

ОСОБЕННОСТИ БИООРГАНИЗАЦИИ МАТРИКСА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ

В.Ю. СИДОРОВА

(Всероссийский НИИ механизации животноводства)

Правильная биоорганизация матрикса в биореакторе необходима для успешной адгезии мультипотентных мезенхимных стволовых клеток животных ММСК, без которой невозможна пролиферация и рост биомассы in vitro. Одним из условий полноценной адгезии является оптимальная величина поверхностного натяжения культуральной жидкости ДМЕМ, которая при температуре 37 °С, оказалась равна 0,049 Н/м, с лимитами 0,039–0,059. Это значение ниже величины поверхностного натяжения крови животных – 0,072, но соответствует уровню сыворотки крови 0,056, присутствующей в стандартных питательных средах. Высокое значение величины поверхностного натяжения культуральной жидкости препятствует успешной адгезии к поверхности матрикса. В случае оптимальных значений поверхностного натяжения в соответствии со степенью заселения клеток на матрикс с различной площадью посева: 3×10^4 в 1 мл – низкой; $5\text{--}8 \times 10^4$ на 1 см² – средней; $8\text{--}20 \times 10^4$ на 1 см² – высокой и $8\text{--}16 \times 10^5$ на 1 см² – очень высокой, можно ожидать увеличенного в 5 раз по сравнению с первоначальным числом заселенных клеток выхода биомассы. Поверхностное натяжение можно рассматривать как энергию, приходящуюся на единицу площади, или как силу, действующую на единицу длины; максимальные значения поверхностного натяжения определяются также буферно-солевым (кальций, калий, натрий) и липидным (триглицериды, холестерин) составом сыворотки крови, а минимальные значения – постепенной адсорбцией липидов и белков из объема на границу раздела фаз. Многие исследователи [5, 10 и др.] обращают внимание, что увеличение температуры вызывает снижение поверхностного натяжения жидкости. Другой способ регулирования поверхностного натяжения заключается в использовании поверхностно-активных веществ (ПАВ) в виде подложки для культивирования клеточной биомассы в культуре в биореакторе на матриксе.

Ключевые слова: матрикс, биоорганизация матрикса, адгезия, оптимальная величина поверхностного натяжения, культуральная жидкость, регулировка поверхностного натяжения, степень заселения стволовых клеток на матрикс.

Введение

Одним из условий инженерно-биотехнологической организации поверхности матрикса для успешной адгезии стволовых клеток животных ММСК является оптимальная величина поверхностного натяжения культуральной жидкости. Физический смысл поверхностного натяжения заключается в том, что клетка, находящаяся в жидкой фазе на твердой поверхности и усваивающая газовую смесь в виде компонента, необходимого для питания и дыхания, стремится уменьшить избыток своей

потенциальной внутренней энергии на границе жидкой и твердой фаз, чтобы перейти к устойчивому и стабильному состоянию, необходимому для начала деления [2]. **Высокое поверхностное натяжение препятствует прикреплению стволовых клеток, средний диаметр которых равняется 100–250 мкм, на внутреннюю поверхность гладкого матрикса со стандартной пористостью 40–60 мкм.**

Поверхностное натяжение – одна из главных термодинамических характеристик жидкости. Кроме значений **поверхностного натяжения величина адгезии** зависит от температуры, осмотического давления, вязкости среды и плотности субстрата. Для жидкостей, таких как вода, различные виды питательных сред, физиологические и некоторые другие растворы, вязкость измеряется в Па/с. Для крови, например, ее показатель равняется $4,8–7,2 \cdot 10^{-3}$ при 37°C , для сыворотки $1,4–2,04$; вязкость воды составляет $8,94 \cdot 10^{-4}$, культуральной жидкости – $1,006 \cdot 10^{-6}$ Па/с при температуре 20°C . [1,5,7] У природных однокомпонентных неассоциированных растворов, например, воды, вязкость всегда меньше, чем у многокомпонентных: адгезия происходит быстрее в растворах с большей вязкостью: в крови, сыворотке, физиологическом растворе, питательной (культуральной) жидкости. Для увеличения вязкости, способствующей адгезии на матриксе, применяют высокополимерные вещества: например, гидролизированный декстран, полимер глюкозы, полиглокин, синкол, поливинилпирролидон и некоторые другие [2, 3, 6].

Метод исследования

При проведении исследований применялись методы анализа литературных данных, математического и статистического анализа имеющегося экспериментального материала, имитационного моделирования. Экспериментальная часть работы была выполнена сотрудниками отдела биотехнологий ФГБНУ ВНИИ механизации животноводства (г. Москва), в период 2014–2017 г, в соответствии с Гос. заданием по импортозамещению: «Провести экспериментальные исследования по определению эксплуатационно–технических показателей работы экспериментального образца биореактора для получения мяса *in vitro* как полноценного белка».

Обсуждение полученных результатов

Понятие поверхностного натяжения жидкости является частью понятия внутренней энергии биомассы. Для его обозначения наиболее часто используют значение коэффициента поверхностного натяжения, который зависит от химического состава (полярности) жидкости и среды, с которой она граничит: газ, пар, твердый субстрат. Правило уравнивания полярностей Ребиндера сообщает, что чем больше разность полярностей сред, тем больше поверхностное натяжение на границе их раздела. Причем, чем больше поверхность субстрата–носителя, тем меньше коэффициент поверхностного натяжения.

В табл. приведены значения коэффициентов поверхностного натяжения некоторых жидкостей. Как видно, значения коэффициентов динамического поверхностного натяжения воды крови воды примерно одинаково, а значение сыворотки крови меньше, чем значение крови сельскохозяйственных животных и составляет 0,056, на уровне показателя сыворотки крови, применяемой в питательных жидкостях для культивирования биомассы клеточных культур. Низкие же значения поверхностного натяжения при культивировании дрожжей *Candida lambica*, позволяют получить дрожжевую культуру этанолюкисляющих дрожжей в устойчивой, стационарной коллоидной системе.

**Значения коэффициентов динамического поверхностного натяжения (ДПН)
некоторых жидкостей, σ , Н/м, при 20°С**

Наименование	Параметры
Вода	0,0725
Молоко	0,050
Сыворотка крови	0,056
Моча	0,066
Кровь (лошади)	0,072
Эфир (спиртовой)	0,0171

На границе твердой и жидкой фаз культуральной жидкости поверхностное натяжение можно определить по формуле:

$$\sigma = \rho \lambda^2 / 4\pi (2\pi v^2 \lambda - g), \text{ где :}$$

σ – поверхностное натяжение;

ρ – плотность жидкости (1,030 г/см³ при 37 °С);

λ – длина волны (50 Гц);

v – активизирующая процесс частота (4 Гц);

g – ускорение свободного падения (9,8 м/сек²).

В данном случае культивирования ствольных клеток ММСК животных при температуре 37 °С величина поверхностного натяжения культуральной (питательной) жидкости оказалась равна **0,049** Н/м, с приблизительными лимитами 0,039 – 0,059. При сравнении с данными Табл., видно, что это значение ниже уровня поверхностного натяжения крови, но соответствует уровню поверхностного натяжения сыворотки крови животных, то есть по этому признаку можно ожидать достаточно активной адгезии клеток к поверхности носителей.

Процесс культивирования ствольных клеток (ММСК) протекает в сложной многофазной системе: газ → жидкость → твердое тело. Исследования роли матриксов и условий их организации при культивировании СК сельскохозяйственных животных только начинаются. Плотность посева биомассы неодинакова и равняется: 3х10⁶ в 1мл– низкая; 2–8 × 10⁴ на 1 см²; средняя 8–20×10⁴ на 1 см²; высокая 2–4×10⁵ на 1 см²; очень высокая 8–16×10⁵ на 1 см². Выход биомассы увеличивается в 5 раз по сравнению с первоначальным числом заселенных клеток.

Использование системы с матриксом сочетает положительные стороны монослойного и суспензионного культивирования. Использование носителя даёт клеткам, обладающим адгезивными свойствами, все преимущества крупномасштабных суспензионных культур: например, матриксы, изготовленные на основе микропористого желатина или пористого боросиликатного стекла, имеют емкость около 3000 клеток/матрикс

При определении концентрации клеток, заселенных на матрикс, ориентировочно можно считать, что на 1 мл среды в культуре может генерироваться 10⁶ клеток. Концентрация зависит от способа пополнения среды в биореакторе. Если конечная урожайность клеток увеличивается благодаря пополнению среды с помощью объёмно–доливного способа, то концентрация возрастает пропорционально процессу.

Поверхностное натяжение культуральной жидкости теоретически рассматривается как энергия, приходящаяся на единицу площади матрикса, или любого другого носителя: бусины, скаффолды, трубки, или как силу, действующую на единицу длины. Величина поверхностного натяжения определяется физиологическими свойствами межмолекулярного взаимодействия – буферно–солевого (Ca, K, Na) и липидного со-

става сыворотки крови, и определяются постепенной адсорбцией липидов и белков на границе жидкой и твердой фаз. За счет имеющейся возможной выраженной кривизны поверхности жидкой дисперсной фазы при высоком поверхностном натяжении возникает избыточное внутримолекулярное давление, приводящее к гибели клеток.

Многие исследователи (Telugu, B. P., et al., 2010 [10], Серебрякова, 2002 [5] и др. [8, 9]) обращают внимание, что увеличение температуры вызывает снижение поверхностного натяжения жидкости. На Рис. показана зависимость поверхностного натяжения жидкости от температуры.

Другим способом регулирования поверхностного натяжения является использование поверхностно-активных веществ (ПАВ) в виде подложки для культивирования культур клеточной биомассы.

Поверхностно-активные вещества ПАВ обладают смачивающими, эмульгирующими и другими важными свойствами и играют большую роли в природе. К ним относятся спирты, жирные кислоты, мыла, белки и др. Молекулы ПАВ содержат две части: гидрофобный углеводородный остаток и гидрофильную группировку. При попадании в раствор они располагаются в поверхностном слое – гидрофильная часть взаимодействует с раствором, а гидрофобная направлена к воздуху. В результате нарушается прочная пленка воды и вместо нее создается пленка из молекул ПАВ. При этом понижается поверхностное натяжение раствора, так как взаимное притяжение между молекулами ПАВ ниже, чем между молекулами воды.

Матрицы для производства биомассы клеток должны иметь небольшой, в пределах 1,5–1,8 МЭКВ/г *электрический заряд*: имеющие слабо отрицательный заряд клетки легко прикрепляются к матриксу и адгезируют; быть *нетоксичными* по отношению к клеткам и *разрешенными* для применения в производстве биологических препаратов. Форма матрикса должна быть одинаковой во всех точках: неоднородный матрикс способствует неомогенному распределению клеточного материала, вводимого в систему, при заселении.

Материал, из которого изготавливается матрикс, должен быть нетвёрдым для уменьшения повреждения клеток; для пищевых технологий производства культурального мяса используют пищевую слабодеградируемый матрикс: самые хорошие результаты биоорганизации матрикса были получены при использовании коллагенов и фибронектинов, так как на поверхности ММСК выявлены клеточные рецепторы к этим молекулам.

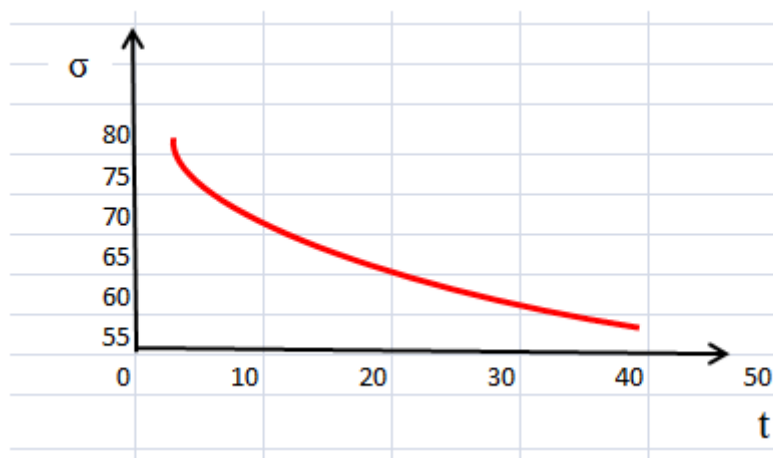


Рис. Показатели зависимости поверхностного натяжения (σ) культуральной жидкости от температуры

Концентрация матрикса может варьировать от 0,5 до 5 мг/мл. Обычно при культивировании применяют концентрацию, не превышающую 1 мг/мл. Повышение концентрации до 3 мг/мл и выше создает дополнительные трудности, связанные с необходимостью перфузии питательной среды и частичной ее замены, что осложняет технологический процесс.

Заключение

Применение матрикса для выращивания стволовых клеток в биореакторах – достаточно новая технология, поэтому, чем больше знаний будет получено по успешному выращиванию биомассы в условиях *in vitro*, тем с большим основанием мы сможем надеяться на положительный результат.

Библиографический список

1. *Гунин М.А., Рубан Е.А., Соловьев Б.В.* Гибель клеток при выращивании на микроносителях // Тезисы доклада на Всероссийской научно-практической конференции «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов» Щелково, 2000. С. 297–298.
2. *Казаков Д.А., Вольхин В.В.* Интенсификация массопереноса кислорода из газовой фазы в водную с использованием газотранспортных жидкостей / Вестник Башкирского ун-та: Раздел химия. 2009. Т. 14. № 2. С. 364–368.
3. *Рогов И.А., Волкова И.М., Иванов Ю.А., Петров Е.Б., Толоконников Г.К., Черноиванов В.И.* Перспективы использования стволовых клеток сельскохозяйственных животных в АПК // Биотехнология. Взгляд в будущее: Материалы 3-й Межд. науч. интернет-конференции. Казань, 25–26 марта 2014 г. Т. 2. С. 72–79.
4. *Рогов И.А., Черноиванов В.И., Иванов Ю.А., Петров Е.Б., Толоконников Г.К., Волкова И.М.* Моделирование выращивания мяса *in vitro* на плоских и объёмных носителях // Прикладная математика, квантовая теория и программирование. Сб. трудов ФРР, 2014. Т. 10. № 1. С. 83–97.
5. *Серебрякова Е.В., Дармов И.В., Медведев Н.П., Алексеев С.А., Рыбак С.И.* Оценка гидрофобных свойств бактериальных клеток по адсорбции на поверхности капель хлороформа // Микробиология. 2002. Т. 71. № 2. С. 237–239.
6. *Сидорова В.Ю.* Особенности жизнедеятельности стволовых клеток животных при использовании различных технологических режимов культурального устройства // Сб. науч. трудов Межд. науч.–практ. конф. «Приоритетные научные направления: от теории к практике» / Новосибирск: 1 марта 2016. С. 120–125.
7. *Сидорова В.Ю.* Принципы взаимосвязи сельскохозяйственной механизации и биотехнологии, или от ТЕХНО– к МИНИ– ЭКО–, БИО– и НАНО– агроуправлениям // Москва. Вестник ВНИИМЖ. № 4 (16). 2014. С. 139–146.
8. *Cederberg C., Persson U.M., Neovius K., Molander S. & Clift R.* Including carbon emissions from deforestation in the carbon footprint of Brazilian beef. *Environmental Science & Technology*, 2011. 45(5). Pp. 1773–1779.
9. *Post M. J.* Cultured meat from stem cells: Challenges and prospects / *M. J. Post/ Meat Science*. 2012. Vol. 92. P. 297–301.
10. *Telugu B.P., Ezashi T. & Roberts R.M.* The promise of stem cell research in pigs and other ungulate species. *Stem Cell Reviews*. 2010. Vol. 6(1). Pp. 31–41.

PARTICULARITIES OF MATRIX BIOORGANIZATION FOR THE CULTIVATION OF ANIMAL STEM CELLS

V.Yu. SIDOROVA

(All-Russian Research Institute of Livestock Mechanization)

The correct bioorganization of matrix is required for successful MMSC stem cell adhesion in farm animals, which is essential for proliferation and biomass growth in the bioreactor in vitro. One of the complete adhesion conditions is the optimal value of culture medium surface tension that is equal 0,049 N/m at 37 °C temperature, with 0,039 – 0,059 approximate limits. This value is below 0,072 that corresponds to the animal blood surface tension value, but corresponds to the serum level of 0,056 presented in standard recipes of nutritious medium. High value of culture fluid surface tension prevents the successful adhesion to the matrix surface. In the case of the surface tension optimal values in accordance with the cells setting on the matrix degree with different space: 3×10^4 in 1 ml – low; $5-8 \times 10^4$ per 1 cm^2 – average; $8-20 \times 10^4$ per 1 cm^2 – high and $8-16 \times 10^5$ per 1 cm^2 is very high, it can be increased expectedly in 5 times as compared with the number of initial populated of biomass cells yield. The surface tension can be regarded as energy per area unit, or as the force acting per length unit; the maximum surface tension values are determined by the buffer-salt (calcium, potassium, sodium) and lipid (triglycerides, cholesterol) composition of blood serum and minimum values is the gradual adsorption of lipids and proteins from the bulk mass to the phase interface. Many researchers (Telugu, B. P., et al., 2010, Serebryakova et al., 2002 and others) note that temperature increasing causes the liquid surface tension decreasing. Another way of surface tension controlling is surface-active substances (SAS) as a substrate for cultivation of cell biomass in the culture at the bioreactor using a matrix.

Key words: matrix, matrix bioorganization, adhesion, optimum surface tension, cultured medium, adjustment of surface tension, colonization of stem cells on the matrix.

References

1. Gunin M.A., Ruban Ye.A., Solov'yev B.V. Gibel' kletok pri vyrashchivaniy na mikro-sitelyakh [Cell death rate when grown on microcarriers] // Tezisy doklada na Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii "Nauchnyye osnovy proizvodstva veterinarnykh biologicheskikh preparatov" Shchelkovo, 2000. Pp. 297–298.
2. Kazakov D.A., Vol'khin V.V. Intensifikatsiya massoperenosa kisloroda iz gazovoy fazy v vodnyuyu s ispol'zovaniyem gazotransportnykh zhidkostey [Intensification of the mass transfer of oxygen from the gas phase to the water phase using gas-transporting liquids] / Vestnik Bashkirskogo un-ta: Razdel khimiya. 2009. Vol. 14. No. 2. Pp. 364–368.
3. Rogov I.A., Volkova I.M., Ivanov Yu.A., Petrov Ye.B., Tolokonnikov G.K., Chernoiivanov V.I. Perspektivy ispol'zovaniya stvolovykh kletok sel'skokhozyaystvennykh zhitovnykh v APK [Prospects for the use of stem cells of farm animals in the farming industry] // Biotekhnologiya. Vzgl'yad v budushcheye: Materialy 3-y Mezhd. nauch. internet-konferentsii. Kazan', 25–26 March 2014. Vol. 2. Pp. 72–79.
4. Rogov I.A., Chernoiivanov V.I., Ivanov Yu.A., Petrov Ye.B., Tolokonnikov G.K., Volkova I.M. Modelirovaniye vyrashchivaniya myasa in vitro na ploskikh i ob'yomnykh nositelyakh [Modeling meat cultivation in vitro on flat and large carriers] // Prikladnaya matematika, kvantovaya teoriya i programmirovaniye. Sb. trudov FRR, 2014. Vol. 10. No. 1. Pp. 83–97.
5. Serebryakova Ye.V., Darmov I.V., Medvedev N.P., Alekseyev S.A., Rybak S.I. Ot-

senka gidrofobnykh svoystv bakterial'nykh kletok po adsorbtsii na poverkhnosti kapel' khloroforma [Evaluation of the hydrophobic properties of bacterial cells by their adsorption on the surface of chloroform droplets] // Mikrobiologiya. 2002. Vol. 71. No. 2. Pp. 237–239.

6. *Sidorova V.Yu.* Osobennosti zhiznedeyatel'nosti stvolovykh kletok zhitovnykh pri ispol'zovanii razlichnykh tekhnologicheskikh rezhimov kul'tural'nogo ustroystva [Features of the vital activity of animal stem cells when using different technological modes of the cultural installation] // Sb. nauch. trudov Mezhd. nauch.-prakt. konf. "Prioritetnyye nauchnyye napravleniya: ot teorii k praktike" / Novosibirsk: 1 March, 2016. Pp. 120–125.

7. *Sidorova V.Yu.* Printsipy vzaimosvyazi sel'skokhozyaystvennoy mekhanizatsii i biotekhnologii, ili ot techno- k mini- eko-, bio- i nano- agronapravleniyam [Principles of interrelation of agricultural mechanization and biotechnology, or from techno- to mini-, eco-, bio- and nano- development trends] // Moskva. Vestnik VNIIMZH. No. 4 (16). 2014. Pp. 139–146.

8. *Cederberg C., Persson U.M., Neovius K., Molander S. & Clift R.* Including carbon emissions from deforestation in the carbon footprint of Brazilian beef. *Environmental Science & Technology*, 2011. 45(5). Pp. 1773–1779.

9. *Post M. J.* Cultured meat from stem cells: Challenges and prospects / M. J. Post / *Meat Science*. 2012. Vol. 92. Pp. 297–301.

10. *Telugu B.P., Ezashi T. & Roberts R.M.* The promise of stem cell research in pigs and other ungulate species. *Stem Cell Reviews*. 2010. Vol. 6(1). Pp. 31–41.

Сидорова Виктория Юрьевна – д. с.-х. н., вед. науч. сотр. отдела биотехнологий ФГНУ Всероссийский НИИ механизации животноводства (142134, Москва, пос. Рязановское, пос. Знамя октября, д. 31; e-mail: vniimzh@mail.ru).

Viktoriya Yu. Sidorova – DSc (Ag), Key Research Associate. Department of Biotechnology, All-Russian Research Institute for Livestock Breeding Mechanization (142134, Moscow, Ryazanovskoe village, Znamya Oktyabrya village, 31; e-mail: vniimzh@mail.ru).