica v.5 (*StatSoft Inc.*, USA). Результати наведені у вигляді середніх арифметичних значень \pm стандартна похибка середнього (SEM).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для підтвердження належних характеристик мультипотентних стромальних клітин жирової тканини мишей, які були використані для заселення в гідрогелі, отримані культури проаналізовано за морфологією, імунофенотипом та потенціалом до направлено диференціювання в остеогенному та адипогенному напрямку [25].

У первинних культурах з жирової тканини відмічено ріст клітин, які переважно мали видовжену або полігональну форму з декількома відростками. Подальше субкультивування сприяло формуванню більш однорідної популяції адгезивних фібробластоподібних клітин, які за короткий час (2-3 доби) подвоювали популяцію та утворювали конфлюентний моношар. В деяких випадках спостерігався ріст шляхом збільшення розмірів колонії клітин. Цитоплазма клітин при цьому була однорідною, чітко візуалізувались ядра та ядерця (рис. 1).

При фенотипуванні ММСК з жирової тканини з початкового до другого пасажів відмічено наростання експресії мезенхімальних маркерів CD44 (до $97,1 \pm 2,2$ %), CD90 (до $95,9 \pm 1,8$ %) та CD73 (до $64,3 \pm 14,6$ %), що відповідає типовому для ММСК фенотипу (рис. 2). При цьому відмічали низьку експресію (< 3 %) гемопоетичних маркерів CD45 ($2,1 \pm 0,8$ %) і CD117 ($2,2 \pm 0,7$ %). Експресія CD34 залишалась на рівні 12 ± 4 % на другому пасажі. Як відомо, відносно високий рівень експресії маркера CD34 на ранніх пасажах є типовим для культури ММСК жирової тканини і може свідчити про високий потенціал цих клітин до диференціювання в ендотеліальному напрямку [26]. Дана особливість клітин жирової тканини може сприяти активації неогенезу та кращій васкуляризації трансплантатів для забезпечення їх виживання. Відносний вміст життєздатних клітин після субкультивування з моношару в суспензію для подальшого 3D культивування, визначений за допомогою 7-AAD, становив 92,4 %.

Було підтверджено мультипотентні властивості отриманих культур ММСК підшкірної жирової тканини мишей за здатністю до направлено диференціювання за допомогою гістохімічного фарбування на солі кальцію і лужну фосфатазу для остеогенного напрямку та на ліпідні включення – для адипогенного диференціювання. У відповідь на остеогенну індукцію в ММСК жирової тканини на 21-у добу культивування в остеогенному середовищі спостерігали інтенсивну мінералізацію міжклітинного матриксу солями кальцію, яку виявляли за допомогою забарвлення препаратів Alizarin red S (рис. 3 А), а також високу активність лужної фосфатази, яку виявляли за допомогою фарбування BCIP-NBT (рис. 3 Б). При направленому адипогенному диференціюванні ММСК жирової тканини через 14 діб культивування у відповідному середовищі виявлено присутність ліпідних гранул у цитоплазмі клітин (рис. 3 В).

Таким чином, за морфологічними характеристиками, імунофенотипом та потенціалом до направлено диференціювання отримані

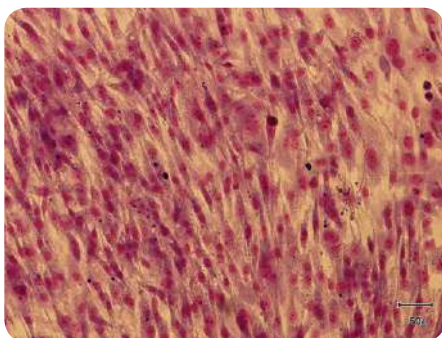


Рис. 1. Мікрофото культури ММСК підшкірної жирової тканини мишей, 2-й пасаж, світлова мікроскопія, фарбування азур-еозин, шкала – 50 мкм.

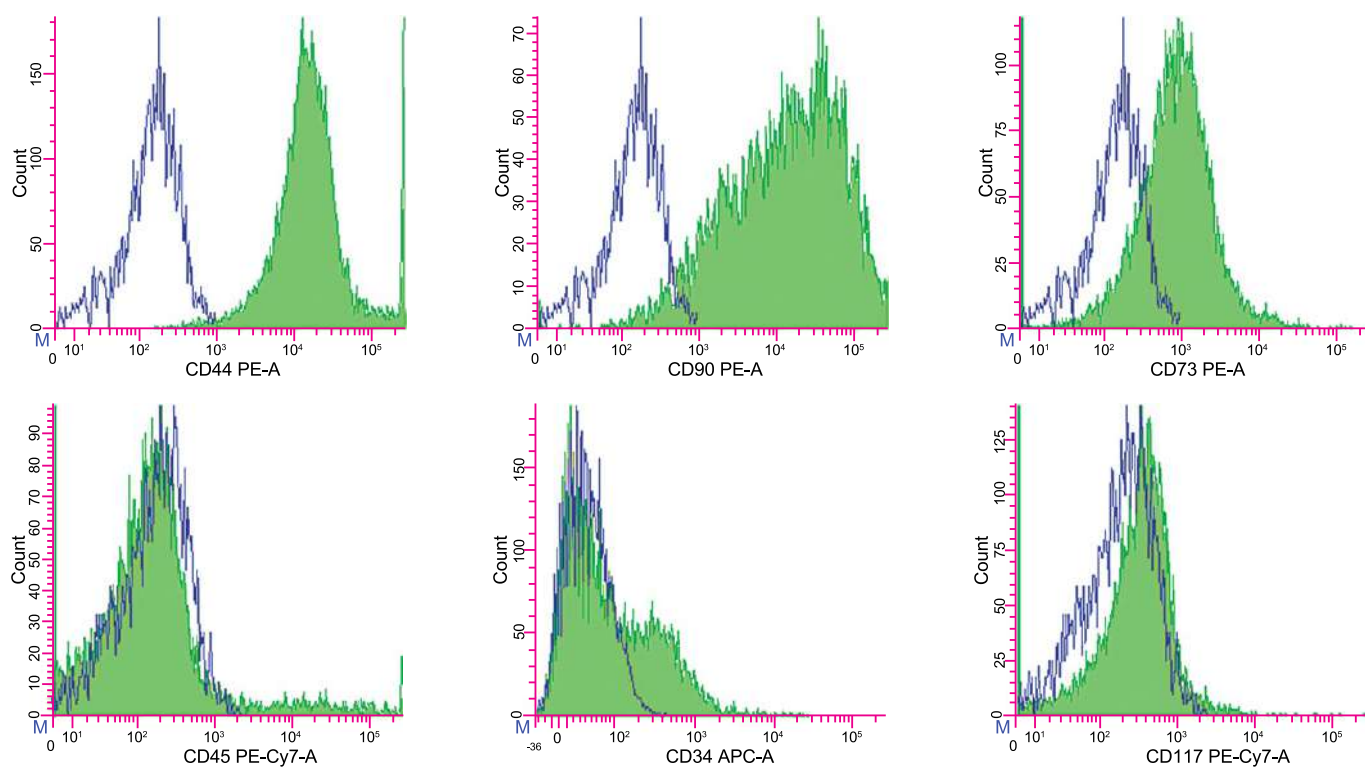


Рис. 2. Гістограми експресії маркерів CD44, CD70, CD90, CD45, CD34 і CD117 в культурі ММСК жирової клітковини (зелений колір) в порівнянні з негативним контролем без додавання антитіл (синій колір) за даними проточної цитометрії, 2-й пасаж, програмне забезпечення BD FACSDiva.

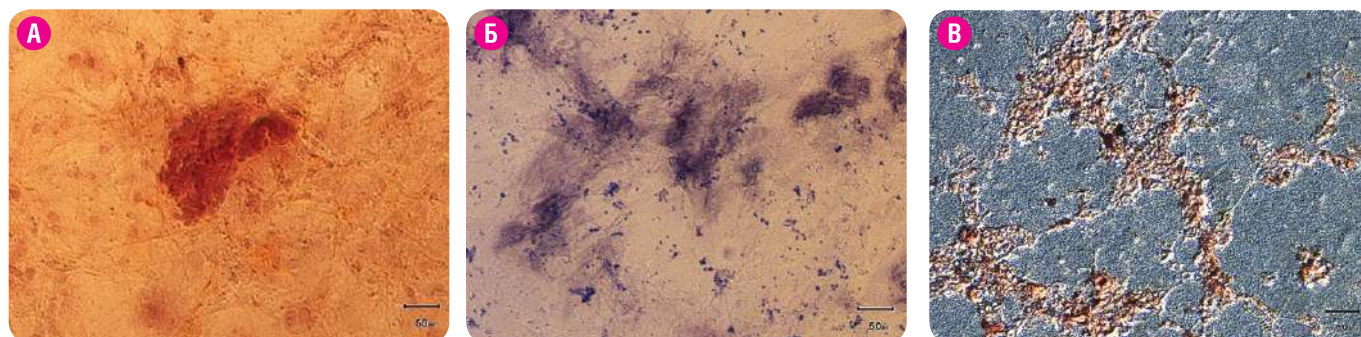


Рис. 3. Мікрофотографії культур ММСК жирової тканини мишей, диференційованих в остеогенному напрямку (А-Б), 21-а доба культивування, фарбування алізариним червоним (А) і ВСІР-NBT (Б); та диференційованих в адипогенному напрямку (В), 14-а доба культивування, фарбування Oil Red O, шкала – 50 мкм.

культури клітин жирової тканини, що були використані в подальших експериментах, відповідали мінімальним критеріям ММСК [25].

Для тривимірного культивування клітин було виготовлено гідрогелі на основі агарози та карбомеру 974Р. Використовуючи оригінальні пропорції вихідних компонентів та модифікації часу і температури їх процесингу можна досягти певної пластичності матеріалу для надання йому необхідної форми (рис. 4 А) та пружно-еластичних властивостей при подальшій регідратації поживним середовищем (рис. 4 Б).

Було отримано 3D культури ММСК жирової тканини мишей, заселених у регідратовані поживним середовищем гідрогелі. Встановлено, що при нанесенні піпеткою $4 \cdot 10^4$ клітин на гідрогель циліндричної форми діаметром 10 мм (об'єм ~ 400 мм³) через 2 тижні культивування лише поодинокі клітини проникали на глибину до 1,5 мм від поверхні гідрогелю та набували видовженої форми. Більшість клітин зберігали округлу форму та були на поверхні гідрогелю. При нанесенні піпеткою 10^6 клітин на гідрогель на ранніх етапах культивування

(до 10 діб) клітини розташовувались на його поверхні та зберігали округлу форму. Протягом наступних 5-7 діб клітини проникали в товщу гелю та набували видовженої форми, контактуючи між собою. Через 7-14 діб після проникнення кількість міжклітинних контактів збільшувалась і вони утворювали кластери та мережу з сусідніх клітин, що свідчить про їх проліферацію (рис. 5).

Було запропоновано ін'єкційний спосіб введення ММСК у товщу гідрогелю за допомогою шприца та проаналізовано залежність ефективності заселення карбомерних гідрогелів від початкової кількості клітин. При ін'єкції $4 \cdot 10^4$ або $2 \cdot 10^5$ клітин у гідрогель на глибину 1-2 мм через 2 тижні культивування клітини розташовувались дифузно у всій товщі гідрогелю, набували видовженої форми, але не контактували між собою. При ін'єкції 10^6 клітин у гідрогель на глибину 2-3 мм через 2 тижні культивування клітини набували полігональної форми завдяки численним відросткам, якими вони контактували між собою, формуючи мережу із сусідніх клітин (рис. 6).

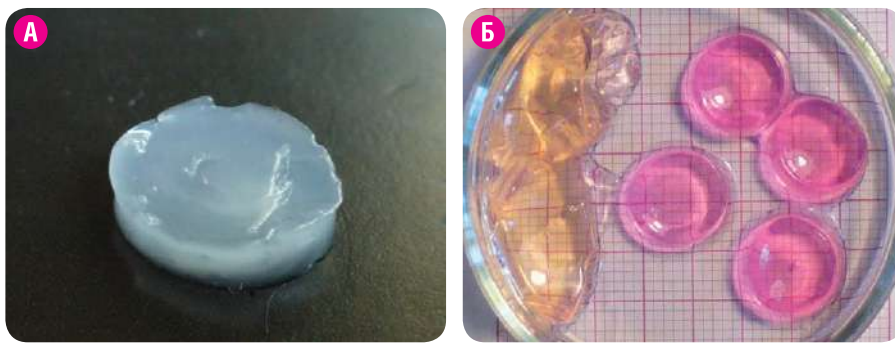


Рис. 4. Фото макропрепаратів гідрогелю на основі карбомеру та агарози: А – нативний гідрогель, Б – гідрогелі, регідратовані поживним середовищем DMEM.



Рис. 5. Культура ММСК жирової клітковини в карбомерному гідрогелі при нанесенні 10^6 клітин на поверхню гідрогелю: А – 8-а доба культивування; Б – 18-а доба культивування; В – 29-а доба культивування, шкала – 50 мкм.

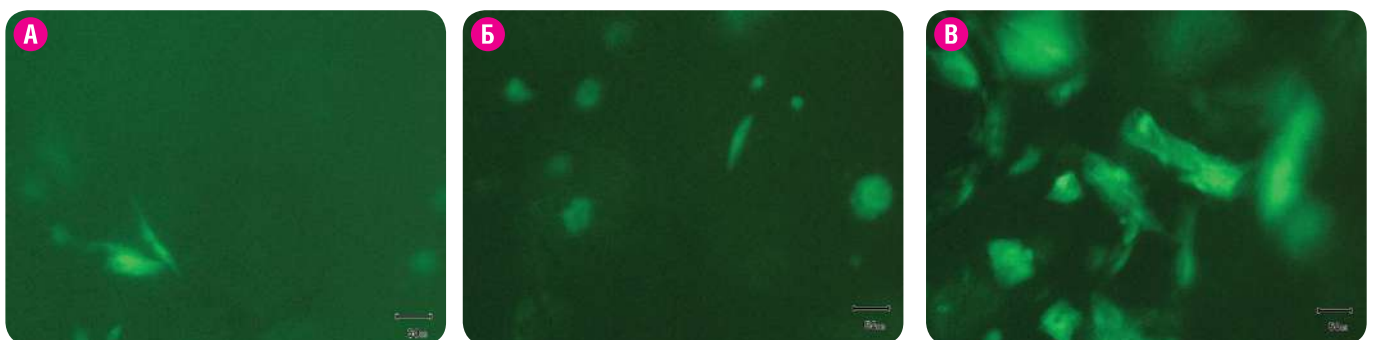


Рис. 6. Культура ММСК жирової клітковини в карбомерному гідрогелі при заселенні клітин шляхом мікроін'єкцій в гідрогель, 14-а доба культивування, флуоресцентна мікроскопія: А – початкова доза $4 \cdot 10^4$ клітин; Б – $2 \cdot 10^5$ клітин; В – 10^6 клітин, шкала – 50 мкм.

Таким чином, було підібрано оптимальну концентрацію клітин та метод заселення ними гідрогелів необхідної форми та розміру для подальших досліджень *in vitro*.

Для оцінки здатності до направлено диференціювання ММСК жирової тканини в умовах тривимірних об'ємних культур розроблено методику їх направлено остеогенного диференціювання в карбомерному гідрогелі. При забарвленні Alizarin Red S та BCIP-NBT препаратів гідрогелів з клітинами в остеогенному середовищі вже на 14-у добу виявлено позитивну реакцію на солі кальцію та лужну фосфатазу, відповідно, по периферії гідрогелю та в його товщі у місцях локалізації клітин (рис. 7).

Отримані результати свідчать, що мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини жирової клітковини зберігають потенціал направлено диференціювання в умовах об'ємного тривимірного культивування, характерний для двовимірних моношарових культур.

Вважають, що регенеративний потенціал стовбуровими клітинами реалізується в умовах ніші, яка має певну просторову організацію, забезпечуючи контактну та безконтактну взаємодію різних типів клітин завдяки сигнальним молекулам [27]. Відтворення умов мікрооточення стовбурових клітин перед трансплантацією може значно під-

вищити їх регенеративний потенціал та ефективність застосування [28]. Розроблені з цією метою матрикси здатні не лише заповнювати дефекти тканин, а й виступати в ролі носіїв для клітин, відтворюючи просторову тривимірну нішу *in vitro* [29]. Актуальним є встановлення впливу умов тривимірного культивування на ефективність виживання, проліферації та потенціал до направлено диференціювання мультипотентних стовбурових клітин різних типів.

Як відомо, крім формотворної і опорної функції, матрикси можуть протягом певного часу дозовано виділяти необхідні ростові фактори, забезпечуючи не тільки проліферацію, але і спрямоване диференціювання клітин уже *in vivo* [30, 31]. У багатьох роботах показано, що взаємодія між клітинами, позаклітинною основою біоматеріалу та факторами росту регулює диференціювання стовбурових клітин і ріст тканини [32, 33]. Наприклад, вплив на стовбурові клітини жирової клітковини факторами мікрооточення кісткового мозку (VEGF, TGF- β 3, BMP-2) покращує їх виживання в організмі реципієнта [34, 35]. У наших попередніх дослідженнях для мультипотентних стромальних клітин підшкірної жирової тканини була продемонстрована можливість поетапного остеогенного диференціювання з попередньою хондрогенною індукцією, що частково відтворює *in vitro* умови ніші для за-

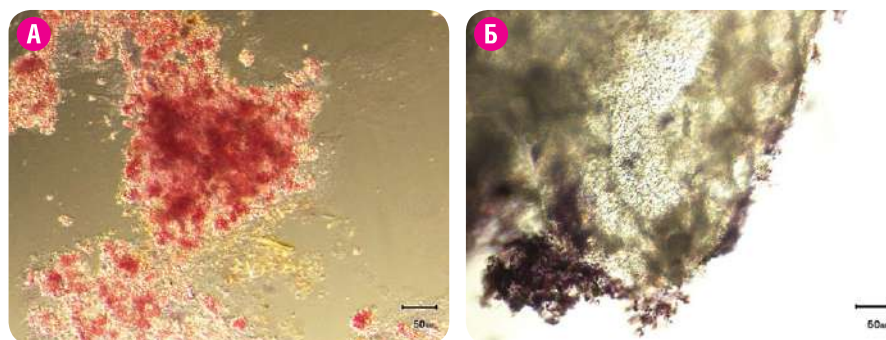


Рис. 7. Мікропрепарати гідрогелів, заселених ММСК жирової тканини, диференційовані в остеогенному напрямку, забарвлення Alizarin Red S на солі кальцію, червоний колір (А) та BCIP-NBT на лужну фосфатазу, коричневий колір (Б) – шкала – 50 мкм.

кладки та формування кістки в організмі [36]. Поєднання технологій створення об'ємних гідрогельних матриксів та направлено диференціювання заселених у них клітин відкриває широкі перспективи для регенеративної медицини. Поетапне направлене диференціювання мультипотентних клітин *in vitro* в об'ємних конструкціях дозволить частково відтворити фізіологічні механізми формування тканини *in vivo* та отримати просторово організовану культуру клітин, здатних виживати, проліферувати та диференціюватися в заданому напрямку.

У свою чергу, необхідність швидкого і надійного заселення таких носіїв клітинами різних типів потребує розробки нових біотехнологічних підходів 3D культивування з обов'язковою оцінкою їх безпеки та ефективності, що продемонстровано в даній роботі. Наприклад, показано, що динамічна перфузія трансплантатів в умовах біореакторів сприяє заселенню 3D-матриксів і направленій індукції клітин, а також дозволяє багато в чому стандартизувати технологію культивування [37]. Саме тому перспективними є подальші дослідження з включенням до складу карбомерних гідрогелів ростових факторів

або цитокінів, відповідальними за хемотаксис, проліферацію та тканино-специфічне диференціювання трансплантованих або ендогенних стовбурових клітин.

Сформовані об'ємні культури на основі карбомерних гідрогелів можуть бути використані як трансплантати для вивчення відновлювальних процесів при ушкодженнях тканин в експерименті *in vivo* [19]. Загалом, практичне значення даного дослідження полягає в розробці нових біотехнологічних підходів для підвищення ефективності застосування мультипотентних клітин з жирової тканини, як альтернативного джерела дорослих стовбурових клітин, для регенерації пошкоджень багатьох тканин. На сьогодні вже описано численні варіанти клінічного застосування матриксів з клітинами різного походження при пошкодженнях кісток, хрящів, міжхребцевих дисків, шкіри, а також запропоновано проведення розширених клінічних випробувань з оцінкою безпеки та ефективності їх застосування. Ці підходи особливо актуальні в реконструктивній хірургії для регенерації пошкоджень м'яких тканин та загоєння ран [38, 39, 40].

ВИСНОВКИ

Таким чином, об'ємні носії на основі гідрогелю з карбомеру 974P здатні здійснювати механічну підтримку клітин, забезпечувати необхідну цитоархітектуру завдяки формуванню міжклітинних контактів, а також зберігають потенціал мультипотентних клітин до направлено диференціювання.

Вдосконалення технології заселення клітинами тривимірних матриксів на основі карбомеру 974P дозволить моделювати їх просторову організацію та підтримувати міжклітинні взаємодії, що в підсумку може сприяти довгостроковому виживанню та спеціалізації трансплантатів для більш ефективного відновлення пошкоджених тканин і органів.

Подяка

Дослідження проведено за підтримки проекту УНТЦ № 6262 «Розробка технології тривимірного культивування мультипотентних стовбурових клітин для регенерації пошкоджень тканин ішемічного генезу».

Автори висловлюють особливу подяку доктору Giuseppe Perale, Politecnico di Milano (Мілан, Італія) за надану допомогу та консультування при проведенні даного дослідження.

СПИСОК ЦИТОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Mashkouri S., Crowley M. G., Liska M. G., Corey S., Borlongan C. V. Utilizing pharmacotherapy and mesenchymal stem cell therapy to reduce inflammation following traumatic brain injury. *Neural Regen Res* 2016; **11**, P. 1379-84.
2. Duval K., Grover H., Han L. H., et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology (Bethesda)*. 2017. **32**, № 4. P. 266-277.
3. Kim S. H., Turnbull J., Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol*. 2011. 209, № 2. P. 139-51. DOI: 10.1530/JOE-10-0377.
4. Knight E., Przyborski S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *J Anat*. 2015. **227**, № 6. P. 746-756.
5. Feng G., Zhang J., Li Y., et al. IGF-1 C domain-modified hydrogel enhances cell therapy for AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2016. **27**, № 8. P. 2357-2369.
6. Baraniak P. R., Cooke M. T., Saeed R., et al. Stiffening of human mesenchymal stem cell spheroid microenvironments induced by incorporation of gelatin microparticles. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2012. **11**. P. 63-71.
7. Labusca L. S. Scaffold free 3D culture of mesenchymal stem cells; implications for regenerative medicine. *J Transplant Stem Cell Biol*. 2015. **2**, № 1. P. 8-15.

8. Grigore A., Sarker B., Fabry B., et al. Behavior of encapsulated MG-63 cells in RGD and gelatine-modified alginate hydrogels. *Tissue Eng. Part A*. 2014. **20**, № 15-16. P. 2140-2150.
9. Xing Q., Qian Z., Tahtinen M., et al. Aligned Nanofibrous Cell-Derived Extracellular Matrix for Anisotropic Vascular Graft Construction. *Adv Healthc Mater*. 2017. **6**, № 10. DOI: 10.1002/adhm.201601333.
10. Capulli A. K., MacQueen L. A., Sheehy S. P., Parker K. K. Fibrous scaffolds for building hearts and heart parts. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016. **15**, № 96. P. 83-102. DOI: 10.1016/j.addr.2015.11.020.
11. Wu S., Duan B., Qin X., Butcher J. T. Living nano-micro fibrous woven fabric/hydrogel composite scaffolds for heart valve engineering. *Acta Biomater*. 2017. № 51. P. 89-100. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.01.051
12. Ye H., Zhang K., Kai D., Li Z., Loh X. J. Polyester elastomers for soft tissue engineering. *Chem Soc Rev*. 2018. **47**, № 12. P. 4545-4580. DOI: 10.1039/c8cs00161h.
13. Alhaque S., Themis M., Rashidi H. Three-dimensional cell culture: from evolution to revolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2018. **373**, № 1750. P. 20170216.
14. Tsou Y. H., Khoneisser J., Huang P. C., Xu X. Hydrogel as a bioactive material to regulate stem cell fate. *Bioact Mater*. 2016. **1**, № 1. P. 39-55. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2016.05.001.
15. Mei Liu, Xin Zeng, Chao Ma. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone Res*. 2017. **5**, P. 17014. DOI:10.1038/boneres.2017.14
16. Sarker B., Rompf J., Silva R., et al. Alginate-based hydrogels with improved adhesive properties for cell encapsulation. *Int J Biol Macromol*. 2015. **78**, P. 72-78.
17. Ivanovska J., Zehnder T., Lennert P., et al. Biofabrication of 3D Alginate-Based Hydrogel for Cancer Research: Comparison of Cell Spreading, Viability, and Adhesion Characteristics of Colorectal HCT116 Tumor Cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2016. **22**, № 7. P. 708-15. DOI: 10.1089/ten.TEC.2015.0452.
18. Gupta S., Vyas S. P. Carbopol/chitosan based pH triggered in situ gelling system for ocular delivery of timolol maleate. *Sci Pharm*. 2010. **78**, № 4. P. 959-976.
19. Hayati F., Ghamsari S. M., Dehghan M. M., Oryan A. Effects of carbomer 940 hydrogel on burn wounds: an in vitro and in vivo study. *J Dermatolog Treat*. 2018. **29**, № 6. P. 593-599. DOI: 10.1080/09546634.2018.1426823.
20. Rossi F., Santoro M., Casalini T., et al. Characterization and Degradation Behavior of Agar-Carbomer Based Hydrogels for Drug Delivery Applications: Solute Effect. *Int J Mol Sci*. 2011. **12**, № 6. P. 3394-3408. DOI:10.3390/ijms12063394.
21. Maecker H. T., Trotter J. Flow cytometry controls, instrument setup, and the determination of positivity. *Cytometry A*. 2006. **69**, № 9. P. 1037-42.
22. Li J., Mareddy S., Meifang D.T., et al. A minimal common osteochondrocytic differentiation medium for the osteogenic and chondrogenic differentiation of bone marrow stromal cells in the construction of osteochondral graft. *Tissue engineering*. 2009. Part A. – **15**, № 9. – P 2481-90.
23. Mishra R., Kumar A. Osteocompatibility and osteoinductive potential of supermacroporous polyvinyl alcohol-TEOS-agarose-CaCl₂ (PTAgC) biocomposite cryogels. *J Mater Sci Mater Med*. 2014. **25**, № 5. P. 1327-37. DOI: 10.1007/s10856-014-5166-8.
24. Ruiz-Ojeda F., Rupérez A., Gomez-Llorente C., et al. Cell Models and Their Application for Studying Adipogenic Differentiation in Relation to Obesity: A Review. *Int J Mol Sci*. 2016. **17**, № 7. P. 1040. DOI:10.3390/ijms17071040.
25. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006. **8**, № 4. P. 315-7.
26. Suga H., Matsumoto D., Eto H., et al. Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2009. **18**, №8. P. 1201-10. doi: 10.1089/scd.2009.0003.
27. Rojas-Ríos P., González-Reyes A. Concise review: The plasticity of stem cell niches: a general property behind tissue homeostasis and repair. *Stem Cells*. 2014. **32**, № 4. P. 852-9. DOI: 10.1002/stem.1621.
28. Donnelly H., Salmeron-Sanchez M., Dalby M. Designing stem cell niches for differentiation and self-renewal. *J R Soc Interface*. 2018. **15**, № 145. P. 20180388. DOI: 10.1098/rsif.2018.0388.
29. Geckil H., Feng Xu, Xiaohui Zhang, et al. Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine (Lond)*. 2010. **5**, № 3. P. 469-484. DOI: 10.2217/nnm.10.12.
30. Santoro M., Marchetti P., Rossi F., et al. Smart approach to evaluate drug diffusivity in injectable agar-carbomer hydrogels for drug delivery. *J Phys Chem B*. 2011. **15**, № 11. P. 2503-10. DOI: 10.1021/jp1111394.
31. Bruggeman K. F., Williams R. J., Nisbet D. R. Dynamic and Responsive Growth Factor Delivery from Electrospun and Hydrogel Tissue Engineering Materials. *Adv Healthc Mater*. 2018. **7**, № 1. DOI: 10.1002/adhm.201700836.
32. Tong Z., Solanki A., Hamilos A. Application of biomaterials to advance induced pluripotent stem cell research and therapy. *EMBO J*. 2015. **34**, № 8. P. 987-1008. DOI: 10.15252/embj.201490756.
33. Jha A., Tharp K., Ye J., et al. Enhanced Survival and Engraftment of Transplanted Stem Cells using Growth Factor Sequestering Hydrogels. *Biomaterials*. 2015. **47**, P. 1-12. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.12.043.
34. Parker J., Mitrousis N., Shoichet M. S. Hydrogel for Simultaneous Tunable Growth Factor Delivery and Enhanced Viability of Encapsulated Cells in Vitro. *Biomacromolecules*. 2016. **17**, № 2. P. 476-84. DOI: 10.1021/acs.biomac.5b01366.
35. Gothard D., Smith E., Kanczler J. In Vivo Assessment of Bone Regeneration in Alginate/Bone ECM Hydrogels with Incorporated Skeletal Stem Cells and Single Growth Factors. *PLoS One*. 2015. **10**, № 12. P. 0145080. DOI:10.1371/journal.pone.0145080.
36. Kuchuk O., Kyryk V. Stepwise Differentiation of Multipotent Cells from Murine Adipose Tissue in Osteogenic Direction. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2012. **22**, № 2. P. 161-164.
37. Fröhlich M., Grayson W. L., Marolt D. Bone grafts engineered from human adipose-derived stem cells in perfusion bioreactor culture. *Tissue Eng Part A*. 2010. **16**, № 1. P. 179-89. DOI: 10.1089/ten.TEA.2009.0164.
38. Burdick J., Mauck R., Gerecht S. To Serve and Protect: Hydrogels to Improve Stem Cell-Based Therapies. *Cell Stem Cell*. 2016. **18**, № 1. P. 13-5. DOI: 10.1016/j.stem.2015.12.004.
39. Negoro T., Takagaki Y., Okura H., Matsuyama A. Trends in clinical trials for articular cartilage repair by cell therapy. *NPJ Regen Med*. 2018. **3**, P. 17.
40. Webber M., Khan O., Sydlík S. A Perspective on the Clinical Translation of Scaffolds for Tissue Engineering *Ann Biomed Eng*. 2015. **43**, № 3. P. 641-656. DOI:10.1007/s10439-014-1104-7.



СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 13.07.2018 р.

Прийнята до друку 30.11.2018 р.