

© Коллектив авторов, 2015  
УДК 611.018

*Е. В. Кудан<sup>1</sup>, Ф. Д. А. С. Перейра<sup>1</sup>, В. А. Парфенов<sup>1</sup>, В. А. Касьянов<sup>2, 3</sup>, Ю. Д. Хесуани<sup>1</sup>,  
Е. А. Буланова<sup>1</sup>, В. А. Миронов<sup>1</sup>*

## РАСПЛАСТЫВАНИЕ ТКАНЕВЫХ СФЕРОИДОВ, СФОРМИРОВАННЫХ ИЗ ПЕРВИЧНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА, НА ПОВЕРХНОСТИ МИКРОВОЛОКНИСТОГО ЭЛЕКТРОСПИННИНГОВОГО ПОЛИУРЕТАНОВОГО МАТРИКСА (сканирующее электронно-микроскопическое исследование)

<sup>1</sup> Лаборатория биотехнологических исследований (зав. — канд. мед. наук В. А. Миронов), «3Д Биопринтинг Солюшенс», Москва; <sup>2</sup> лаборатория биомеханики (зав. — проф. В. А. Касьянов), Рижский университет им. П. Страдиныша, Латвия; <sup>3</sup> лаборатория биомеханики (зав. — канд. техн. наук В. Витиньш), Рижский технический университет, Латвия

Тканевые сфероиды, сформированные из первичных фибробластов человека с использованием неадгезивных агарозных форм, были размещены с помощью трехмерного биопринтера на поверхности микроволокнистого полиуретанового матрикса, полученного методом электроспиннинга. Было показано, что тканевые сфероиды прикрепляются к поверхности матрикса в течение нескольких часов и далее постепенно распластываются в течение нескольких суток, что свидетельствует о высокой степени биосовместимости электроспиннингового микроволокнистого полиуретанового матрикса. Фибробласты человека при этом используют отростки ведущего края клетки для начального этапа прикрепления к микроволокнам матрикса. Тканевые конструкции, образующиеся при распластывании тканевых сфероидов на биосовместимом электроспиннинговом микроволокнистом полиуретановом матриксе, являются перспективной технологической платформой для разработки новых методов биофабрикации и трехмерной биопечати.

**Ключевые слова:** *тканевые сфероиды, внеклеточный матрикс, распластывание, биосовместимость*

Трехмерную биопечать органов можно определить как автоматизированную послойную биофабрикацию функциональных трехмерных тканевых и органных конструкций на основе цифровой модели с использованием тканевых сфероидов в качестве строительных блоков [8]. Тканевые сфероиды — это трехмерные агрегаты плотно расположенных культуральных клеток различного происхождения. Фундаментальным биологическим принципом данного варианта технологии биопечати является феномен тканевого слияния [10]. Предполагается, что тканевые сфероиды, находящиеся близко друг к другу, сливаются в результате действия сил поверхностного натяжения [3], однако это происходит только в том случае, если они удерживаются в непосредственном контакте друг с другом. Для удержания тканевых сфероидов рядом друг с другом в трехмерном пространстве предложено использовать напечатанные синтетические каркасы [4, 13], гидрогели [5] и даже металлические стержни [9].

Технология электроспиннинга позволяет создавать биосовместимые микроволокнистые матриксы, которые очень напоминают по своей структурной организации внеклеточный матрикс. Электроспиннинг — это технология производства тонких филаментов из раствора биополимера под воздействием электрического заряда [8, 11]. Показано, что тканевые сфероиды прикрепляются к электроспиннинговым синтетическим матриксам [2], которые могут удерживать тканевые сфероиды в прикрепленном [15] или распластанном состоянии [1]. При этом прикрепленные к электроспиннинговому микроволокнистому синтетическому матриксу тканевые сфероиды могут сливаться [1], однако кинетике их распластывания и вопросам биосовместимости не уделено достаточного внимания. Теория распластывания клеток на матриксах была описана ранее [12].

Цель настоящего исследования — изучение распластывания тканевых сфероидов на поверхности электроспиннингового микроволокнистого

### Сведения об авторах:

*Кудан Елизавета Валерьевна* (e-mail: [info@bioprinting.ru](mailto:info@bioprinting.ru)), *Фредерико Давид Сена Перейра*, *Парфенов Владислав Александрович*, *Хесуани Юсеф Джоржевич*, *Буланова Елена Анатольевна*, *Миронов Владимир Александрович*, лаборатория биотехнологических исследований, «3Д Биопринтинг Солюшенс», 115409, Москва, Каширское шоссе, 68, стр. 2

*Касьянов Владимир Александрович* (e-mail: [kasyanov@latnet.lv](mailto:kasyanov@latnet.lv)), лаборатория биомеханики, Рижский технический университет, LV-1658, Латвия, г. Рига, ул. Кальку, 1

полиуретанового матрикса и его биосовместимости.

**Материал и методы.** Биосовместимый полиуретан (EG-85A, Lubrizol, США), разрешенный для клинического использования в США, был любезно предоставлен проф. Сюдженем Венем (Хуеюн Вен, США). Микроволокнистый полиуретановый матрикс был получен методом электроспиннинга (Yflow, Испания). Тканевые сфероиды получали из первичной культуры фибробластов человека с использованием неадгезивных агарозных форм. Первичные фибробласты человека (Lonza, Германия, кат.# CC-2511) культивировали при температуре 37 °C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> в среде DMEM (Gibco, Германия, кат.# 12491-015), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, Германия, кат.# 16000-044), 1 mM L-глутамин (Панэко, Россия, кат.# Ф032) и смесь антибиотиков/антимикотиков (Gibco, Германия, кат.# 15240-062). Формирование тканевых сфероидов проводили с помощью неадгезивных агарозных форм. Агарозные формы на основе силиконовых штампов (Microtissues, США, кат.# 12-81), содержащие 81 ячейку, были получены из 2% раствора агарозы в натрий-фосфатном буфере. Из первичной культуры фибробластов человека была приготовлена клеточная суспензия с концентрацией  $6,8 \cdot 10^6$  кл/мл. В каждую из агарозных форм было помещено по 190 мкл клеточной суспензии. Через 40 мин, когда клетки полностью осели на дно ячеек, вокруг агарозных форм была добавлена культуральная среда. Агарозные формы, содержащие формирующиеся сфероиды, инкубировали при температуре 37 °C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> в течение 3 сут. Полученные 3-суточные тканевые сфероиды размещали на поверхности электроспиннингового полиуретанового матрикса с помощью оригинального трехмерного мультифункционального биопринтера Фабион (3Д Биопринтинг Солюшенс, Россия).

Для сканирующей электронной микроскопии образцы подвергали дегидратации, высушиванию методом перехода критической точки на установке НСР-2 (Hitachi, Япония) и напылению золотом с помощью установки ионного напыления ИВ-3 (ЕИКО, Япония). Напыленные образцы изучали, используя сканирующий электронный микроскоп JSM -6510 LV (JEOL, Япония).

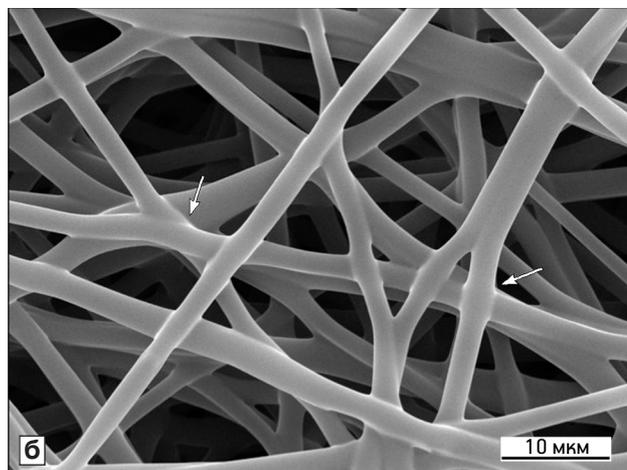
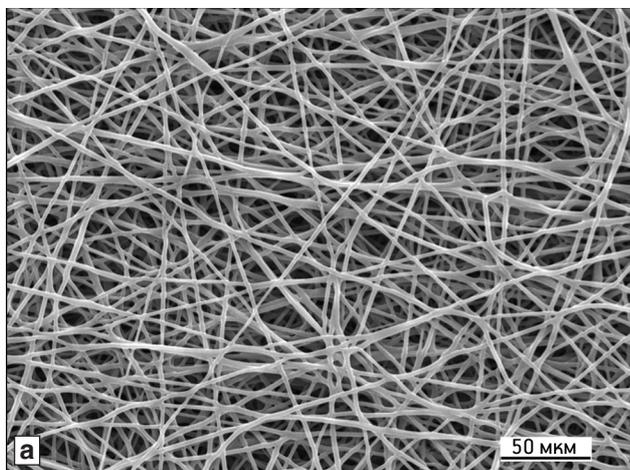


Рис. 1. Фрагменты (а, б) упорядоченной сети филаментов электроспиннингового полиуретанового микроволокнистого матрикса.

Стрелки — точки пересечения филаментов матрикса. Сканирующая электронная микроскопия

Кинетику распластывания тканевых сфероидов на электроспиннинговом полиуретановом матриксе оценивали путем измерения их диаметра в ходе прикрепления и последующего распластывания. Проведено 2 эксперимента, в каждом из них были использованы следующие временные точки распластывания: 4, 24, 48 ч, 4 и 7 сут. В каждой временной точке были измерены 15–20 сфероидов. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы GraphPad Prizm (Ла Хойя, США).

**Результаты исследования.** При сканирующей электронной микроскопии было обнаружено, что электроспиннинговые полиуретановые волокна имеют регулярный диаметр (рис. 1), сливаются в точках их пересечения (см. рис. 1, б), образуя однородную плотную сеть филаментов. Морфометрический анализ полученных изображений показал, что диаметр волокон составляет  $3,2 \pm 1,4$  мкм.

Тканевые сфероиды (рис. 2) были регулярно размещены на поверхности электроспиннингового микроволокнистого полиуретанового матрикса с помощью оригинального трехмерного биопринтера Фабион (рис. 3). На начальной стадии распластывания, занимающей от 1 до 4 ч, от внешней поверхности сфероидов начинают отделяться клетки-пионеры, прикрепляющиеся ведущим краем к поверхности матрикса. При этом тело клеток остается в составе сфероида. Диаметр сфероидов на этой стадии не претерпевает существенных изменений и составляет  $281 \pm 14$  мкм.

На следующей стадии распластывания, на 1-е и 2-е сутки, отдельные клетки покидают тело сфероидов и мигрируют по волокнам матрикса (рис. 4, а, б). Диаметр тела сфероидов остается неизменным —  $283 \pm 13$  мкм. Однако, если учитывать клетки, мигрирующие на матрикс, диаметр сфероидов увеличивается до  $558 \pm 99$  мкм.

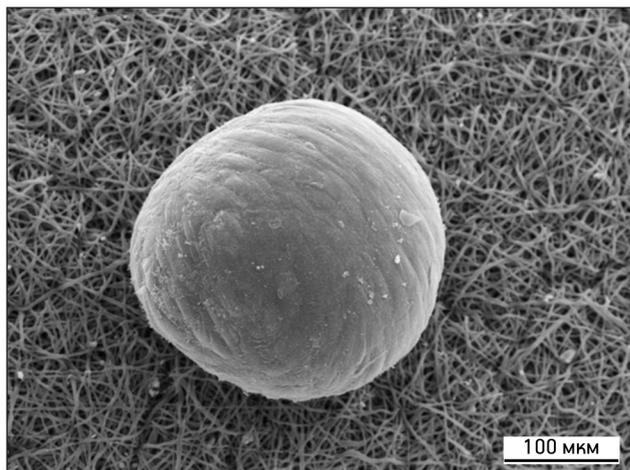


Рис. 2. Тканевый сфероид, сформированный из первичных фибробластов человека, на поверхности микроволоконистого электроспиннингового полиуретанового матрикса.

4 ч распластывания тканевого сфероид на матриксе. Сфероид сохраняет шарообразную форму, мигрирующие клетки отсутствуют. Сканирующая электронная микроскопия

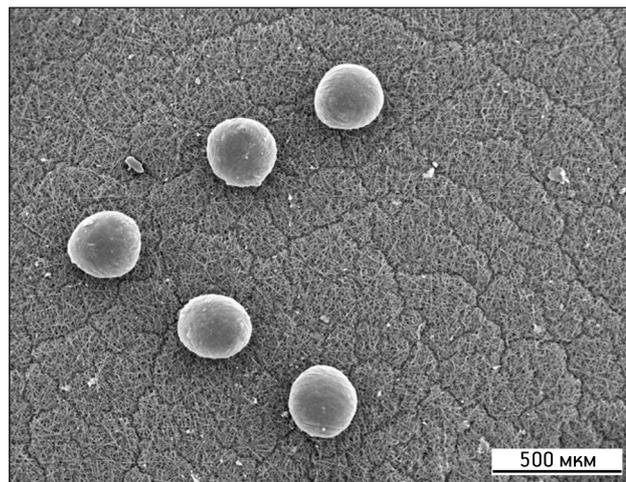


Рис. 3. Тканевые сфероиды, напечатанные на поверхности микроволоконистого электроспиннингового полиуретанового матрикса с помощью трехмерного биопринтера.

4 ч распластывания. Сканирующая электронная микроскопия

На 4-е сутки существенно возрастает количество мигрирующих из сфероидов клеток, их можно выделить в отдельную зону (см. рис. 4, в). Общий диаметр сфероидов с учетом распластанных клеток составляет  $984 \pm 41$  мкм. Тело сфероидов существенно уплощается, однако по-прежнему остается видимым. На 7-е сутки сфероид практически дезинтегрирован (см. рис. 4, г), и на поверхности матрикса визуализируются многочисленные фибробласты, ориентированные вдоль волокон матрикса. От тела сфероидов остается уплощенный купол, по диаметру совпадающий с исходным сфероидом —  $312 \pm 56$  мкм. Общий диаметр сфероидов с учетом зоны мигрировавших клеток составляет  $2718 \pm 126$  мкм. Таким образом, измерение диаметров тканевых сфероидов показало, что они довольно быстро прикрепляются к поверхности полиуретанового матрикса и в течение нескольких суток полностью распластываются, что свидетельствует о высокой биосовместимости сфероидов с полиуретановым матриксом. В ходе распластывания первичные фибробласты человека используют отростки ведущего края клетки (ламеллоподии и филоподии) для начального контакта с волокнами матрикса (рис. 5).

**Обсуждение полученных данных.** Согласно полученным данным, при полном распластывании диаметр дезинтегрированного тканевого сфероидов превышает его изначальный диаметр в 8,4 раза. Распластывание тканевого сфероидов является результатом баланса физических сил, оперирующих на границе клеток и матрикса

и между самими клетками внутри тканевого сфероидов. Если клеточно-матриксное взаимодействие (адгезия к матриксу) намного сильнее, чем клеточно-клеточные взаимодействия (когезия), то результатом является наблюдаемое полное распластывание до уровня клеточного монослоя [12]. С другой стороны — слабые физические силы взаимодействия между клетками и матриксом (слабая адгезия) и сильные клеточно-клеточные взаимодействия между клетками внутри сфероидов (сильная когезия) могут привести к образованию так называемых прикрепленных, но нераспластанных тканевых сфероидов [15]. Кинетику распластывания тканевых сфероидов можно использовать в качестве количественного показателя для оценки тканевой биосовместимости новых электроспиннинговых биоматериалов. Зона контакта ведущего края фибробластов с филаментами полиуретанового матрикса нуждается в дальнейшем систематическом исследовании с применением современных методов нанотомографии.

Недавно было показано, что электроспиннинговый синтетический матрикс можно магнитно функционализировать с помощью магнитных наночастиц [6]. Магнитная функционализация — это добавление магнитных наночастиц в биополимер, после чего он приобретает магнитные свойства. Более того, тканевые сфероиды также могут быть сформированы из клеток, предварительно меченных магнитными наночастицами [14]. Это позволяет начать разработку принципиально новых технологий трехмерной магнитной биопечати, основанной на магнитной левитации (пере-

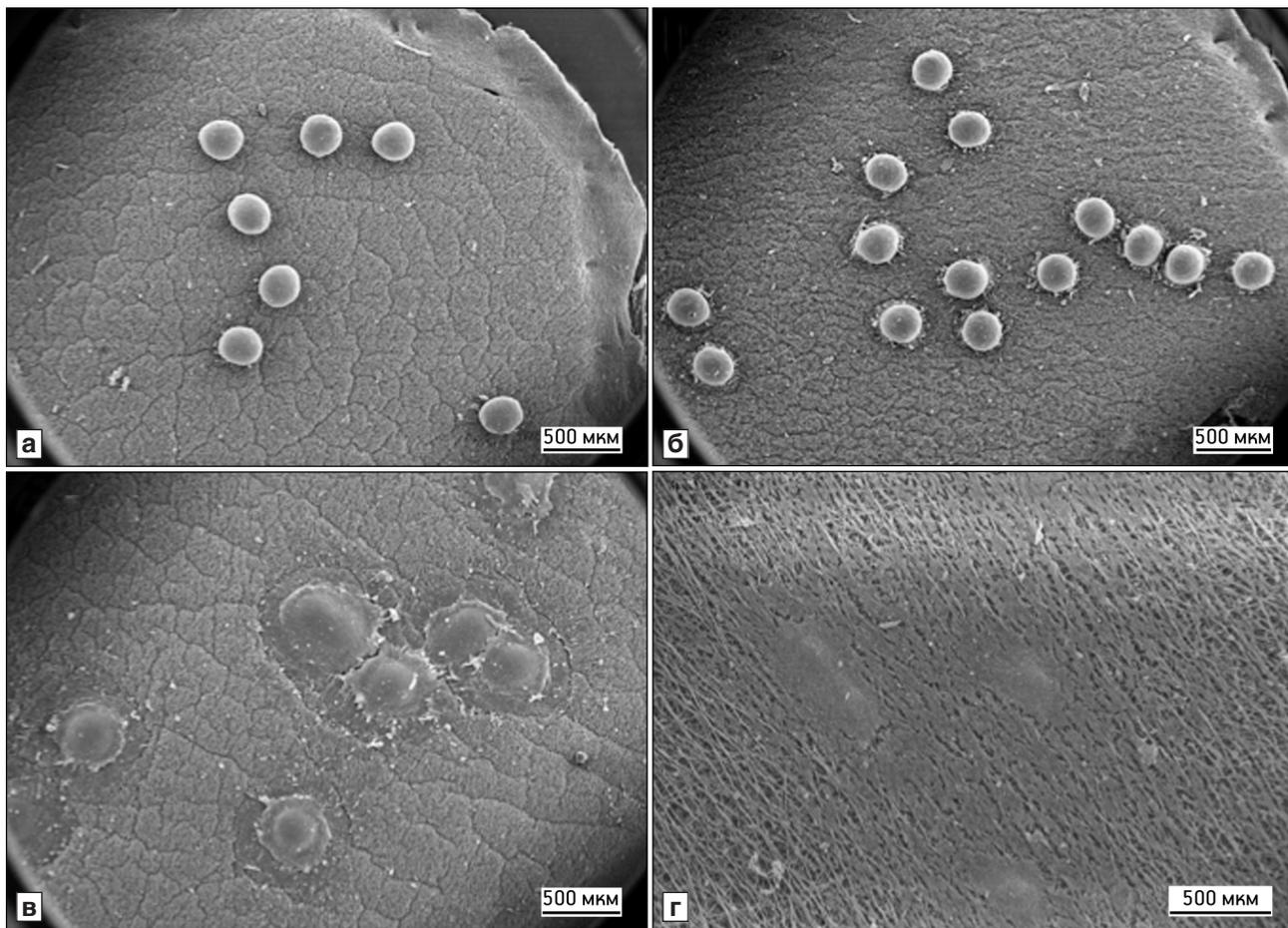


Рис. 4. Тканевые сфероиды через 4 (а), 24 ч (б), 4 (в) и 8 сут (г) распластывания на электроспиннинговом полиуретановом микроволокнистом матриксе.

а — сфероиды шарообразной формы без мигрирующих клеток; б — видны отдельные клетки, мигрирующие из тела сфероид; в — отчетливое разделение на зону первичного тела сфероид и зону мигрирующих клеток; г — сфероиды дезинтегрированы до уровня монослоя на матриксе; первичное тело сфероид практически неразлично. Сканирующая электронная микроскопия

мещении объектов в трехмерном пространстве под влиянием магнитных сил) с использованием в качестве носителя для тканевых сфероидов биосовместимого микроволокнистого электроспиннингового полиуретанового матрикса.

Тканевые сфероиды, сформированные из первичных фибробластов человека, были регулярно расположены с помощью биопринтера на поверхности микроволокнистого матрикса, созданного методом электроспиннинга. Они могут прикрепляться и распластываться на электроспиннинговом полиуретановом матриксе, что свидетельствует о его высокой биосовместимости. Процесс прикрепления тканевых сфероидов осуществляется в течение нескольких часов, полное распластывание происходит в течение 7 сут. Тканевые конструкции, образующиеся в результате прикрепления и распластывания тканевых сфероидов на электроспиннированных матриксах, могут служить новой технологической платформой в трехмерной биопечати.

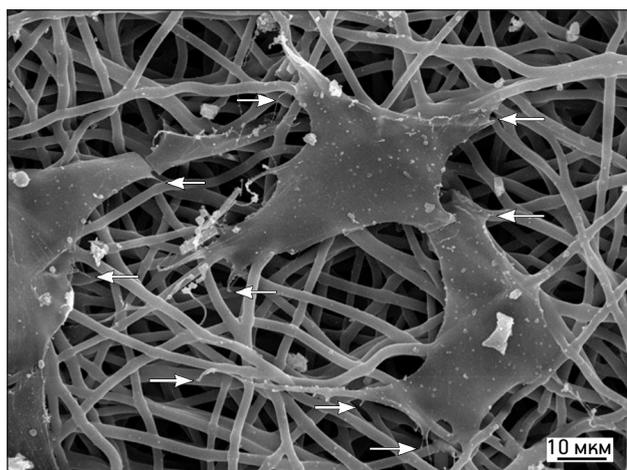


Рис. 5. Отдельные первичные фибробласты человека, распластанные на поверхности электроспиннингового микроволокнистого полиуретанового матрикса.

Стрелки указывают на места контакта отростков ведущего края клеток с филаментами матрикса. Сканирующая электронная микроскопия

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 15-15-00173).*

*Авторы благодарят за предоставленную возможность выполнить исследования на сканирующем электронном микроскопе в Центре коллективного пользования электронной микроскопии Института биологии внутренних вод им. И.Д.Папанина РАН.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Beachley V., Kasyanov V., Nagy-Mehesz A. et al. The fusion of tissue spheroids attached to pre-stretched electrospun polyurethane scaffolds // *J. Tissue Eng.* 2014. Vol. 5. P. 8–15.
2. Chua K.N., Lim W.S., Zhang P. et al. Stable immobilization of rat hepatocyte spheroids on galactosylated nanofiber scaffold // *Biomaterials.* 2005. Vol. 26. P. 2537–2547.
3. Foty R.A., Pflieger C.M., Forgacs G., Steinberg M.S. Surface tensions of embryonic tissues predict their mutual envelopment behavior // *Development.* 1996. Vol. 122. P. 1611–1620.
4. Huang G.S., Tseng C.S., Linju Y. B. et al. Solid freeform-fabricated scaffolds designed to carry multicellular mesenchymal stem cell spheroids for cartilage regeneration // *Eur. Cell Mater.* 2013. Vol. 26. P. 179–194.
5. Jakab K., Neagu A., Mironov V. et al. Engineering biological structures of prescribed shape using self-assembling multicellular systems // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. Vol. 101. P. 2864–2869.
6. Lee H.J., Lee S.J., Uthaman S. et al. Biomedical applications of magnetically functionalized organic/inorganic hybrid nanofibers // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16. P. 13661–13677.
7. Mironov V., Kasyanov V., Markwald R.R. Nanotechnology in vascular tissue engineering: from nanoscaffolding towards rapid vessel biofabrication // *Trends Biotechnol.* 2008. Vol. 26. P. 338–344.
8. Mironov V., Visconti R.P., Kasyanov V. et al. Organ printing: tissue spheroids as building blocks // *Biomaterials.* 2009. Vol. 30. P. 2164–2174.
9. Nakayama K. In Vitro Biofabrication of Tissues and Organs. In *Biofabrication: Micro- and Nanofabrication Printing Patterning and Assemblies.* Amsterdam: Elsevier, 2013.
10. Pérez-Pomares J.M., Foty R.A. Tissue fusion and cell sorting in embryonic development and disease: biomedical implications // *Bioessays.* 2006. Vol. 28. P. 809–821.
11. Pham Q.P., Sharma U., Mikos A.G. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review // *Tissue Eng.* 2006. Vol. 12. P. 1197–1211.
12. Ryan P.L., Foty R.A., Kohn J., Steinberg M.S. Tissue spreading on implantable substrates is a competitive outcome of cell-cell vs. cell-substratum adhesivity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. Vol. 98. P. 4323–4327.
13. Schon B.S., Schrobback K., van der Ven M. et al. Validation of a high-throughput microtissue fabrication process for 3D assembly of tissue engineered cartilage constructs // *Cell Tis. Res.* 2012. Vol. 3. P. 245–249.
14. Whatley B.R., Li X., Zhang N., Wen X. Magnetic-directed patterning of cell spheroids // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2014. Vol. 102. P. 1537–1547.
15. Xia L., Sakban R.B., Qu Y. et al. Tethered spheroids as an in vitro hepatocyte model for drug safety screening // *Biomaterials.* 2012. Vol. 33. P. 2165–2176.

Поступила в редакцию 20.10.2015

#### **SPREADING OF TISSUE SPHEROIDS FROM PRIMARY HUMAN FIBROBLASTS ON THE SURFACE OF MICROFIBROUS ELECTROSPUN POLYURETHANE MATRIX (A scanning electron microscopic study)**

*Ye. V. Kudan<sup>1</sup>, F. D. A. S. Pereira<sup>1</sup>, V. A. Parfenov<sup>1</sup>, V. A. Kasyanov<sup>2,3</sup>, Yu. D. Khesuani<sup>1</sup>, Ye. A. Bulanova<sup>1</sup>, V. A. Mironov<sup>1</sup>*

Tissue spheroids biofabricated from primary human fibroblasts using non-adhesive agarose forms, were placed by 3D bioprinter on the surface of microfibrillar electrospun matrix. It was demonstrated that tissue spheroids attached to the surface of matrix during several hours and then gradually spread for several days which indicates high level of biocompatibility of electrospun microfibrillar polyurethane matrix. During this activity, human fibroblasts used processes of leading cell borders for initial step of attachment to matrix filaments. Tissue constructions formed during spreading of tissue spheroids on the surface of electrospun microfibrillar polyurethane matrix seem to be a perspective technology platform for development of new methods of biofabrication and 3D bioprinting.

**Key words:** *tissue spheroids, extracellular matrix, spreading, biocompatibility*

<sup>1</sup> Laboratory of Biotechnological Research, «3D Bioprinting Solutions», Moscow; <sup>2</sup> Laboratory of Biomechanics, P. Stradina Riga University, Latvia; <sup>3</sup> Laboratory of Biomechanics, Riga Technical University, Latvia