

ЗАВИСИМОСТЬ ЗАПОЛНЕНИЯ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ КОСТНОГО МОЗГА ТРЕХМЕРНОЙ МАТРИЦЫ ОТ СПОСОБА ПОСЕВА КЛЕТОК И ТИПА МОДИФИКАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ МАТРИЦЫ

© Ю. А. Нащекина,^{1, 2, *} П. О. Никонов,¹ В. М. Михайлов,¹ Г. П. Пинаев¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и

²Кафедра химии высокомолекулярных соединений С.-Петербургского государственного университета;

* электронный адрес: yuliya.shved@gmail.com

Исследовали распределение стромальных клеток костного мозга (СККМ) в трехмерной полилактидной матрице. Показано, что заселение клеток внутрь матрицы динамическим способом (с помощью перистальтического насоса) обеспечивает распределение клеток по всему объему матрицы в отличие от статического способа заселения, при котором суспензию клеток наносят на поверхность матрицы. В отличие от клеток, заселенных в матрицу динамическим способом, клетки, заселенные статическим способом, в первые несколько суток практически полностью мигрируют с матрицы на чашку. Обнаружено, что СККМ, культивируемые в трехмерных полилактидных матрицах, модифицированных фибрином, образуют колонии, в то время как СККМ, культивируемые внутри матриц, модифицированных коллагеном I типа, распределены по всему объему матрицы в виде одиночных клеток.

Ключевые слова: трехмерные полилактидные матрицы, коллаген I типа, фибрин, стромальные клетки костного мозга.

Принятые сокращения: СККМ — стромальные клетки костного мозга.

В настоящее время в медицинской практике при лечении различного рода заболеваний широкое применение находят методы клеточной терапии. Введенные в организм пациента клетки участвуют в регенеративных процессах и способствуют более быстрому восстановлению поврежденных органов и тканей (Ruszczak, 2000; Boyce, Warden, 2002). Вместе с тем выяснилось, что внесение клеток непосредственно в зоны повреждения не всегда приводит к полному восстановлению поврежденной ткани. Это связано с тем, что в процессе выделения клеток из нативной ткани они теряют естественное для них микроокружение, состав и структура которого имеют существенные различия *in vivo* и *in vitro*. Эти различия влияют как на функциональную активность культивируемых клеток, так и на их пролиферативный и дифференцировочный потенциалы. Одним из важных отличий является трехмерность микроокружения клеток в нативной ткани по сравнению с двухмерной плоскостью культуральной чашки (Carolyn et al., 2009). В связи с этим при культивировании клеток для создания *in vitro* окружения, состав и свойства которого максимально приближены к нативной ткани, стали использовать трехмерные полимерные матрицы (Khetani, Bhatia, 2005; Khademhosseini et al., 2006).

В зависимости от типа клеток, тканей и степени их повреждения при культивировании используют матрицы определенного состава и структуры. Одним из перспективных нетоксичных материалов, активно используемых в настоящее время в различных областях медицины и клеточной биологии, является биодеградируемый поли-

мер на основе молочной кислоты — поли(L,L-лактид). Состав и свойства этого полимера позволяют формировать на его основе изделия с трехмерной пространственной архитектурой, имитирующей нативную ткань (Mikos et al., 1994; Shi et al., 2001). Однако, являясь синтетическим полимером, поли(L,L-лактид) обладает низкой биосовместимостью, и в связи с отсутствием специфических сайтов связывания для клеток матрицы на его основе требуют дополнительной модификации (Zhu et al., 2002; Yu et al., 2007).

Общепринятым модификатором поверхности, используемым при культивировании клеток, является белок внеклеточного матрикса — коллаген I типа. Неоднократно продемонстрировано, что нанесение этого белка на полимерную поверхность способствует увеличению адгезии и пролиферации различного типа культивируемых клеток (Dai et al., 2004; Shved et al., 2007). Однако при культивировании стволовых клеток в трехмерных матрицах основополагающими факторами образования новой ткани *in vitro* являются такие процессы, как дифференцировка и зарождение ангиогенеза или формирование сосудов. Но, несмотря на то что коллаген I типа является основным компонентом многих тканей, по данным ряда авторов, стволовые клетки, культивируемые на поверхности, модифицированной этим белком, обладают минимальной ангиогенезной активностью *in vitro* (Dvorak et al., 1987). В отличие от клеток, культивируемых на матрицах с коллагеном I типа, высокой способностью к ангиогенезу обладают стволовые клетки, культивируемые на поверхности, модифицированной белком фибрином (Takei et al.,

1995), который образуется в грануляционной ткани раны в процессе ее заживления.

При нанесении клеток в виде суспензии на поверхность трехмерной пористой матрицы основное их количество адгезирует и пролиферирует только на поверхности матрицы. Поэтому по сравнению с двухмерными полимерными матрицами, представляющими собой пленки, на которые клетки наносят в виде капли суспензии, трехмерные пористые матрицы требуют дополнительной разработки условий заселения клеток, обеспечивающих их распределение по всему объему матрицы. В связи с этим для посева клеток используют специальные устройства, позволяющие заселять клетки внутри матрицы под действием давления или центробежной силы (Vunjak-Novakovic et al., 1998; Dar et al., 2002). Показано, что такой способ введения клеток обеспечивает их равномерное распределение по всему объему матрицы (Zhu et al., 2010). Таким образом, на адгезию и распределение клеток в трехмерной матрице влияют как способ заселения, так и тип ее модификации.

В настоящей работе мы исследовали совместное влияние условий заселения клеток и типа модификации на распределение клеток внутри трехмерной матрицы, для того чтобы выбрать оптимальные условия культивирования СККМ в трехмерных полилактидных матрицах. Для модификации матриц использовали коллаген I типа и фибрин.

Материал и методика

Реактивы: питательные среды α -MEM (Sigma, США), DMEM (ICN, США) и эмбриональная сыворотка коров (Gibco, США); фибриноген (Calbiochem, США), смесь пенициллина и стрептомицина (Invitrogen, Великобритания), гистопак, тромбин (Sigma, США), поли(L,L-лактид) (Sigma, США) и метилен хлорид («Реактив», Россия).

Выделение и культивирование СККМ. Из новорожденного кролика извлекали плоские кости таза и помещали их в PBS (фосфатный буфер) с добавлением пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). С костей удаляли мягкие ткани и промывали в PBS. Кости рассекали скальпелем и осторожно вымывали PBS костный мозг при помощи шприца с иглой 23 гш. Ядродержащие клетки костного мозга выделяли согласно модифицированному методу (Николаенко и др., 2003). Для этого костный мозг суспендировали в 2 мл PBS, суспензию наслаивали на 3 мл раствора гистопака (Sigma, США) с плотностью 1.077 г/мл и центрифугировали при 800 g в течение 20 мин при комнатной температуре. Клетки, находящиеся в интерфазном слое гистопака (в основном ядродержащие клетки), переносили в другую пробирку и центрифугировали в 10 объемах PBS при 600 g в течение 15 мин при комнатной температуре для очистки от гистопака. Промытые клетки суспендировали в среде α -MEM, содержащей 10%-ную сыворотку эмбрионов коров и смесь пенициллина и стрептомицина в стандартных концентрациях. Подсчет ядродержащих клеток проводили под инвертированным микроскопом, используя счетчик форменных элементов крови. Клетки высевали в чашки Петри с концентрацией 1×10^6 кл./см² и помещали в инкубатор с 5%-ным содержанием CO₂ при 37 °C. В экспериментах использовали клетки 2—10-го пассажа, высеваемые в концентрации 1×10^4 кл./см². Дополнительно СККМ были любезно пре-

доставлены С. А. Александровой (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург)

Приготовление матриц. Матрицы для культивирования СККМ изготавливали методом выщелачивания (Hou et al., 2003). Во фторопластовую форму диаметром 1.5 и высотой 0.5 см помещали 1 г NaCl с диаметром кристаллов 250 мкм. Поли(L,L-лактид) с характеристической вязкостью $\eta = 4.0$ дл/г растворяли в метилен хлориде. 0.6 мл раствора поли(L,L-лактида) с концентрацией полимера 0.02 г/мл наливали в форму с солью и оставляли сушиться на воздухе в течение 2 сут. После испарения растворителя матрицу выдерживали в 100 мл дистиллированной воды в течение 1 сут. Воду меняли каждые 3 ч для полного растворения кристаллов хлористого натрия. После растворения соли матрицу высушивали при комнатной температуре в течение 2 сут, а затем помещали еще на 2 сут в вакуумный эксикатор. Приготовленные матрицы стерилизовали в 70%-ном растворе этанола в течение 20 мин, промывали PBS и облучали УФ-светом в течение 4 ч.

Анализ структуры матриц. Структура приготовленных матриц была исследована методом сканирующей электронной микроскопии (JSM-35C, Jeol, Япония). Для этого образцы матриц обрабатывали последовательно растворами 2.5%-ного глутаральдегида, этанола и эфира, после чего на лиофильно высушенные образцы наносили слой золота толщиной 5 нм.

Определение относительной пористости матриц. Для определения относительной пористости высушенные и предварительно взвешенные матрицы помещали в 96%-ный этиловый спирт и выдерживали под вакуумом (50—60 мм рт. ст.) в течение 20 мин. После полного заполнения пор матрицы этиловым спиртом ее повторно взвешивали. Относительную пористость матрицы рассчитывали как отношение объема сорбированного этилового спирта к общему объему матрицы по формуле (Choi et al., 2009):

$$e = V_{\text{эт}}/V_{\text{мат}} = m/(\pi r^2 \cdot h \cdot \rho), \quad (1)$$

где $V_{\text{эт}}$ — объем сорбированного в матрицу этилового спирта, $V_{\text{мат}}$ — объем матрицы, m — масса сорбированного этилового спирта, π — математическая константа, выражающая отношение длины окружности к длине ее диаметра ($\pi = 3.14$), r — радиус матрицы, h — высота матрицы, ρ — плотность 96%-ного этилового спирта ($\rho = 0.79$ г/см³).

Модификация матриц. Пористые трехмерные матрицы модифицировали коллагеном I типа или фибрином. Коллаген I типа был получен из крысиных хвостов (Chandrakasan et al., 1967). Коллаген был выделен и любезно предоставлен Л. В. Кухаревой (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Для модификации поверхности коллагеном I типа матрицу помещали в раствор белка с концентрацией 0.1 мг/мл на 12 ч при 4 °C. После инкубации для удаления неприкрепившегося белка матрицу дважды промывали PBS.

Для приготовления фибрина использовали коммерческий препарат фибриноген, выделенный из плазмы крови человека (Calbiochem, США). Фибриноген разводили в дистиллированной воде до концентрации 2 мг/мл и хранили при -20 °C. При модификации матрицы фибрином непосредственно перед нанесением белка готовили раствор, смешивая 1.9 мл дистиллированной воды, 100 мкл фибриногена и 20 мкл тромбина (Sigma, США). образо-

вание фибрина происходит благодаря действию тромбина, который обрезает от α -цепи фибриногена фибринопептид А, инициируя полимеризацию. Матрицы инкубировали в приготовленном растворе фибрина в течение 12 ч при 4 °С. Для удаления непривязавшегося белка матрицу дважды промывали PBS.

Заселение матриц клетками. Посев СККМ на матрицу осуществляли двумя способами. В одном случае на поверхность матрицы наносили 200 мкл суспензии клеток с концентрацией $0.5 \cdot 10^7$ кл./мл (статический способ). Второй способ посева СККМ заключался в прокачивании суспензии через матрицу под действием давления (динамический способ). Схема посева клеток динамическим способом представлена на рис. 1.

Непосредственно перед нанесением клеток на матрицу динамическим способом систему стерилизовали, пропуская через нее 70%-ный раствор этилового спирта, и затем дважды промывали PBS для удаления спирта. 15 мл суспензии СККМ с концентрацией $0.6 \cdot 10^5$ кл./мл вносили в резервуар, а матрицу помещали в фильтодержатель. Суспензию клеток прокачивали через матрицу в течение 20 мин со скоростью 50 мл/мин. После окончания посева матрицу перенесли в чашку Петри с питательной средой и помещали в инкубатор с 5%-ным содержанием CO_2 при 37 °С.

Анализ распределения СККМ внутри матрицы. Распределение СККМ внутри матрицы оценивали с помощью гистохимического анализа. После культивирования клеток внутри матрицы в течение 3 или 10 сут матрицы с клетками промывали PBS, обрабатывали криогелем и замораживали в жидком азоте. Полученные на криотоме срезы толщиной 25—30 мкм фиксировали 4%-ным раствором формалина. После фиксации срезы выдерживали в течение 10 мин в 0.1%-ном растворе акридинового оранжевого в цитратном буфере (pH 4.2). Под действием ультрафиолетового излучения акридиновый оранжевый окрашивает РНК и однонитевую ДНК в оранжевый цвет, двухнитевую ДНК — в зеленый. После окрашивания срезы промывали исходным буферным раствором в течение 20 мин. Анализ полученных препаратов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа при длине волны 300—400 нм.

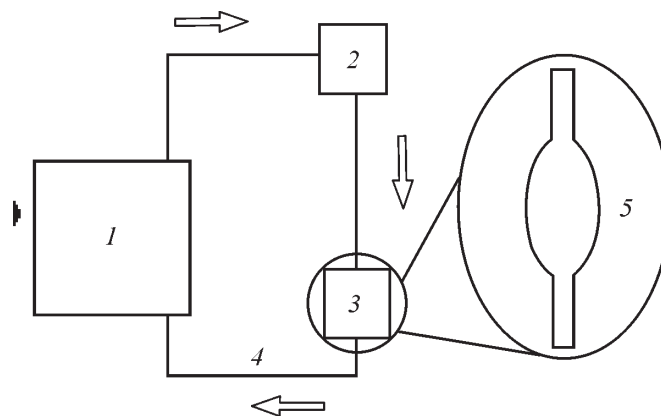


Рис. 1. Схема посева СККМ динамическим способом.

1 — перистальтический насос для обеспечения циркуляции клеток; 2 — фильтодержатель, в который помещается матрица; 3 — резервуар с суспензией клеток; 4 — система силиконовых трубок; 5 — дополнительный вид резервуара с суспензией клеток.

Оценка эффективности посадки клеток на матрицу. Одним из критериев эффективной посадки клеток на матрицу является их минимальное количество на дне чашки Петри, в которой находится матрица с СККМ. Для оценки эффективности посева клеток на матрицу проводили визуальные наблюдения за СККМ на чашке Петри под инвертированным микроскопом.

Результаты и обсуждение

Оценка структуры и общей пористости матриц. Трехмерная полилактидная матрица в отличие от ранее изучаемых пленок (Швед и др., 2006) непрозрачна, поэтому для определения ее структуры и размеров пор использовали метод сканирующей электронной микроскопии.

Полученная матрица представляет собой диск диаметром 1.5 и высотой 0.3 см (рис. 2, а). При изучении бокового среза матрицы определили, что размер пор варьи-

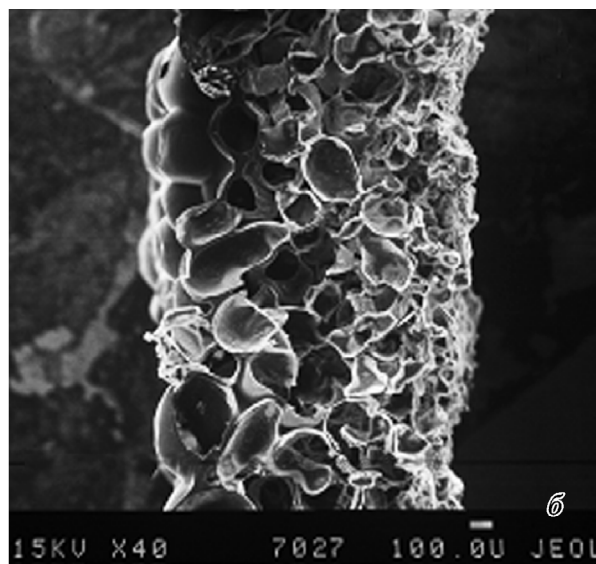
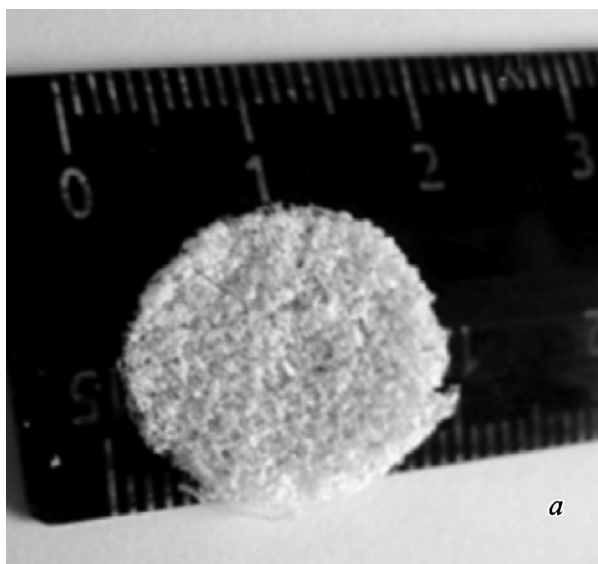


Рис. 2. Полилактидная матрица.

а — внешний вид матрицы; б — электронограмма: боковой срез матрицы. 40×.

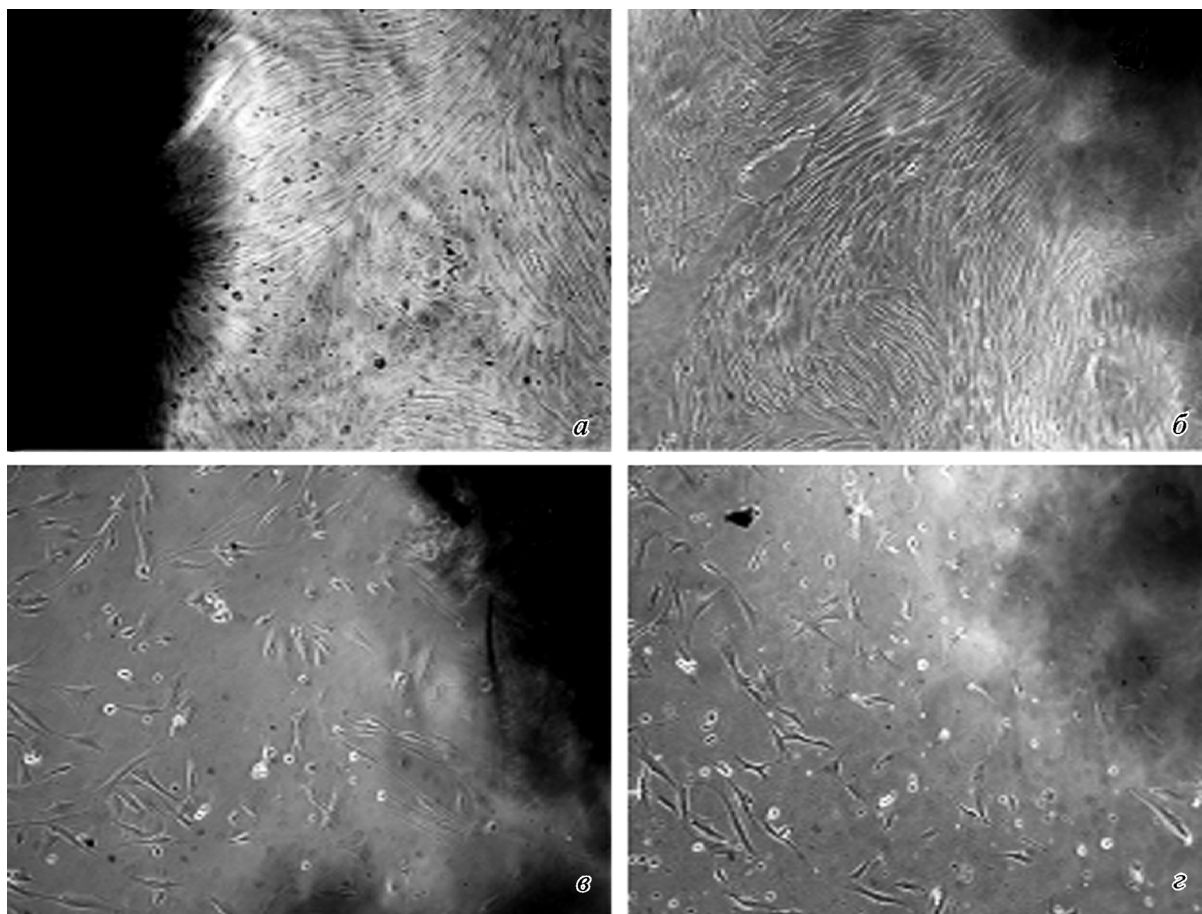


Рис. 3. СККМ на полистирольной чашке рядом с матрицей после 3 сут культивирования. *a, б* — статический способ посева клеток на матрицу, модифицированную соответственно коллагеном I типа и фибрином; *в, з* — динамический способ посева клеток на матрицу, модифицированную соответственно коллагеном I типа и фибрином. Матрица — черное пятно. 10×.

рует в пределах 200—300 мкм (рис. 2, б). Согласно литературным данным, именно такой диапазон оптимален для дифференцировки клеток в остеогенном и хондрогенном направлениях (Whang et al., 1999).

Масса сорбированного в матрицу этилового спирта составила 0,2798 г. Рассчитанное по формуле (1) значение относительной пористости матрицы составило 70 %. Наши результаты согласуются с литературными данными, где показано, что матрицы с такой пористостью наиболее предпочтительны для культивирования клеток (Carpes et al., 2005).

Степень миграции клеток из матрицы после посева. Поскольку трехмерные полилактидные матрицы в отличие от пленок непрозрачны (Швед и др., 2006), прижизненное наблюдение за поведением клеток непосредственно на матрице под инвертированным микроскопом невозможно. Проводили лишь визуальную оценку СККМ на поверхности чашки вокруг матрицы. Для этого матрицы, модифицированные фибрином или коллагеном I типа, после посева клеток помещали в питательную среду на 3 сут. В течение первых нескольких суток количество клеток на поверхности чашки Петри вокруг матрицы, а также морфологические особенности СККМ являются основными показателями эффективности статического и динамического способов посева. По истечении 3 сут практически все поле вокруг матриц, на которые клетки сеяли статическим способом, занято

клетками (рис. 3, а, б). Из этого можно сделать вывод о том, что такой способ посева не обеспечивает распределения клеток по всему объему матрицы — только небольшая их часть прикрепляется к поверхности матрицы, а остальные остаются на пластике. В то же время рядом с матрицами, на которые клетки были посеяны динамическим способом, можно наблюдать лишь единичные клетки (рис. 3, в, з). При этом морфология клеток свидетельствует о том, что давление, под действием которого клетки пропускают через матрицу, не повреждает их. Различий между клетками на поверхности культуральных чашек, в которых находятся матрицы, модифицированные коллагеном (рис. 3, а, в), или фибрином (рис. 3, б, з) не наблюдается.

После 3 сут культивирования матрицы с клетками переносили в чистые чашки Петри и оставляли еще на 7 сут в питательной среде с сывороткой. Число СККМ на культуральном пластике вокруг матриц, на которые клетки наносили динамическим способом (рис. 4, в, з), превышает число клеток на пластике при статическом способе нанесения на матрицу (рис. 4, а, б). После 10 сут наблюдали разницу в количестве клеток рядом с матрицами, на которые клетки наносили разными способами. Заметно различается также количество клеток рядом с матрицами, модифицированными фибрином или коллагеном.

Полученные данные продемонстрировали увеличение пролиферативной активности клеток, культивируе-

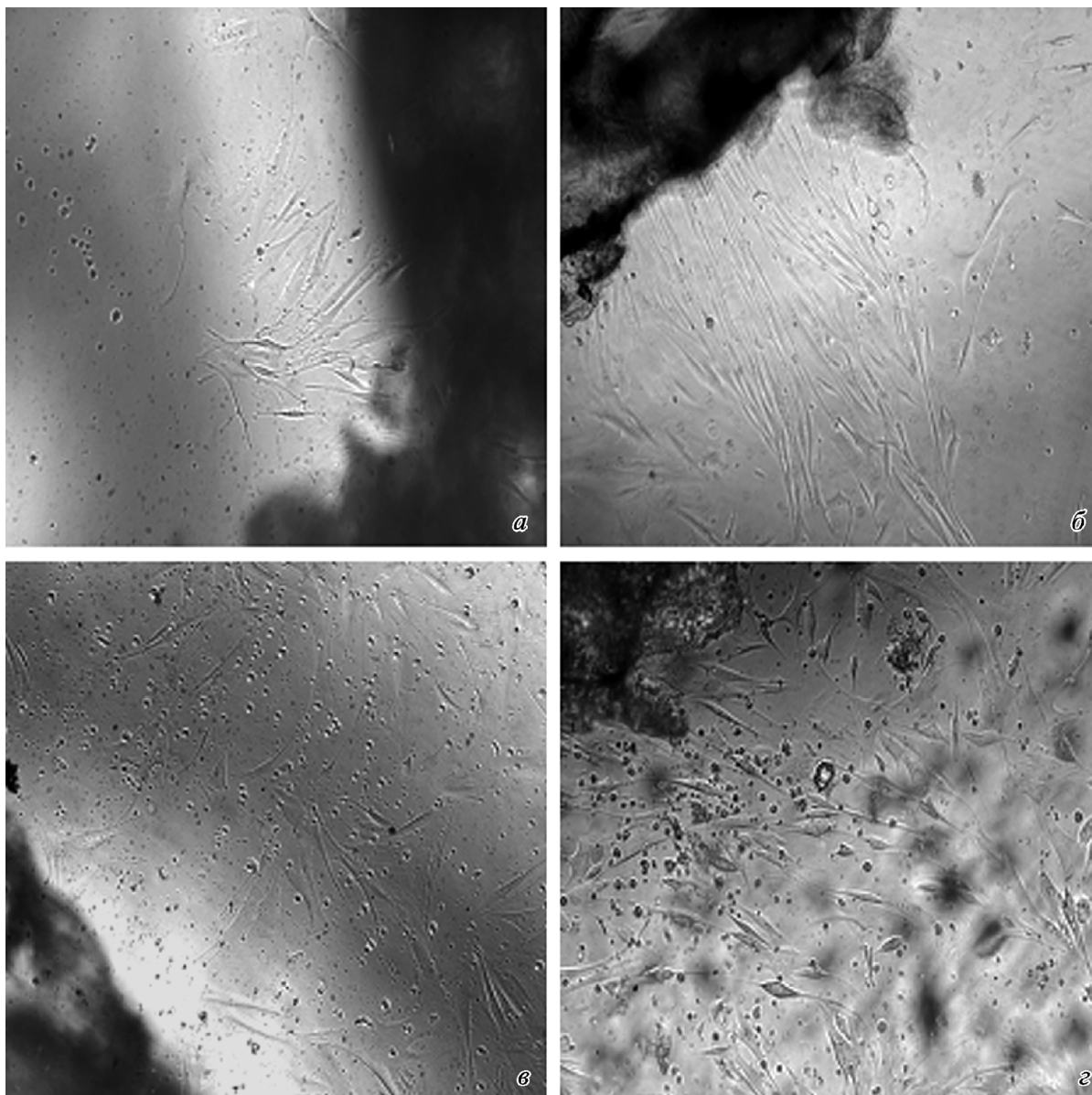


Рис. 4. СККМ на полистирольной чашке рядом с матрицей после 10 сут культивирования.

a, б — статический способ посева клеток на матрицу, модифицированную соответственно коллагеном I типа и фибрином; *в, г* — динамический способ посева клеток на матрицу, модифицированную соответственно коллагеном I типа и фибрином. Матрица — черное пятно. 10 \times .

мых на матрице, модифицированной фибрином (рис. 4, *б, г*), по сравнению с клетками, культивируемыми на матрице, модифицированной коллагеном (рис. 4, *а, в*). Однако делать однозначные выводы насчет пролиферативной активности клеток в зависимости от способа модификации матрицы нельзя, поскольку увеличение количества клеток вокруг матриц может быть обусловлено не активной пролиферацией клеток внутри матрицы, а их активной миграцией. Это предположение согласуется с литературными данными, которые показывают, что на фибрине проявляется высокая миграционная активность клеток (Rybarczyk et al., 2003).

Для доказательства нашего предположения необходимо оценить количество пролиферирующих клеток внутри матрицы. Для этого после 10 сут культивирования сделали криосрезы матриц с СККМ. Срезы окрасили акридиновым оранжевым для выявления ядер клеток

(рис. 5). В качестве контроля были использованы матрицы без модификации и клеток.

Внутри матриц, на которые клетки высевали статическим способом, обнаружено очень мало клеток (яркие точки окрашенных клеточных ядер) (рис. 5, *а, б*). В то время как внутри матриц, на которые клетки были посеяны динамическим способом, наблюдается существенно больше светящихся точек, соответствующих клеточным ядрам (рис. 5, *в, г*). Можно также отметить существенное различие в распределении клеток внутри матриц, модифицированных различным образом. Так, на матрице, модифицированной коллагеном, наблюдали преимущественно одиночные клетки (рис. 5, *в*), а на матрице, модифицированной фибрином, — образованные клетками колонии (рис. 5, *г*). Полученные результаты согласуются с литературными данными, свидетельствующими о способности клеток, культивируемых на фибриновых субст-

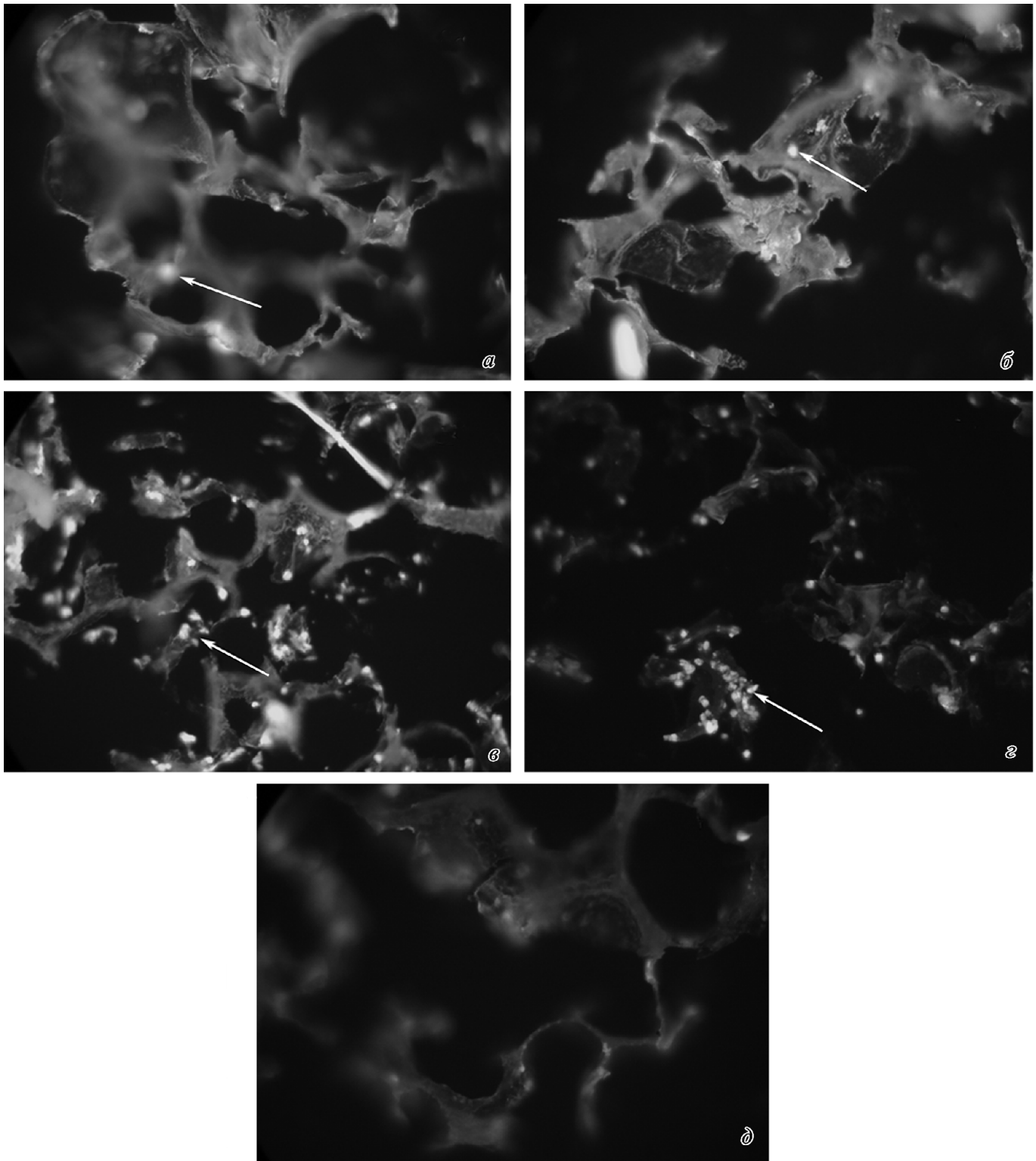


Рис. 5. Распределение СККМ внутри матриц через 10 сут культивирования.

a, б — статический способ посева клеток на матрицу, модифицированную соответственно коллагеном I типа и фибрином; *в, г* — динамический способ посева клеток на матрицу, модифицированную соответственно коллагеном I типа и фибрином. *д* — контрольный препарат, матрица без обработки и клеток. *Стрелками* обозначены окрашенные клеточные ядра. 40×.

ратах, образовывать колонии (Bauwens et al., 2008). Известно, что именно СККМ, находящиеся в виде колоний, способны к дифференцировке, поэтому для дальнейших исследований целесообразным является культивирование клеток, внесенных динамическим способом на матрицы, модифицированные фибрином.

Итак, основной задачей данного этапа нашей работы являлись разработка условий посева клеток на матрицу и обеспечение оптимальных условий для их прикрепления с целью дальнейшего размножения и дифференцировки внутри матрицы. Разработанные нами условия посева клеток на матрицу — скорость прокачивания суспензии через матрицу, а также давление, под действием которого суспензия проходит через весь объем матрицы, — позволяют сохранить клетки не только жизнеспособными, но и активно пролиферирующими. Схема спроектированного нами устройства позволяет обеспечить распределение клеток по всему объему матрицы, что в дальнейшем позволит формировать тканеподобные структуры *in vitro*.

Структура полилактидной матрицы представляет собой систему взаимосвязанных пор со средним диаметром 250 мкм, который в несколько раз превышает размер клеток, что способствует их свободной миграции внутри всего объема матрицы. Значения измеренной пористости матрицы согласуются с представленными в литературе данными и, по мнению ряда авторов, являются оптимальным соотношением прочностных и структурных характеристик.

Полученные различия в распределении клеток внутри матриц, модифицированных разными реагентами, позволяют предположить, что полилактидная матрица, модифицированная фибрином, способствует образованию клеточных колоний. Согласно литературным данным, СККМ в виде колоний в большей степени способны к дифференцировке по сравнению с одиночными клетками. Так это или нет, будет изучаться в дальнейшей работе.

Авторы глубоко признательны Н. С. Николаенко за консультацию при обсуждении полученных результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект офи-м 13-04—12027).

Список литературы

Николаенко Н. С., Цупкина Н. В., Пинаев Г. П., Дулаев А. К., Деев Р. В., Гололобов В. Г. 2003. Выделение и культивирование стромальных клеток костного мозга с целью их дальнейшего использования в лечении дефектов костной ткани. Трансплантология. 4 (1) : 169—171. (Nikolaenko N. S., Tsupkina N. V., Pinaev G. P., Dulaev A. K., Deev R. V., Gololobov V. G. 2003. Isolation and culture of bone marrow stromal cells with a view to their use in treating bone defects. Transplantation. 4 (1) : 169—171.)

Швед Ю. А., Кухарева Л. В., Зорин И. М., Соловьев А. Ю., Блинова М. И., Билибин А. Ю., Пинаев Г. П. 2006. Культивирование фибробластов кожи человека на полимерной полилактидной подложке. Цитология. 48 (2) : 161—168. (Shved Yu. A., Kukhareva L. B., Zorin I. M., Solovyov A. Yu., Blinova M. I., Bilibin A. Yu., Pinaev G. P. 2006. Cultivation of human dermal fibroblasts on the polylactide polymer films. Tsitologiya. 48 (2) : 161—168.)

Bauwens C. L., Peerani R., Niebruegge S., Woodhouse K. A., Kumacheva E., Husain M., Zandstra P. W. 2008. Control of human embryonic stem cell colony and aggregate size heterogeneity influences differentiation trajectories. Stem Cells. 26 : 2300—2310.

Boyce S. T., Warden G. D. 2002. Principles and practices for treatment of cutaneous wounds with cultured skin substitutes. Amer. J. Surgery. 183 : 445—456.

Capes J. S., Ando H. Y., Camron R. E. 2005. Fabrication of polymeric scaffolds with a controlled distribution of pores. J. Materials Sci. Materials in Medicine. 16 : 1069—1075.

Carolyn S. A., Reed M. W. R., Brown N. J. 2009. Acritical analysis of current *in vitro* and *in vivo* angiogenesis assays. Int. J. Exp. Pathol. 90 : 195—221.

Chandrakasan G., Torchia D. A., Piez K. A. 1967. Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution. J. Biol. Chem. 251 : 6062—6067.

Choi S.-W., Xie J., Xia Y. 2009. Chitosan-based inverse opals: three-dimensional scaffolds with uniform pore structures for cell culture. Adv. Mat. 21 : 2997—3001.

Dai N. T., Williamson M. R., Khammo N., Adams E. F., Coombes A. G. 2004. Composite cell support membranes based on collagen and polycaprolactone for tissue engineering of skin. Biomaterials. 25 : 4263—4271.

Dar A., Shachar M., Leor J., Cohen S. 2002. Optimization of cardiac cell seeding and distribution in 3D porous alginate scaffolds. Biotechnol. Bioeng. 80 : 305—312.

Dvorak H. F., Harvey V. S., Estrella P., Brown L. F., McDonagh J., Dvorak A. M. 1987. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. Lab. Invest. 57 : 673—686.

Hou Q. P., Grijpma D. W., Feijen J. 2003. Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique. Biomaterials. 24 : 1937—1947.

Khademhosseini A., Langer R., Borenstein J., Vacanti J. P. 2006. Microscale technologies for tissue engineering and biology. PNAS. 103 : 2480—2487.

Khetani S. R., Bhatia S. N. 2005. Engineering tissues for *in vitro* applications. Curr. Opin. Biotechnol. 17 : 524—531.

Mikos A. G., Thorsen A. J., Czerwonka L. A., Bao Y., Langer R., Winslow D. N., Vacanti J. P. 1994. Preparation and characterization of poly(l-lactic acid) foams. Polymer. 35 : 1068—1077.

Ruszczak Z. B. 2000. Modern aspects of wound healing: an update. Dermatol. Surg. 26 : 219—229.

Rybarczyk B. J., Lawrence, S. O., Simpson-Haidaris P. J. 2003. Matrix-fibrinogen enhances wound closure by increasing both cell proliferation and migration. Blood. 102 : 4035—4043.

Shi G. X., Wang S. G., Bei J. Z. 2001. Preparation of porous cell scaffolds of poly(l-lactic acid) and poly(l-lactic-go-glycolic acid) and measurement of their porosity. J. Funct. Polymer. 14 : 7—11.

Shved Yu. A., Zorin I. M., Bilibin A. Yu., Kukhareva L. B., Blinova M. I., Pinaev G. P. 2007. Interaction of cultured skin cells with the polylactide matrix coated with different collagen structural isoforms. Cell Tissue. Biol. 1 : 89—95.

Takei A., Tashiro Y., Nakashima Y., Sueishi K. 1995. Effects of fibrin on the angiogenesis *in vitro* of bovine endothelial cells in collagen gel. In Vitro Cell Develop. Biol. Animal. 31 : 467—472.

Vunjak-Novakovic G., Obradovic B., Martin I., Bursac P. M., Langer R., Freed L. E. 1998. Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. Biotechnol. Prog. 14 : 193—202.

Whang K., Healy K. E., Elenz D. R., Nam E. K., Tsai D. C., Thomas C. H., Nuber G. W., Glorieux F. H., Travers R., Sprague S. M. 1999. Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture. Tissue. Eng. 5 : 35—51.

Yu D. G., Lin W. C., Yang M. C. 2007. Surface modification of poly(L-lactic acid) membrane via layer-by-layer assembly of silver nanoparticle-embedded polyelectrolyte multilayer. Bioconjugate Chem. 18 : 1521—1529.

Zhu H., Ji J., Shen J. 2002. Surface engineering of poly(D,L-lactic acid) by entrapment of biomacromolecules. *Macromol. Rapid Commun.* 23 : 819—823.

Zhu X. H., Arifin D. Y., Khoo B. H., Hua J., Wang C.-H. 2010. Study of cell seeding on porous poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)

sponge and growth in a Couette-Taylor bioreactor. *Chem. Eng. Sci.* 65 : 2108—2117.

Поступила 20 XI 2013

FILLING THE 3D SCAFFOLDS BY THE STROMAL BONE MARROW
CELLS DEPENDS ON THE METHODS OF CELL SEEDING
AND THE SCAFFOLD SURFACE MODIFICATIONS

Yu. A. Nashchekina,^{1, 2, *} P. O. Nikonov,¹ V. M. Mikhailov,¹ G. P. Pinaev¹

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and

² Chemical Faculty of St. Petersburg State University;

* e-mail: yuliya.shved@gmail.com

The distribution of bone marrow stromal cells (BMSC) is studied in a 3D poly(L,L-lactide) scaffolds. It is shown that the population of cells seeding into the scaffold with a peristaltic pump (dynamic method) allows the penetration of cells inside of the scaffold compared with the application of the cell suspension on the scaffold surface (static method). In contrast to cells seeding to scaffold by dynamic method the cells seeding by static method migrate from scaffolds in the first few days almost completely. It is found that BMSCs cultured in 3D polylactide scaffold modified by fibrin form colonies, while BMSCs cultured in 3D polylactide scaffold modified by collagen type I distribute inside scaffold such single cells.

Key words: 3D poly(L,L-lactide) scaffolds, collagen type I, fibrin, bone marrow stromal cells (BMSCs).

—————