

**Первый Московский государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова
Фармацевтический факультет**

Отчет о выполнении летней практики:

***«Формирование тканевых сфероидов с
помощью 3D Petri Dish и пересадка сфероидов на
коллагеновую подложку»***

Выполнила:
студентка 3 курса 15 группы
ЦИОП «Медицина будущего»
Грядунова А. А.

Руководитель:
Буланова Е. А.

Место прохождения практики: Лаборатория биотехнологических исследований «3D Bioprinting Solutions»

Оглавление

1. Введение.....	2
1.1. Коллаген.....	2
1.2. Тканевые сфероиды.....	2
1.3. Биопринтинг.....	2
Цели и задачи данной работы.....	3
2. Материалы и методы.....	3
2.1. Получение тканевых сфероидов.....	3
2.2. Получение коллагенового гидрогеля.....	5
2.3. Печать коллагеновой подложки и пересадка сфероидов.....	7
3. Результаты.....	7
Выводы.....	8
Список литературы.....	9

1. Введение

1.1. Коллаген

Коллаген является основным компонентом внеклеточного матрикса и в значительной степени присутствует в телах млекопитающих. Поскольку коллаген может быть извлечен в больших количествах, он был широко изучен в применении его как природного материала в тканевой инженерии. Коллаген представляет собой нерастворимый фибриллярный белок. Его основная функция заключается в обеспечении механической целостности различных тканей и органов, таких как сухожилия, кости и т.д. В данной работе выделение коллагена было проведено с использованием крысиных хвостов. Хорошая биосовместимость коллагена, обусловленная способностью к биологическому разложению и низкой антигенностью, позволяет использовать его в качестве материала для создания гидрогеля, применяемого в области 3D биопринтинга.

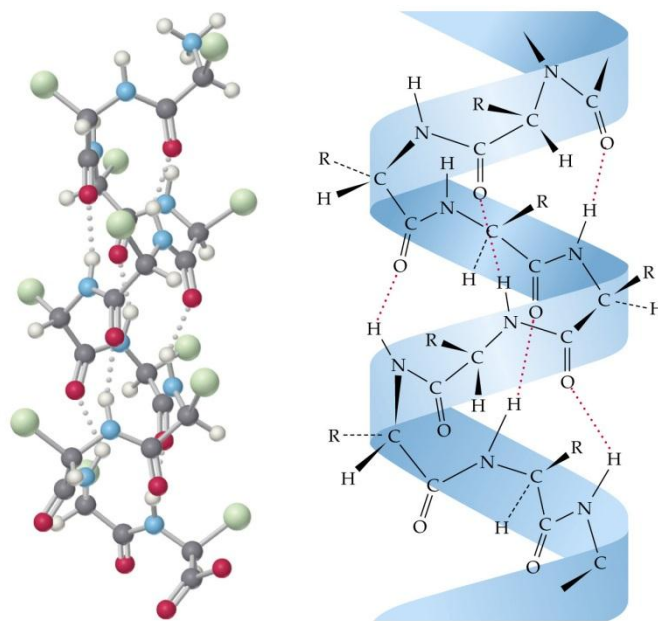


Рисунок 1. Структурная формула коллагена

1.2. Тканевые сфероиды

Тканевой сфероид представляет собой упругий сгусток из живых клеток (от 1000 до 10 000 единиц) размером 200-300 мкм, который может использоваться в качестве основного материала для биофабрикации. Тканевые сфероиды в простом варианте получаются путем инкубации суспензии клеток (стволовых, фибробластов, гепатоцитов, миоцитов и др.) в небольшом объеме культуральной среды DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Для простого масштабирования используют инкубацию суспензии в плоских сосудах, содержащих в себе полимерные биоинертные формы в виде пчелиных сот, круглых или тороидальных колодцев. Более сложные технологии масштабирования при получении тканевых сфероидов в больших количествах основаны на методах микрофлюидики или вибрационной генерации капель. Тканевые сфероиды - это ключевой элемент технологии трехмерной биопечати. Они являются строительными блоками, используемыми для создания трехмерных тканей и органов. Метод формирования тканевых сфероидов с помощью 3D Petri Dish позволяет вручную получать большие количества тканевых сфероидов контролируемого размера.

1.3. Биопринтинг

Согласно определению Оксфордского словаря, биопринтинг - это использование технологии 3D печати материалами, которые включают в себя жизнеспособные живые клетки, например, производство ткани для реконструктивной хирургии. По определению Миронова, биопечать есть автоматический, управляемый компьютером процесс послойной депозиции/включения живых и биологически уместных/релевантных материалов с целью быстрого производства функционально состоятельных органов человека. Биопринтинг осуществляется при помощи 3D биопринтера, который является роботическим устройством, позволяющим точно распределять биоматериал, включая живые клетки, в трехмерном пространстве, послойно, согласно цифровой модели.

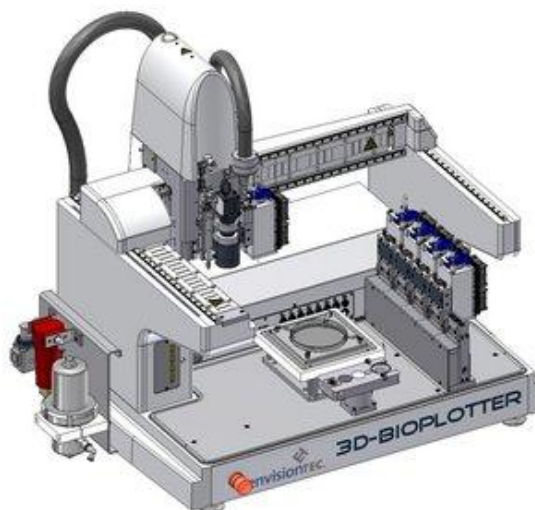


Рисунок 2. Внешний вид 3D биопринтера

Цели и задачи данной работы:

Цели:

1. Овладеть методикой приготовления коллагенового гидрогеля, отвечающего требованиям 3D биопринтинга.
2. Овладеть методикой приготовления тканевых сфероидов.
3. Изучить жизнеспособность и поведение клеток в тканевых сфероидах, погруженных в коллагеновую подложку, напечатанную на 3D биопринтере.

Задачи:

1. Получить тканевые сфероиды согласно СОП «Формирование тканевых сфероидов с помощью 3D Petri Dish» (собственная разработка Лаборатории биотехнологических исследований «3D Биопринтинг Солюшенс»).
2. Получить коллагеновый гидрогель, отвечающий требованиям 3D биопринтинга.
3. Напечатать коллагеновую подложку из полученного гидрогеля, поместить на нее сфероиды и изучить жизнеспособность и поведение клеток в данной структуре.

2. Материалы и методы

2.1. Получение тканевых сфероидов

Реактивы:

Питательная среда ДМЕМ
Фетальная бычья сыворотка
L-глутамин
Антибиотик/антимикотик
Версен
Пируват натрия
0.25% Трипсин-ЭДТА
Натрий-фосфатный буфер
Агароза

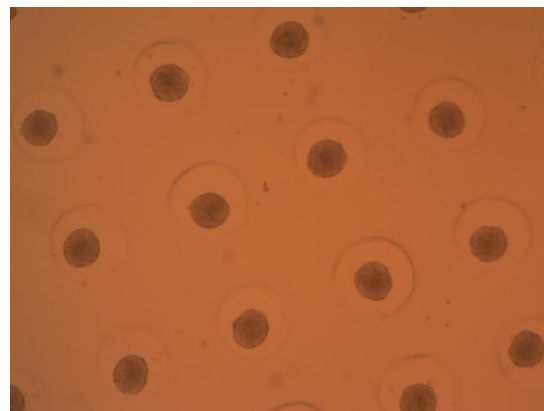


Рисунок 3. Тканевые сфероиды

Материалы:

12-луночные культуральные плашки
Серологические пипетки на 50 мл, 25 мл, 10 мл и 1 мл
Одноканальные механические пипетки на 0.5–10 мкл, 10–100 мкл и 100–1000 мкл
Полипропиленовые стерильные пробирки на 50 мл
Полипропиленовые стерильные пробирки на 15 мл
Гемацитометр
Микро-молды для создания 3D Petri Dishes
Наконечники для пипеток на 1000 мкл
Чашки Петри 100 мм x 20 мм

Оборудование:

Микроскоп
Ламинар, класс II
CO₂ инкубатор
Центрифуга Eppendorf 5430
Микроволновая печь

Методы:

1. Создание агарозных 3D Petri Dishes с помощью микро-молдов для создания 3D Petri Dishes:

Все процедуры проводились под ламинаром.

1. Обработали микро-молды для создания 3D Petri Dishes этанолом;
2. Высушили микро-молды для создания 3D Petri Dishes и простерилизовали их с помощью УФ-облучения;
3. Взвесили в стеклянной колбе 2г агарозы;
4. Добавили 100 мл стерильного натрий-фосфатного буфера в колбу, содержащую 2г агарозы;
5. Используя микроволновую печь, растворили агарозу в натрий-фосфатном буфере, так чтобы получился полностью прозрачный раствор. Останавливали микроволновую печь каждые 10-15 сек. и перемешивали содержимое колбы, чтобы агароза растворялась более равномерно;
6. После получения прозрачного раствора агарозы, дождались, пока он остынет до 60-70°C, и внесли по 450 мкл раствора в микро-молды для создания 3D Petri Dishes. Избегали пузырьков при внесении раствора агарозы;
7. После того, как агароза застынет (приблизительно через 4 минуты), перевернули микро-молды для создания 3D Petri Dishes и аккуратно выдавили из них образовавшиеся агарозные 3D Petri Dishes;
8. Использовали агарозные 3D Petri Dishes сразу или помещали в 3-кратный раствор антибиотика/антимикотика в натрий-фосфатном буфере и хранили при 4°C.

2. Создание тканевых сфероидов с помощью агарозных 3D Petri Dishes:

Все процедуры проводились под ламинаром.

1. Поместили в каждую из ячеек 12-луночной культуральной плашки по одному агарозному 3D Petri Dish, добавили по 2.5мл питательной среды и поставили в CO₂ инкубатор на 20 или более минут;
2. Удалили питательную среду из флакона, содержащего монослой клеток;
3. Промыли монослой клеток раствором Версена, чтобы удалить следы сыворотки, которые могут содержать ингибиторы трипсина;
4. Добавили раствор 0.25% Трипсин-ЭДТА (0.3-0.5мл на флакон T75) и аккуратно покачали флакон, чтобы раствор равномерно распределился по всей поверхности дна. Инкубировали 3-5мин при комнатной температуре или при 37°C;
5. Через несколько минут, когда клетки открепятся от подложки, добавили небольшое количество питательной среды и приготовили клеточную суспензию с необходимой концентрацией. Для клеток НЕК293 концентрация суспензии должна быть 5.8×10^5 клеток в 1мл. Для клеток NIH3T3 и человеческих фибробластов концентрация суспензии должна быть 2.0×10^6 клеток в 1мл;
6. Достали из в CO₂ инкубатора 12-луночную плашку с агарозными 3D Petri Dishes, тщательно отобрали питательную среду вокруг агарозных 3D Petri Dishes и внесли по 190мкл клеточной суспензии в каждый из агарозных 3D Petri Dishes. Инкубировали в CO₂ инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ в течение 40-45 минут;
7. Через 40-45 минут добавили по 2.5мл питательной среды в ячейки 12-луночной культуральной плашки, содержащей агарозные 3D Petri Dishes с клетками. Через 1 день тканевые сфероиды сформировались. Однако для полного созревания им необходимо 3-4 дня. Инкубировали формирующиеся тканевые сфероиды в CO₂ инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Меняли питательную среду по мере необходимости.

3. Извлечение тканевых сфероидов из агарозных 3D Petri Dishes

Все процедуры проводились под ламинаром.

1. Аккуратно удалили основную часть питательной среды из каждой из ячеек 12-луночной культуральной плашки, содержащей агарозные 3D Petri Dishes с тканевыми сфероидами, оставив 500-1000мкл среды;
2. Перевернули агарозные 3D Petri Dishes вверх дном;
3. Отцентрифугировали 12-луночную культуральную плашку, содержащую агарозные 3D Petri Dishes с тканевыми сфероидами, в течение 1 мин при 500g;

4. После центрифугирования удалили пустые агарозные 3D Petri Dishes;
5. Собрали питательную среду, содержащую тканевые сфероиды, в 15мл или 50мл полипропиленовую пробирку.

2.2. Получение коллагенового гидрогеля

Реактивы:

Крысиные хвосты
Хирургические зажимы
Щипцы и ножницы
Хирургические маски (по желанию)
Очищенная стерильная вода
Натрий-фосфатный буфер
Чистый ацетон
Изопропиловый спирт
0.02 N раствор уксусной кислоты
Лед из очищенной воды

Оборудование:

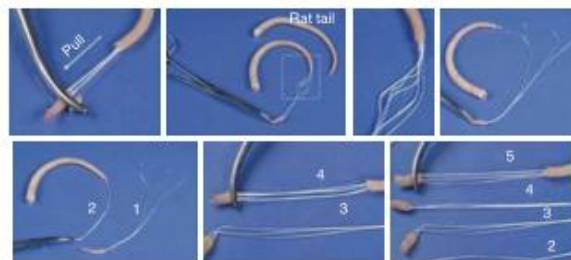
Прямоугольные контейнеры для замораживания
Магнитная мешалка
Пластиковые пакеты
Ультрацентрифуга
Четыре бутылки, пригодные для центрифугирования (на 250 мл)
Емкость для промывания хвостов
Вакуумный насос
Автоклав
Холодильник и морозильник
Плоские стеклянные контейнеры (4 шт)
Пластиковые и стеклянные стаканы
Сумки для отходов
Ламинар, класс II
Салфетки
Фильтры

Методы:

Все процедуры проводились под ламинаром.

1. Достали крысиные хвосты из морозильника (-80°C) за день до получения коллагена и хранили при температуре 4°C в течение 24 ч, чтобы смягчить их для будущей процедуры.
2. Использовали не более 30 крысиных хвостов одновременно.
3. Подготовили чистую поверхность для работы.
4. Подготовили стакан с 1 л натрий-фосфатного буфера.
5. Подготовили емкость с очищенной водой для промывания крысиных хвостов.
6. Промыли крысы хвосты путем замачивания в воде и удалили салфетками лишнюю воду перед выделением коллагеновых волокон.
7. Удерживая хвост примерно в 5 мм от его тонкого конца с помощью чистых хирургических зажимов, полностью отделили часть хвоста. После отделения части хвоста можно увидеть пучки белых коллагеновых волокон.
8. Вытянули и отрезали пучок волокон вблизи тонкого конца и собрали в стакан, содержащий натрий-фосфатный буфер.
9. Повторяли шаги 7-8 до тех пор, пока остаток от хвоста не оказывался слишком толстым или слишком коротким для продолжения.
10. Повторяли шаги 7-9 для всех крысиных хвостов.

11. Подготовили стакан с 1 л ацетона.
12. Подготовили стакан с 1 л 70% (об/об) изопропанола.
13. Подготовили 4 литра 0,02 N уксусной кислоты.
14. Подготовили большой 4-литровый пластиковый стакан.



15. После того как все волокна крысиных хвостов были собраны в PBS, перенесли их в стакан с ацетоном в на 5 мин.

16. Перенесли волокна в стакан с 70% изопропанолом **Рисунок 4.** Выделение коллагеновых нитей на 5 мин.

17. Затем собрали волокна в большой пластиковый стакан и добавили от 500 мл до 1 л уксусной кислоты.

18. Содержимое стакана перемешивали с помощью магнитной мешалки при 4°C 48 ч.

19. После перемешивания наблюдали вязкий раствор.

20. Раствор поместили в морозильник.

21. При необходимости не растворившиеся волокна удаляли с использованием вакуумного насоса, стеклянного стакана и фильтров.

22. Рассчитали концентрацию полученного коллагена на спектрофотометре с построением стандартной кривой, предварительно разбавив раствор коллагена в 20 раз.

Расчет концентрации коллагена:

Приготовили 3 стандартных раствора коллагена с концентрациями 0,05 мг/мл, 0,2 мг/мл и 0,6 мг/мл. Измерили показатели для стандартных растворов, а также для приготовленного раствора, разбавленного в 20 раз. Построили стандартную кривую по полученным от прибора данным.

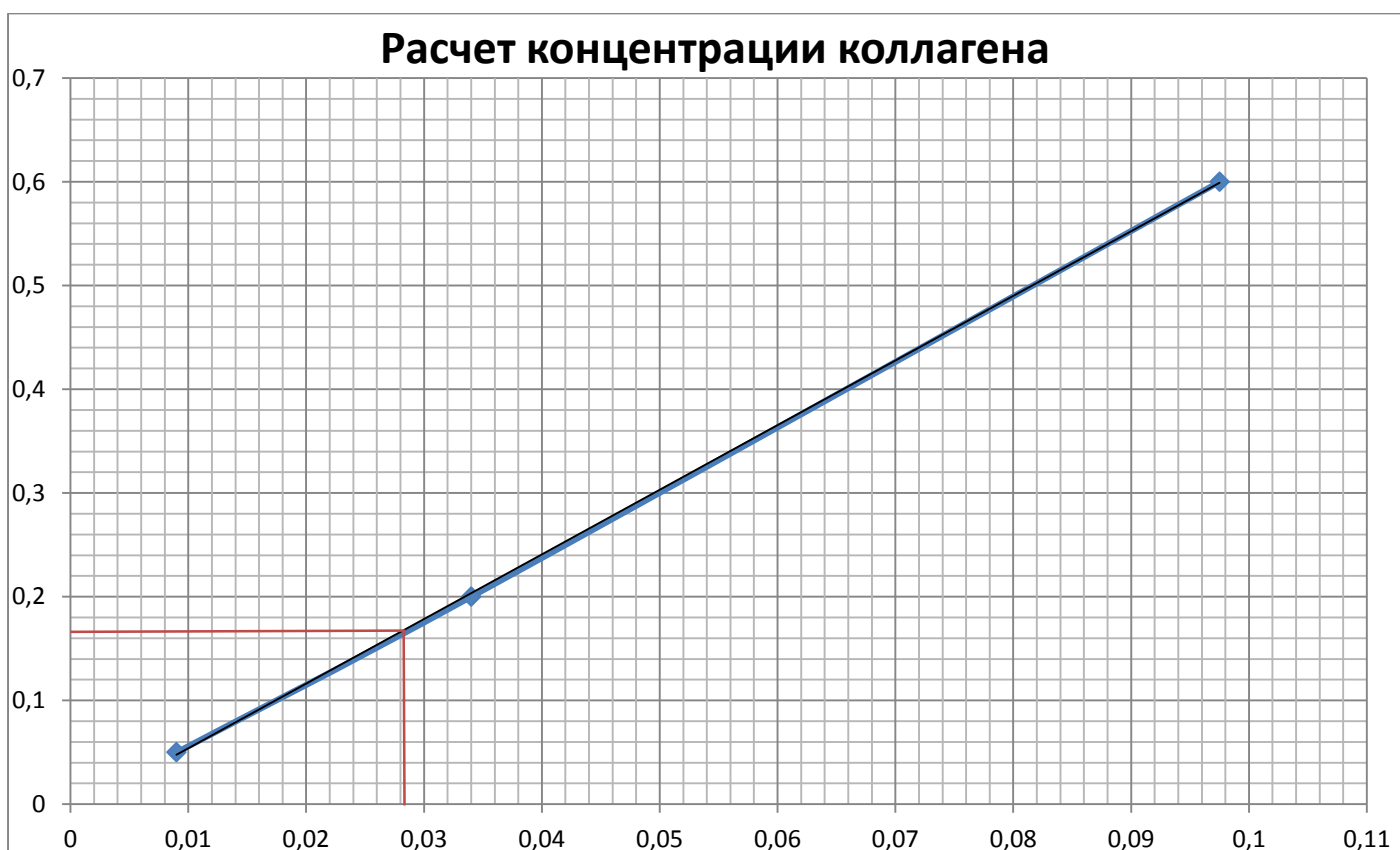


Рисунок 5. Построение стандартной кривой и расчет концентрации коллагена методом градуировочного графика.

$$0,0165 \text{ мг/мл} * 20 = 3,3 \text{ мг/мл}$$

Таким образом, концентрация полученного коллагена составила 3,3 мг/мл.

2.3. Печать коллагеновой подложки и пересадка сфероидов

Реактивы:

Раствор NaOH
Раствор NaHCO₃
Раствор коллагена в CH₃COOH 3,3 мг/мл
(полученный в предыдущем опыте)
Натрий-фосфатный буфер
Питательная среда ДМЕМ
Тканевые сфероиды (полученные в предыдущем опыте)
Лед из очищенной воды
Очищенная стерильная вода

Материалы:

Чашки Петри
Серологические пипетки на 50 мл, 25 мл, 10 мл и 1 мл
Одноканальные механические пипетки на 0.5 –10 мкл, 10-100 мкл и 100 –1000 мкл
Полипропиленовые стерильные пробирки на 50 мл
Полипропиленовые стерильные пробирки на 15 мл

Оборудование:

Микроскоп
Ламинар, класс II
3D биопринтер (FABION)
Инкубатор

Методы:

1. Поместили экструдер в емкость со льдом.
2. Заполнили экструдер раствором коллагена, предварительно нейтрализованного NaOH и NaHCO₃.
3. На 3D биопринтере (FABION) напечатали коллагеновую подложку в чашку Петри, помещенную в теплую (37 °C) очищенную воду. Коллагеновая подложка представляет собой одинарный слой коллагена.

Следующие процедуры проводились под ламинаром.

4. Из полипропиленовой пробирки, содержащей тканевые сфероиды с предварительно отобранной питательной средой, при помощи механической пипетки извлекли сфероиды и поместили их в коллагеновую подложку.
5. Заполнили чашку Петри средой ДМЕМ, закрыли и поместили в инкубатор на 1-2 дня.
6. Контроль жизнеспособности и поведения клеток проводился под микроскопом на следующий день.

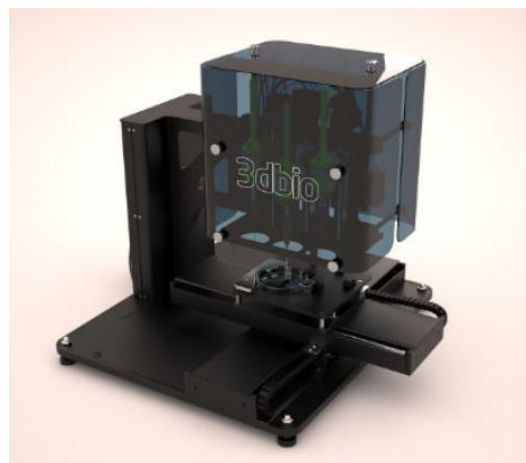


Рисунок 6. 3D биопринтер Fabion

3. Результаты

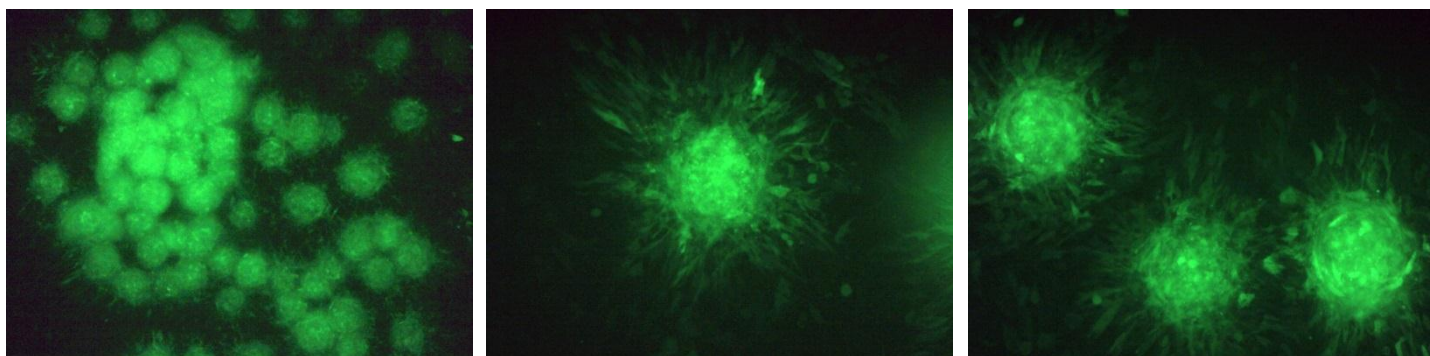


Рисунок 7. Рост тканевых сфероидов в коллагеновой подложке (первый день после инкубации)

Выводы

1. Получены тканевые сфероиды согласно СОП «Формирование тканевых сфероидов с помощью 3D Petri Dish» (собственная разработка Лаборатории биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс»).
2. Получен коллагеновый гидрогель с концентрацией 3,3 мг/мл.
3. Напечатана коллагеновая подложка из полученного гидрогеля, на нее были помещены сфероиды.
4. Изучена жизнеспособность и поведение клеток в данной структуре.
5. По результатам данной работы установлено, что полученный гидрогель полностью соответствует требованиям биопринтинга, так как позволяет, во-первых, печатать конструкции заданной структуры и, во-вторых, является подходящим материалом для обеспечения жизнедеятельности клеток.
6. Поведение клеток в гидрогеле было нормальным: на первый день инкубации сфероиды еще сохраняли шарообразную форму, а у клеток сформировались отростки.

Список литературы

1. СОП «Формирование тканевых сфероидов с помощью 3D Petri Dish», регистрационный номер документа: СОП ТД - КДЛ «ИНВ-Мск» - ЛБИ № 40, версия № 01-2015
2. Nocera A. Díaz, Salvatierra N.A., Cid M.P. (2014) Printing Collagen 3D Structures, IFMBE Proceedings Vol. 49
3. Navneeta Rajan, Jason Habermehl, Marie-France Cote', Charles J Doillon, Diego Mantovani (2006) Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications, Nature Protocols Vol.1 No.6
4. Aleksander Skardal, Anthony Atala (2014) Biomaterials for Integration with 3-D Bioprinting, Annals of Biomedical Engineering, 2014
5. Sean V Murphy, Anthony Atala (2014) 3D bioprinting of tissues and organs, Nature Biotechnology, Vol. 32 No. 8