

Agata STEFANEK, Tomasz CIACH

e-mail: a.walczak@ichip.pw.edu.pl

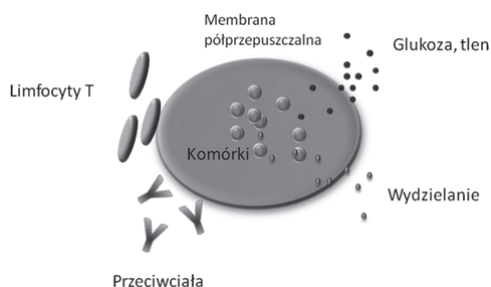
Zakład Biotechnologii i Inżynierii Bioprosesowej, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Biomimetyczne matryce do przestrzennej hodowli komórek

Wstęp

Obecnie nauka nie dysponuje narzędziem do długoterminowej, trójwymiarowej hodowli komórek *in vitro* i *in vivo* [Breslin, 2013]. Główną przeszkodą w prowadzeniu przestrzennej hodowli komórek jest niedostateczny transport składników odżywczych (tlenu, glukozy) do wnętrza przestrzennych struktur komórkowych [Li i in., 2014]. Opracowanie technik i materiałów umożliwiających stabilną i długoterminową hodowlę komórek w warunkach *in vitro* i *in vivo* jest obecnie kluczowym zagadnieniem inżynierii tkankowej [Kang i in., 2014].

Celem niniejszych badań było opracowanie biomimetycznej matrycy hydrożelowej zawierającej syntetyczny nośnik tlenu (perfluorodekalinę, PFD) do długoterminowej, trójwymiarowej hodowli komórek zarówno w modelu *in vitro*, jak i *in vivo*. Matryca powinna odwzorowywać naturalnie występującą matrycę zewnątrzkomórkową (ECM), umożliwiającą swobodny transport składników odżywczych do wnętrza komórek, wydzielanie produktów metabolizmu komórek na zewnątrz matrycy, a ponadto zapewniać immunoizolację (Rys. 1). Syntetyczny nośnik tlenu ma z kolei pokonać powszechnie raportowany problem niedostatecznego dotlenienia komórek w hodowlach trójwymiarowych oraz zapobiec tworzeniu się stref nekrotycznych w agregatach komórkowych [Khattak i in., 2007].



Rys. 1. Schemat biomimetycznej matrycy do przestrzennej hodowli komórek

W pracy przedstawiono wyniki wstępne tych badań obejmujące opracowanie warunków prowadzenia procesu produkcji dwufazowych matryc do hodowli komórek, a szczególności wpływu parametrów procesu na średnicę produkowanych struktur oraz przeprowadzenie hodowli ludzkich komórek chrzęstnych (linii CP5) w uproszczonej strukturze matrycy hydrożelowej.

Badania doświadczalne

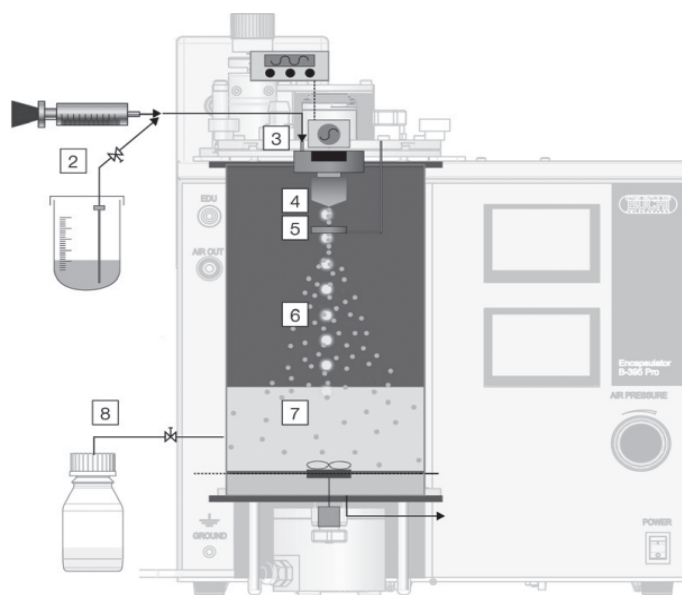
Materiały

Do produkcji mikrokapsulek dwufazowych używano oleju z pestek winogron (*Monini*) oraz 1,5% roztworu alginianu sodu (*Sigma*) w wodzie. Mikrokapsułki polimeryzowały w 0,1 M roztworze chlorku wapnia (*Fluka*). Ludzkie komórki chrzęstne (chondrocyty) linii CP5 hodowane były w butelkach hodowlanych o powierzchni dna 75 cm² (*Corning*) i pasażowane przy użyciu 0,25% roztworu Trypsyny-EDTA (*Lonza*) co ok. 3 dni po osiągnięciu 80% konfluencji. Używano pożywki DMEM, 20% FBS, 1% L-glutaminy, 1% Pen-Strep (wszystkie odczynniki *Life Technologies*), którą zmieniano co 3 dni. Komórki poddano barwieniu przeżyciowemu zestawem do barwienia typu *Live/Dead* (kalceina, jodek propidyny, *Sigma*).

Metody

Mikrokapsułki dwufazowe o różnych średnicach zbudowane z rdzenia (olej z pestek winogron) i otoczki alginianowej wytwarzane były

przy użyciu enkapsulatora *B-395 Pro*, *Buchi* z dyszą koncentryczną umożliwiającą produkcję dwufazowych struktur typu rdzeń/otoczka. W enkapsulatorze laminarny przepływ roztworów tworzących rdzeń i otoczkę (kolejno olej z pestek winogron i 1,5% roztwór alginianu sodu) przez dyszę koncentryczną zakłócany jest wibracjami, które przy optymalnej częstotliwości drgań powodują podzielenie strumienia na jednorodne krople, którym następnie nadawany jest powierzchniowy, jednoimienny ładunek elektrostatyczny przy pomocy elektrody, co zapobiega ich agregacji. Krople następnie wpadają do roztworu polimeryzującego (0,1 M roztworu chlorku wapnia), gdzie ulegają usieciowaniu (Rys. 2). Wszystkie parametry procesu (natężenie przepływu roztworów, średnica dyszy, częstotliwość i amplituda drgań, napięcie elektrody) można zadać i kontrolować w trakcie trwania procesu, co sprawia, że produkowane struktury są wysoce jednorodne. Przeprowadzono pomiary rozkładu średnic produkowanych struktur dla dysz koncentrycznych o średnicach: 150/300 μm, 200/300 μm (średnica wewnętrzna/zewnętrzna).



Rys. 2. Schemat aparatury do produkcji mikrokapsulek: 2 – podawanie roztworu alginianu i oleju, 3 – jednostka wibrująca, 4 – dysza koncentryczna, 5 – elektroda, 6 – rozdzielone krople, 7 – polimeryzacja i utrwalenie mikrosfer [BUCHI, 2014]

Przeprowadzono 7-dniową hodowlę ludzkich komórek chrzęstnych linii CP5 w uproszczonym modelu matrycy hydrożelowych. Komórki enkapsulowano w mikrosferach alginianowych ($5 \cdot 10^5$ komórek/ml roztworu alginianu) o średniej średnicy 343,46 μm przy użyciu enkapsulatora *B-395 Pro*, *Buchi* zgodnie z opisaną wyżej metodyką, bez użycia dyszy koncentrycznej. Warunki prowadzenia procesu zamieszczono w tab. 1. Mikrosfery z enkapsulowanymi komórkami umieszczono na szalkach *Petriego* i dodano pożywki w objętości 1:3. Pożywkę zmieniano co 3 dni prowadzenia hodowli. W celu oceny żywotności i morfologii enkapsulowanych komórek przeprowadzono barwienie przeżyciowe typu *Live/Dead* po 24 h, 48 h i 7 dniach hodowli zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta.

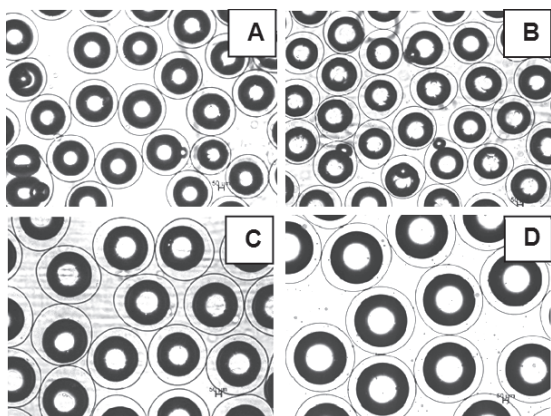
Tab. 1. Parametry procesu enkapsulacji

Natężenie przepływu alginianu [ml/min]	Częstotliwość drgań dyszy [Hz]	Amplituda drgań	Napięcie elektrody [V]
8,5	1600	3	1300

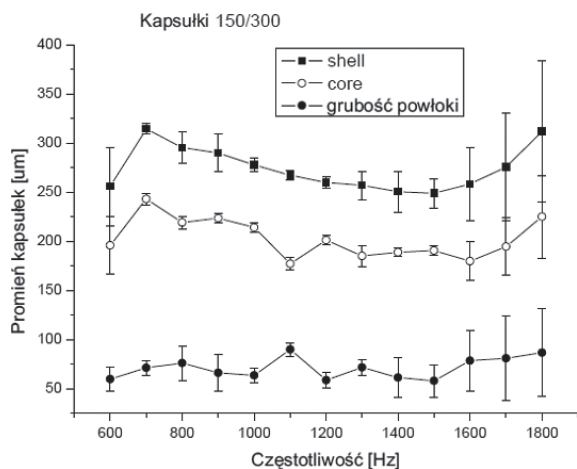
Wyniki

Opracowano parametry procesowe pozwalające na produkcję mikro-kapsulek dwufazowych o ściśle określonych, jednorodnych i przewidywalnych rozmiarach dla dysz o średnicach 120/200 μm , 150/200 μm , 150/300 μm i 200/300 μm .

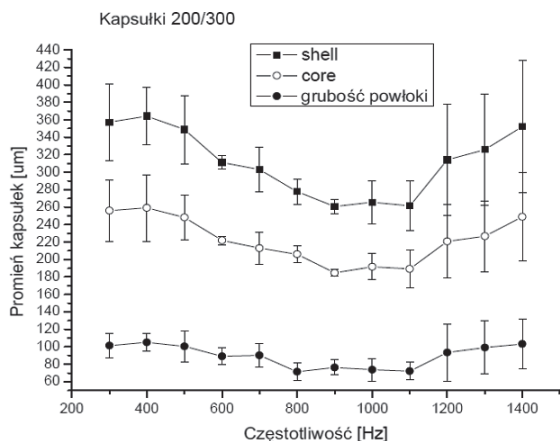
Zestawienie parametrów podano w tab. 2. Przykłady produkowanych mikro-kapsulek przedstawiono na rys. 3. Zależność średnicy produkowanych mikrosfer od częstotliwości drgań dla dysz o średnicy 150/300 μm , 200/300 μm zamieszczono na rys. 4 i 5. Zdjęcia enkapsulowanych komórek chrzęstnych w różnych punktach czasowych prowadzonej hodowli, poddanych barwieniu przeżyciowemu przedstawiono na rys. 6.



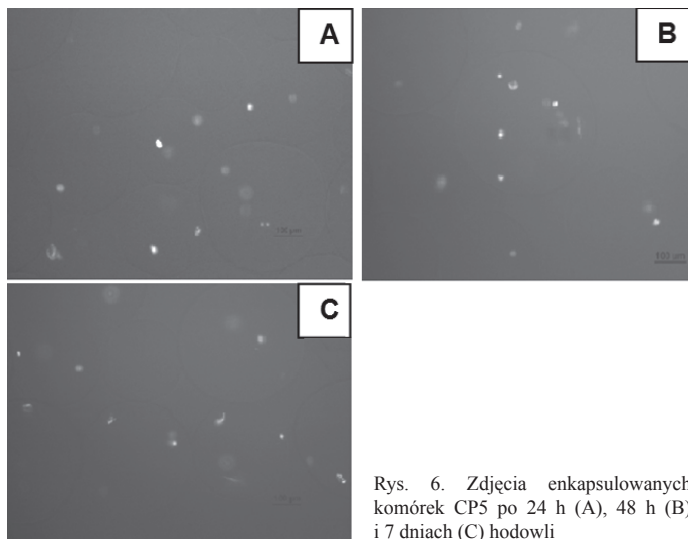
Rys. 3. Zdjęcia przedstawiające przykłady produkowanych mikro-kapsulek przy użyciu dysz o średnicach: A-120/200 μm , B-150/200 μm , C-150/300 μm i D-200/300 μm



Rys. 4. Wykres przedstawiający wpływ częstotliwości drgań na średnicę mikro-kapsulek dla dyszy o średnicy 150/300 μm



Rys. 5. Wykres przedstawiający wpływ częstotliwości drgań na średnicę mikro-kapsulek dla dyszy o średnicy 200/300 μm



Rys. 6. Zdjęcia enkapsulowanych komórek CP5 po 24 h (A), 48 h (B) i 7 dniach (C) hodowli

Tab. 2. Parametry procesu produkcji mikrosfer dobrane w zależności od rozmiaru dyszy

Średnica dyszy [μm / μm]	Natężenie przepływu alginianu [ml/min]	Częstotliwość drgań [kHz]	Amplituda drgań	Napięcie elektrody [kV]
120/200	1,7	1÷1,2	2	1,3÷1,7
150/200	2,2	1,6÷1,9	3	1,5
150/300	2,3	1,1÷1,4	2	1,9÷2,3
200/300	1,5	0,6÷0,9	2	1,5÷2

Podsumowanie i wnioski

Opracowano metodę produkcji jednorodnych mikro-kapsulek dwufazowych o jednorodnych i powtarzalnych średnicach, zbudowanych z rdzenia (faza olejowa) i otoczki alginianowej. Dobrano parametry prowadzenia procesu w zależności od rozmiaru dyszy. Opracowana metoda będzie mogła być użyta do produkcji biomimetycznych matryc z dodatkiem perfluorowęgla do hodowli komórek.

Średnice produkowanych mikro-kapsulek maleją wraz ze wzrostem częstotliwości drgań dyszy w zakresie częstotliwości pozwalającym na produkcję jednorodnych struktur.

Przeprowadzono również 7-dniową hodowlę enkapsulowanych ludzkich komórek chrzęstnych. Komórki przeżyły proces enkapsulacji, co świadczy o tym, że proces był prowadzony w warunkach fizjologicznych. Stwierdzono, że komórki nie wykazują prawidłowej morfologii, co świadczy o tym, że nie uległy adhezji. Liczba żywych komórek przez okres hodowli była stała, nie odnotowano znaczącego wzrostu liczby żywych komórek, co może świadczyć o spowolnieniu cyklu komórkowego. Od drugiego dnia hodowli zauważono pojawianie się nekrotycznych stref w centrum agregatów komórkowych, co świadczy o niewystarczającym transporcie składników odżywczych do komórek i uzasadnia użycie w przyszłości syntetycznego nośnika tlenu w projekcie biomimetycznych matryc do przestrzennej hodowli komórek.

LITERATURA

Breslin S., O'Driscoll L., 2013. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*, **18**, 240-249. DOI:10.1016/j.drudis.2012.10.003

BUCHI, 2014. *Encapsulator B-390/B-395 Pro Technical data sheet*. (06.2014) http://www.buchi.com/sites/default/files/technical-data-pdf/B-390_B-395Pro_Data_Sheet_EN_A.pdf

Kang A., Park J., Ju J., Jeong G.S., Lee S-H., 2014. Cell encapsulation via microtechnologies. *Biomaterials*, **35**, 2651-2663. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.073

Khattak S.F., Chin K., Bhatia S.R., Roberts S.C., 2007. Enhancing oxygen tension and cellular function in alginate cell encapsulation devices through the use of perfluorocarbons. *Biotechnol. Bioeng.*, **96**, 156-166. DOI: 10.1002/bit.21151

Li Z., Cui Z., 2014. Three-dimensional perfused cell culture, *Biotechnology Advances*, **32**, 243-254. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.10.006