

Maciej PILAREK¹, Iwona GRABOWSKA², Justyna JANICKA¹, Michał WOJASIŃSKI¹,
Katarzyna DĄBKOWSKA¹, Tomasz CIACH¹

e-mail: m.pilarek@ichip.pw.edu.pl

¹ Zakład Biotechnologii i Inżynierii Bioprocessowej, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

² Zakład Cytologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

Hybrydowy układ hodowlany do otrzymywania implantów tkanki chrzęstnej

Wstęp

Degeneracja chrząstki stawowej stanowi poważny problem zdrowotny. Niszczenie chrząstki może zachodzić zarówno wskutek doznanych urazów, jak i schorzeń, wśród których najczęściej występującym jest choroba zwyrodnieniowa stawów. Brak pełnej skuteczności stosowanych metod leczenia oraz wysokie koszty inwazyjnych zabiegów (np. zastąpienie uszkodzonego stawu endoprotezą) stanowią bodziec do prowadzenia badań nad opracowaniem nowych, tańszych i wydajniejszych rozwiązań z zakresu hodowli przestrzennych komórek chrząstki (chondrocytów) o potencjalnym zastosowaniu w inżynierii tkankowej.

Chrząstka stawowa jest uznawana za tkankę o silnie ograniczonych zdolnościach autoregeneracyjnych, a w wielu przypadkach za strukturę niezdolną do autoregeneracji. Ponadto chrząstkę cechują: wysoki stopień zorganizowania, charakterystyczna intensywne sekrecja składników macierzy zewnątrzkomórkowej ECM (*ExtraCellular Matrix*) oraz unikalne właściwości biomechaniczne, które to cechy odpowiadają za złożoną budowę tkanki [Hardingham, 2012, Lu X. i Mow V., 2008].

W warunkach *in vitro* tradycyjne namnażanie izolowanych chondrocytów w postaci monowarstwy powoduje utratę specyficznego fenotypu komórek chrzęstnych. Jednym ze sposobów intensyfikacji hodowli chondrocytów jest zapewnienie komórkom warunków do przestrzennego wzrostu. W tym celu najczęściej stosuje się trójwymiarowe rusztowania (*scaffolds*) wykonywane z naturalnych lub syntetycznych materiałów polimerowych [Cascio i Sharma, 2008]. Duża powierzchnia, na której mogą rosnąć chondrocyty, związana z wysoką porowatością rusztowań, umożliwia prowadzenie hodowli przestrzennych w warunkach wysokiej gęstości komórek przypadającej na jednostkę objętości powstałego implantu. Takie warunki prowadzenia procesu hodowli indukują wytwarzanie przez chondrocyty ECM o prawidłowym składzie białkowym oraz przestrzenne samoorganizowanie się komórek [Chung i Burdick, 2008]. Ponadto, w hodowlach przestrzennych chondrocytów występują charakterystyczne dla warunków naturalnych oddziaływania międzykomórkowe, co sprzyja tworzeniu tkanki chrzęstnej szklistej o prawidłowych właściwościach biomechanicznych [Lu i Mow, 2008; Cascio i Sharma, 2008].

Hodowle prowadzone w warunkach wysokiej gęstości komórek charakteryzują się występowaniem ograniczeń dyfuzyjnych dotyczących gazów oddechowych (tzn. O₂ i CO₂), składników medium hodowlanego oraz metabolitów komórkowych wydzielanych przez proliferujące komórki, występujących w obrębie przestrzennej struktury wewnętrznej danego implantu. W próbach intensyfikacji procesów wymiany masy w układach do hodowli przestrzennej komórek, w tym także chondrocytów, istotną rolę odgrywa inżynieria bioprocessowa [Kellner i in., 2002; Keeney i in., 2011]. Jednym z możliwych rozwiązań bioprocessowych jest zastosowanie obojętnego biochemicznie, wydajnego, ciekłego nośnika gazów oddechowych, na przykład syntetycznego ciekłego perfluorowęzłaku PFC (*Perfluorochemical/FluoroCarbon*) [Deschamps i in., 2008; Pilarek, i in., 2013]. Do korzyści wynikających z użycia ciekłego PFC należą: intensyfikacja wymiany masy w układzie hodowlanym, penetracja struktury przestrzennej rusztowania przez fazę perfluorowaną i związana z tym intensyfikacja transportu gazów oddechowych w przestrzeni elementów biomateriałowych.

Celem niniejszych badań było określenie wpływu ciekłego PFC na hodowlę izolowanych ssaczy (*Bos taurus*) chondrocytów linii CP5 w przestrzennym układzie polilaktydowego rusztowania o strukturze włóknistej, prowadzoną w hybrydowym układzie PFC/biomateriał/żywność, wykorzystującym dwie niemieszające się fazy ciekłe: perfluorodekalinę (faza perfluorowana) i żywność (faza wodna).

Materiały i metody

Linia komórkowa. W przeprowadzonych badaniach wykorzystano chondrocyty linii CP5 pochodzące z tkanki chrzęstnej stawowej *Bos taurus*, zakupione w Europejskiej Kolekcji Kultur Komórkowych (ECACC, Wielka Brytania). Komórki CP5 hodowano w pożywce DMEM:F12 (1:1) *GlutaMAX*[®], której skład został uzupełniony dodatkiem 10 % bydlęcej surowicy płodowej (FCS), 50 µg·mL⁻¹ askorbinianu i preparatem antybiotyku (0,05 µL·mL⁻¹ penicyliny, 0,05 µL·mL⁻¹ streptomycyny). Pożywka oraz wszystkie suplementy pochodziły z *Invitrogen* (USA) i posiadały certyfikaty dopuszczenia do użytku w hodowlach komórkowych.

Ciekły perfluorowazwitek. Jako ciekły nośnik gazów oddechowych (O₂ i CO₂) zastosowano perfluorodekalinę (C₁₀F₁₈; PFD) zakupioną w *ABCR GmbH* (Niemcy). Przed użyciem w hodowlach, PFD była sterylizowana termicznie (15 min., 121°C), co powodowało także jej odgazowanie. Schłodzoną do temperatury 37°C, sterylną i odgazowaną PFD nasycano powietrzem atmosferycznym z zachowaniem standardów jałowości [Pilarek M. i in., 2013].

Polilaktydowe rusztowanie o strukturze włóknistej. Jako polimero-we rusztowanie zastosowano krążki polilaktydowe (PLA; *Polysciences Inc.*, USA) o średnicy 16 mm i grubości 2 mm, wykonane metodą elektroprzędzenia (*electrospinning*) z włókien PLA o średnicy 0,7÷1,2 µm. Przygotowane rusztowania sterylizowano w 70% etanolu a następnie suszono w strumieniu jałowego powietrza przez 1 h w temperaturze pokojowej.

Układ badawczy. Rusztowania PLA o strukturze włóknistej umieszczano w nacyniach 24-dółkowych zawierających wstępnie odpipetowane medium hodowlane (1 mL) i napowietrzoną PFD (1 mL). Przyjęcie takiej procedury zapobiegało ewentualnemu zatrzymywaniu pęcherzy powietrza atmosferycznego w porach rusztowania PLA. W efekcie uzyskiwano hybrydowy układ hodowlany postaci (od dołu): hydrofobowa faza PFD, rusztowanie PLA, wodna faza pożywki DMEM:F12. Hodowle kontrolne prowadzono w układzie pozbawionym dodatku PFD. Do przygotowanych w powyższy sposób układów hodowlanych dodawano zawieszony chondrocytów CP5 pozwalającą uzyskać gęstość początkową komórek w hodowli wynoszącą 2·10⁵ komórek mL⁻¹. Inokulum przygotowywano w standardowej hodowli i pozyskiwano na drodze trypsynizacji monowarstwy komórek CP5, po osiągnięciu przez nie ok. 75÷80% konfluencji (tzn. po 4÷5 dobach hodowli). Wszystkie hodowle w układzie hybrydowym oraz układzie kontrolnym prowadzono przez 7 dob.

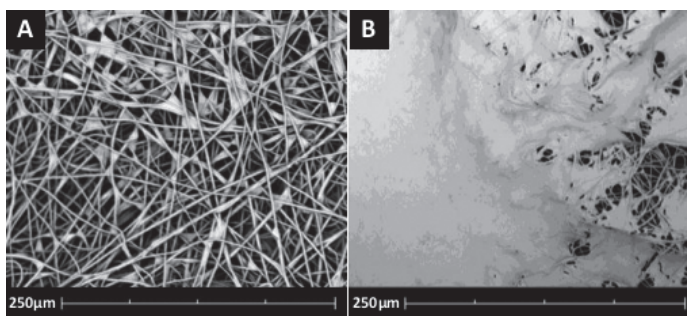
Analiza mikroskopowa. Otrzymane w wyniku hodowli w badanym hybrydowym układzie implanty zawierające chondrocyty CP5 analizowano z wykorzystaniem technik mikroskopowych. Analiza mikroskopowa obejmowała obrazowanie powierzchni zewnętrznej implantów z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) oraz konfokalną laserową mikroskopię skaningową (CLSM), umożliwiającą analizę procesów migracji i proliferacji chondrocytów wewnątrz struktury implantu PLA. Analizę SEM prowadzono przy użyciu mikroskopu *Phenom (FEI, USA)*, po uprzednim przygotowaniu preparatów implantów obejmującym inkubację w 0,5% OsO₄ (1 h w 4°C), odwodnienie/wysuszenie w bezwodnym etanolu i pokrycie warstwą złota (15 nm; *K550 Emitech, USA*). Analizę CLSM przeprowadzono przy użyciu mikroskopu *Axiocvert 100M (Carl Zeiss Jena, Niemcy)* i oprogramowania *LSM 510 META* po uprzednim wybarwieniu filamentów aktywnych (barwienie falloidyna-TRITC; *Sigma, USA*) oraz chromatyny w jądrach komórkowych (barwienie *DRAQ5TM*; *Biosstatis, Wielka Brytania*). Ana-

lizie mikroskopowej poddawano przynajmniej trzy preparaty otrzymane z trzech niezależnie przeprowadzonych hodowli w danym układzie hodowlanym.

Wyniki badań i dyskusja

Różnica gęstości elementów strukturalnych tworzących prezentowany w pracy hybrydowy układ hodowlany odpowiadała za ich przestrzenną lokalizację w naczyniu hodowlanym. Faza PFD, która charakteryzowała się największą gęstością ($\rho = 1,94 \text{ g mL}^{-1}$) pokrywała dno naczynia hodowlanego. Hydrofobowa PFD pokryta była warstwą medium hodowlanego ($\rho = 1,01 \text{ g mL}^{-1}$). Rusztowanie PLA o strukturze włóknistej ($\rho = 1,25 \text{ g mL}^{-1}$) zlokalizowane było na powierzchni międzyfazowej PFC/pożywka. Zatem, w porównaniu z układem kontrolnym, w którym rusztowanie PLA umieszczone było na dnie naczynia hodowlanego wypełnionego medium hodowlanym (bez dodatku fazy perfluorowanej), badany hybrydowy układ hodowlany charakteryzował się występowaniem dodatkowej powierzchni wymiany masy w odniesieniu do gazów oddechowych (O_2 i CO_2) poza typową w układach hodowlanych powierzchnią międzyfazową ciecz/gaz (tj. występującą na granicy faz ciekłego medium hodowlanego i atmosfery gazowej wypełniającej naczynie hodowlane nad warstwą pożywki).

Na rys. 1 przedstawiono mikrofotografię SEM rusztowań PLA pokrytych komórkami CP5 po 7 dobach hodowli w porównywanych układach: kontrolnym (Rys. 1A) i hybrydowym PFD/PLA/pożywka (Rys. 1B).

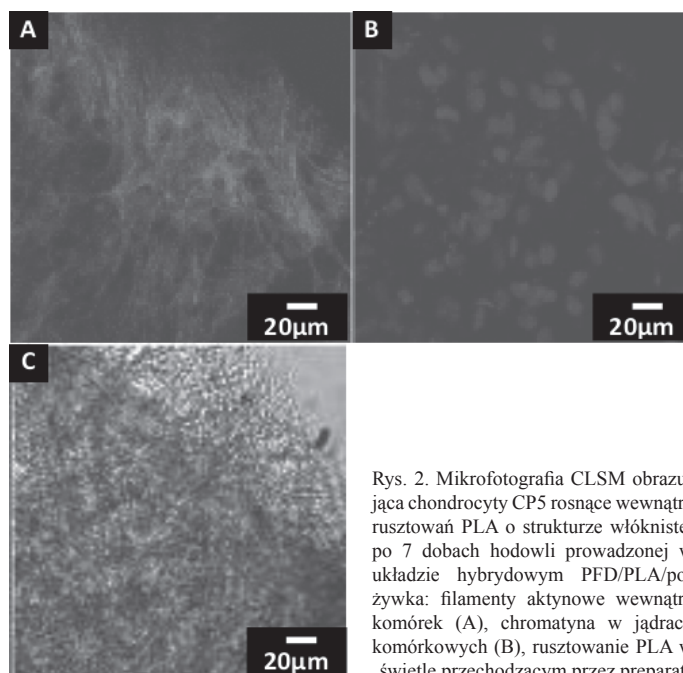


Rys. 1. Mikrofotografia SEM zewnętrznej powierzchni rusztowań PLA o strukturze włóknistej po 7 dobach hodowli chondrocytów CP5 prowadzonej w układzie kontrolnym (A) i w hybrydowym układzie PFD/PLA/pożywka (B)

Po 7 dobach hodowli zaobserwowano wydajniejsze zasiedlanie powierzchni rusztowania przez komórki CP5 w przypadku układu hybrydowego, czego efektem było całkowite pokrycie warstwą komórek i elementów ECM powierzchni zewnętrznej rusztowań PLA. W przypadku hodowli kontrolnej proliferacja komórek na powierzchni rusztowań była znacznie ograniczona.

Próby implantów pochodzących z 7 dnia hodowli w układzie hybrydowym PFD/PLA/pożywka poddano także selektywnemu wybarwieniu fluorescencyjnemu, pozwalającemu na identyfikację filamentów aktynowych (stanowiących elementy cytoszkieletu komórek) oraz chromatyny w jądrach komórkowych, a następnie zanalizowano je metodą CLSM. Na rys. 2 przedstawione zostały mikrofotografie CLSM obrazujące selektywnie wybarwione elementy chondrocytów CP5 rosnących wewnątrz badanych rusztowań PLA w układzie hybrydowym PFD/PLA/pożywka.

Wizualizacja selektywnie wybarwionych filamentów aktynowych (Rys. 2A) oraz jąder komórkowych (Rys. 2B) jednoznacznie wskazuje na migrację chondrocytów CP5 do wnętrza przestrzennej włóknistej struktury implantu PLA będącego elementem hybrydowego układu hodowlanego oraz ich prawdopodobną proliferację wewnątrz implantu. Największe skupiska chondrocytów występowały w warstwach rusztowania położonych na głębokości od $12,5 \mu\text{m}$ do $17,5 \mu\text{m}$ (analizowano kolejne skrawki optyczne co $2,5 \mu\text{m}$ w zakresie $0-35 \mu\text{m}$). Zatem wzrost chondrocytów CP5 hodowanych w hybrydowym układzie PFD/PLA/pożywka nie był ograniczony jedynie do powierzchni włóknistego rusztowania PLA (Rys. 1), lecz komórki zasiedlały także PLA w wewnętrznych warstwach implantu.



Rys. 2. Mikrofotografia CLSM obrazująca chondrocyty CP5 rosnące wewnątrz rusztowań PLA o strukturze włóknistej po 7 dobach hodowli prowadzonej w układzie hybrydowym PFD/PLA/pożywka: filanty aktynowe wewnątrz komórek (A), chromatyna w jądrach komórkowych (B), rusztowanie PLA w świetle przechodzącym przez preparat

Dane literaturowe jednoznacznie wskazują na wykazywanie przez chondrocyty powinowactwa względem rusztowań wykonanych z włókien PLA [Keeney, 2011; Chung i Burdick, 2008]. Wzrost komórek zachodzi jednak najczęściej na powierzchni takich implantów. Migracja i wzrost komórek wewnątrz rusztowań są silnie limitowane z uwagi na ograniczenia dyfuzyjne dotyczące gęstej struktury implantu. Okazało się, że zastosowanie PFD jako ciekłego nośnika gazów oddechowych w hodowli chondrocytów na włóknistym rusztowaniu PLA zapewnia odpowiednie warunki do rozwoju komórek zarówno na powierzchni implantu jak i wewnątrz jego struktury.

Wnioski

Proponowane w niniejszej pracy bioprosesowe rozwiązanie polegające na wykorzystaniu ciekłego perfluorowanego nośnika gazów oddechowych w hybrydowym układzie do przestrzennej hodowli chondrocytów na rusztowaniu PLA o strukturze włóknistej zapewnia odpowiednie warunki do rozwoju chondrocytów nie tylko na powierzchni implantu ale także do migracji i zasiedlania komórkami struktury wewnętrznej rusztowania.

LITERATURA

- Cascio B.M., Sharma B., 2008. The future of cartilage repair. *Operat. Techniq. Sports Med.*, **16**, nr 4, 221-224. DOI: 10.1053/j.otsm.2009.01.001
- Chung C. i Burdick J.A., 2008. Engineering cartilage tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 243-262. DOI: 0.1016/j.addr.2007.08.027
- Deschamps J., Menz D.H., Padua A.A.H., Gomes M.F.C., 2007. Low pressure solubility and thermodynamics of solvation of oxygen, carbon dioxide, and carbon monoxide in fluorinated liquids. *J. Chem. Thermodyn.*, **39**, 847-854. DOI: 10.1016/j.jct.2006.11.012
- Hardingham T., 2012. What makes chondrocytes special. *Osteoarthritis and Cartilage*, **20**, supplement 1, 5-6. DOI: 10.1016/j.joca.2012.02.623
- Keeney M., Lai J.H., Yang F., 2011. Recent progress in cartilage tissue engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **22**, 734-740. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.04.003
- Kellner K., Liebsch G., Klimant I., Wolfbeis O.S., Blunk T., Schulz M.B., Gopferich A., 2002. Determination of oxygen gradients in engineered tissue using a fluorescent sensor. *Biotechnol. Bioeng.*, **80**, 73-83. DOI: 10.1002/bit.10352
- Lu X.L., Mow V.C., 2008. Biomechanics of articular cartilage and determination of material properties. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **40**, nr 2, 193-199. DOI: 10.1249/mss.0b013e31815cb1fc
- Pilarek M., Grabowska I., Ciemerych M.A., Dąbkowska K., Szewczyk K.W., 2013. Morphology and growth of mammalian cells in a liquid/liquid culture system supported with oxygenated perfluorodecalin. *Biotechnol. Lett.*, **35**, 1387-1394. DOI: 10.1007/s10529-013-1218-2

Badania zostają sfinansowane przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach projektu MNT-ERA.NET „ArtiCart”.