

УДК 602, 532.51, 535.372

## ТЕХНОЛОГИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ В РОТАЦИОННОМ БИОРЕАКТОРЕ: МОДЕЛИРОВАНИЕ ТЕЧЕНИЯ ЖИДКОСТИ И ЛАЗЕРНАЯ ФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА

Е. О. Цибульская, Н. А. Маслов, П. М. Ларионов\*,  
В. Л. Ганимедов

Институт теоретической и прикладной механики им. С. А. Христиановича СО РАН,  
630090 Новосибирск, Россия  
Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,  
630090 Новосибирск, Россия  
E-mails: euglenaria@gmail.com, nmaslov@itam.nsc.ru, ptrl@mail.ru, ganim@itam.nsc.ru

Разработана технология выращивания костной ткани на тонком скаффолде в ротационном биореакторе. Для отработки метода определен оптимальный режим культивирования клеточного материала и разработан оптический метод диагностики развития костной ткани в процессе ее выращивания. Проведено численное моделирование течения жидкости в биореакторе, позволившее значительно упростить проведение медицинского эксперимента и выбрать оптимальные значения частоты вращения и касательных напряжений, действующих на размещенный на скаффолде клеточный материал. Оптическая диагностика образцов скаффолда в процессе динамического культивирования в биореакторе проведена с помощью метода лазерно-индуцированной флюоресценции. С использованием алгоритма на основе метода главных компонент проведен анализ спектральных данных, позволивший вычислить спектры возбуждения и флюоресцентного излучения основных флюоресцирующих веществ в образце (аминокислот тирозина и триптофана, структурного белка коллагена и флюоресцирующих структур поликапролактона). Установлено, что в процессе динамического культивирования в образцах увеличивается вклад компоненты, соответствующей коллагену, что свидетельствует об эффективном формировании внеклеточного матрикса кости.

**Ключевые слова:** математическое моделирование, вычислительный алгоритм, ротационный биореактор, вихри Тейлора, уравнения Навье — Стокса, ламинарный режим течения, касательное напряжение, скаффолд, лазерно-индуцированная флюоресценция, метод главных компонент.

DOI: 10.15372/PMTF20200512

**Введение.** Биологические реакторы — наиболее распространенные устройства для создания искусственных тканей и органов. Они перемешивают питательную среду в процессе культивирования, удаляют продукты жизнедеятельности растущих клеток, подводят питательные вещества. Технические параметры биореактора нового типа должны обеспечивать оптимальный режим для культивирования клеток.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг. (коды проектов АААА-А17-117030610126-4, АААА-А17-117030610122-6).

© Цибульская Е. О., Маслов Н. А., Ларионов П. М., Ганимедов В. Л., 2020

Для трансплантологии и ортопедии представляют интерес тканеинженерные конструкции на основе биосовместимых полимеров [1]. Биodeградируемый каркас (скаффолд) заселяется собственными клетками пациента, которые в процессе культивирования формируют костную ткань. В отличие от аллотрансплантатов, содержащих генетически чужеродные ткани, использование подобных материалов не приводит к осложнениям и позволяет замещать большие объемы недостающих костных тканей. Заселение скаффолда значительно упрощается при использовании стволовых клеток. После закрепления клеток полученные конструкции культивируются в питательной среде при наличии специальных веществ — индукторов, которые запускают процесс дифференцировки стволовых клеток — перерождения в необходимый клеточный тип. В качестве основных источников стволовых клеток для регенерации кости при использовании скаффолдов рассматриваются надкостница [2] и стволовые клетки костномозгового и жирового происхождения [3].

Традиционно в тканевой инженерии используется статическое культивирование. В настоящее время изучается возможность использования биологических реакторов, обеспечивающих динамическое культивирование заселенных клетками скаффолдов. Предполагается, что течение жидкости способствует достижению оптимальной клеточной плотности, образованию костной и хрящевой тканей, а также формированию внеклеточного матрикса [4]. Кроме того, динамическое культивирование позволяет использовать механотрансдукцию — преобразование механического воздействия жидкости в специфические клеточные сигналы. Наиболее важным параметром механического воздействия является касательное напряжение жидкости: его влияние на стволовые клетки значительно повышает эффективность их перерождения в остеобласты и остеоциты [5].

В настоящее время в тканевой инженерии кости преобладает тенденция использования биореакторов перфузионного типа. Во многом это определяется размерами, формой и механическими свойствами скаффолда, которые должны быть близки к свойствам нормальной кости, при этом выращенная ткань должна быть способна замещать весь объем костного дефекта.

Данная работа посвящена развитию технологии тонкого скаффолда, представляющего собой полимерную пленку на основе поликапролактона и желатина, сформированную с использованием электроспиннинга [6]. В биореакторе из заселенного клетками скаффолда формируется костная ткань. Полученный лист можно использовать для замещения костного дефекта в виде “свитка” или формирования объемных конструкций.

Наличие плоского полотна позволяет использовать для динамического культивирования ротационный биологический реактор, в котором заселенное стволовыми клетками полотно скаффолда натягивается на каркас и вращается в питательном растворе [7]. Уровень механического воздействия на клетки регулируется частотой вращения каркаса. Определение оптимального режима работы реактора в серии медицинских экспериментов по выращиванию костного материала с изменением параметров культивирования не представляется возможным вследствие больших трудозатрат и расхода материалов. Альтернативой данным экспериментам является численное моделирование процессов, происходящих при культивировании клеток в биореакторе. Проведение расчетов течения жидкости в реакторе с учетом геометрии системы позволяет охарактеризовать структуру течения и определить такие количественные параметры, как касательное напряжение жидкости, давление, скорость течения и т. д. Таким образом, проведение параметрических расчетов при различных значениях частоты вращения каркаса позволяет подобрать режим культивирования в соответствии с поставленными требованиями. При таком подходе возможен оптический контроль всех этапов биотехнологии, включая адгезию и длительные сроки культивирования. Метод лазерно-индуцированной флуоресценции (ЛИФ) часто используется в медицине в качестве неинвазивного диагностического инструмента, не требующего

сложной подготовки образцов. Вследствие высокой чувствительности флюоресцентного излучения к изменениям состава и структуры образца данный метод активно используется при исследовании биологических тканей, в том числе в коммерчески эффективном сегменте тканевой инженерии хряща [8]. Однако в большинстве работ для возбуждения спектров ЛИФ используется лазерное излучение с длинами волн более 300 нм, а диапазон длин волн 210 ÷ 290 нм изучен недостаточно. Между тем исследование коротковолнового ультрафиолетового диапазона представляет особый интерес, поскольку в этом диапазоне возбуждается флюоресцентное излучение множества тканевых флюорофоров (аминокислот триптофана и тирозина, белков коллагена и эластина и т. д.) и флюоресценция триптофана существенно зависит от его микроокружения [9]. Вследствие этого данный диапазон можно использовать при разработке методик диагностики биологических тканей.

Целью настоящей работы является тестирование возможности культивирования тонкого полимерного композитного скаффолда в ротационном биореакторе. Для этого решались следующие задачи:

- 1) с помощью компьютерного моделирования определялся режим работы реактора, обеспечивающий оптимальные для дифференцировки стволовых клеток значения касательных напряжений;

- 2) проводилось культивирование скаффолда в динамических и статических условиях;

- 3) с использованием анализа морфологических изменений и гистофлюоресцентных методов оценивалось развитие ткани;

- 4) исследовались матрицы возбуждения-эмиссии ЛИФ для построения алгоритма обработки данных и оценки скорости роста костной ткани в процессе культивирования.

**1. Материалы и методы исследования.** Для решения поставленных задач проводилось численное моделирование течения жидкости в биореакторе с помощью Ansys Fluent, а также исследование культивированных образцов скаффолда с помощью методов лазерной конфокальной микроскопии и ЛИФ.

**1.1. Численное моделирование.** Задача оптимизации режима работы ротационного биореактора решалась с помощью метода математического моделирования течения жидкости в программном пакете Ansys Fluent 12.

Фотография ротационного биореактора представлена на рис. 1, *а*. При моделировании использовалась упрощенная геометрическая модель, состоящая из двух коаксиальных цилиндров, один из которых вставлен в другой (рис. 1, *б*). Внешний цилиндр диаметром 79 мм моделировал стенку реактора и имел скругленное дно в соответствии с реальной геометрией. Погруженный в жидкость полый внутренний цилиндр с внешним диаметром 50 мм и толщиной стенок 2 мм моделировал каркас, на котором закрепляется пленка скаффолда, заселенная стволовыми клетками. Подробное описание системы и ее геометрические параметры приведены в работе [7].

Структура течения определялась в объеме реактора, заполняемом жидкостью и ограниченном внешним цилиндром. При моделировании жидкости использовались параметры питательной среды DMEM при температуре 37 °С: плотность 1000 кг/м<sup>3</sup>, динамическая вязкость 1 мПа·с [10]. Течение жидкости описывалось с помощью системы уравнений Навье — Стокса для несжимаемой жидкости. При решении задачи не учитывались теплообмен и силы гравитации, а режим течения постулировался ламинарным. Условие вращения ставилось только на поверхности внутреннего цилиндра, остальные поверхности полагались неподвижными. Таким образом, течение жидкости возникало вследствие вязкости при вращении поверхности. На верхней поверхности, соответствующей границе раздела жидкости и воздуха, задавалось условие равенства нулю касательного напряжения. На остальных поверхностях ставилось условие прилипания для скорости. Граничные условия, особенности построения сетки, верификация построенной математической модели



Рис. 1. Ротационный биореактор (а) и его геометрическая модель (б)

для задачи о вращении двух коаксиальных цилиндров и результаты визуализации течения жидкости в реальном ротационном биореакторе описаны в [7, 11, 12].

1.2. *Культивирование скаффолда.* В настоящей работе использовался композитный скаффолд на основе поликапролактона и хитозана с низкой молекулярной массой. Плотна скаффолда формировались с помощью метода электроспиннинга NF-103 (MECCO, Япония). Электроформование проводилось с использованием композита из 0,5 %-го раствора хитозана и 12 %-го раствора поликапролактона с массой 80 кДа (Sigma-Aldrich, США). В качестве основного растворителя использовался хлороформ. Параметры работы электроспиннинга следующие: ускоряющее напряжение — 21 кВ, расстояние от иглы до коллектора — 22 см, скорость подачи раствора полимера — 1 мл/ч. Сформированный скаффолд имел следующие структурные характеристики: пористость — 92 %, угол смачивания —  $45,4^\circ$ , средний диаметр волокон —  $(860 \pm 40)$  нм. Результаты измерения размеров волокон и пористости, а также трехмерного моделирования с использованием методов конфокальной микроскопии представлены в работе [6].

В качестве клеточного материала использовались мезенхимальные стволовые клетки человека, имеющие костномозговое происхождение. Образцы скаффолда, заселенные стволовыми клетками, культивировались в динамических условиях в биореакторе и в статических условиях культурального планшета в качестве контроля. В процессе культивирования питательная среда DMEM (Gibco, США) в биореакторе и планшете заменялась на 50 % через каждые 2–3 сут. В процессе культивирования в питательную среду вводились индукторы, стимулирующие остеиндукцию: дексаметазон (100 нмоль),  $\beta$ -глицерофосфат (5 нмоль), аскорбиновая кислота (0,2 нмоль). На третьей и пятой неделе культивирования образцы вынимались из реактора и планшета для исследования.

1.3. *Лазерная конфокальная микроскопия.* Фрагменты скаффолда с клетками фиксировались в 10 %-м растворе нейтрального формалина, затем проводилось флюоресцентное окрашивание для последующего микроскопического исследования. Исследование образцов скаффолда проводилось с помощью лазерного конфокального микроскопа Zeiss LSM 710 НВО. Для возбуждения флюоресцентного излучения ядер, окрашенных раствором DAPI, использовался полупроводниковый лазер с длиной волны 405 нм, который также применялся для возбуждения аутофлюоресценции поликапролактона. Для определения интенсивности  $I$  флюоресцентного излучения метки, связанной с коллагеном первого типа (Alexa Fluor®555), использовался диодный лазер с длиной волны 561 нм. Интенсивность флюоресцентного излучения метки, связанной с остеопонтином (Phycocerythrin), определялась с помощью аргонового лазера с длиной волны излучения 514 нм.

1.4. *Лазерно-индуцированная флюоресценция.* На рис. 2 представлена схема экспериментальной установки для регистрации спектров флюоресцентного излучения.

Для возбуждения флюоресцентного излучения применялся импульсный перестраиваемый лазер Vibrant (HE) 355 II + UV (Opotek Inc, США), оснащенный оптическим параметрическим генератором, позволяющим изменять длину волны в диапазоне 210 ÷ 350 нм с шагом 10 нм. Это позволяет регистрировать матрицы возбуждения-эмиссии — наборы спектров флюоресцентного излучения при различных длинах волн возбуждающего излучения. Матрицы содержат значительно больший объем информации, чем единичные спектры: при изменении длины волны возбуждающего излучения спектры флюоресцентного

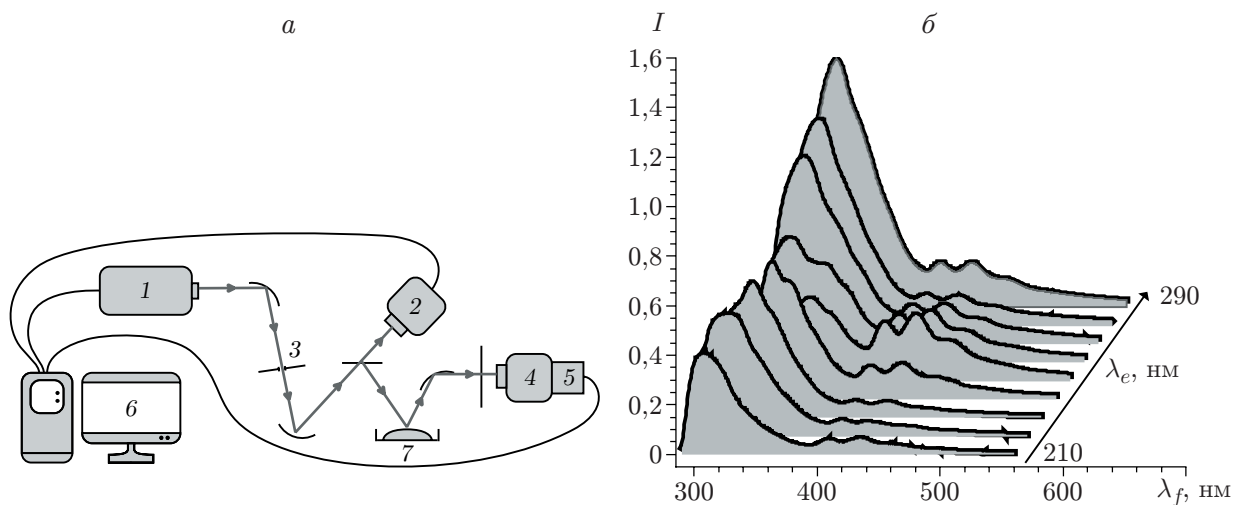


Рис. 2. Схема экспериментальной установки (а) и характерная матрица возбуждения-эмиссии при возбуждении в диапазоне длин волн  $\lambda_e = 210 \div 290$  нм (б):

1 — лазер, 2 — фотодатчик, 3 — диафрагма, 4 — спектрограф, 5 — ПЗС-матрица, 6 — компьютер, 7 — исследуемый образец

излучения многокомпонентных образцов меняются, вследствие того что различаются формы спектров возбуждения флюорофоров, составляющих образцы. Таким образом, количество способов статистического анализа полученных спектральных данных увеличивается.

Для удаления рассеянного излучения лазерной системы применялась система, состоящая из диафрагмы и сферических зеркал. Энергия импульсов лазера контролировалась с помощью фотодатчика на основе фотодиода ФД-24. Энергия импульсов во время регистрации спектров ограничивалась значением 200 мкДж, так как на данном участке интенсивность флюоресцентного излучения зависит от энергии линейно, а увеличение энергии приводит к насыщению флюоресцентного сигнала [13]. Импульсы лазера длительностью 5 нс повторялись с частотой 10 Гц. Размер пятна освещения лазера составлял  $6 \times 10$  мм. Спектры флюоресценции регистрировались спектрографом Acton SpectraPro SP2300 с матрицей Pixis 256 CCD (Princeton Instruments, США), для защиты которой перед входной щелью спектрографа устанавливался фильтр, отсекающий излучение с длиной волны менее 300 нм. Выдержка при регистрации спектров составляла 2 с, щель спектрометра соответствовала спектральному разрешению 0,5 нм. Спектры флюоресцентного излучения регистрировались в диапазоне длин волн  $\lambda_f = 290 \div 550$  нм и нормировались на чувствительность матрицы. Для каждой длины волны возбуждения спектры флюоресцентного излучения регистрировались пять раз, нормировались на суммарную поглощенную дозу излучения и осреднялись. Также при измерении спектров контролировалась линейность зависимости интенсивности флюоресценции от поглощенной дозы.

Перед спектроскопическим исследованием все образцы отмывались от питательной среды DMEM в физиологическом растворе (0,9 %-м растворе NaCl), матрицы возбуждения-эмиссии регистрировались в диапазоне длин волн возбуждения  $\lambda_e = 210 \div 290$  нм. Количество образцов незаселенного полотна скаффолда составляло 4 шт., количество образцов при статическом культивировании: через три недели — 2 шт., через пять недель — 1 шт.; количество образцов при динамическом культивировании: через две недели — 4 шт., через три недели — 2 шт., через пять недель — 2 шт. Матрицы регистрировались по два раза для двух поверхностей полотен скаффолда — заселенной и не заселенной клетками.

Спектры флюоресцентного излучения заселенного клетками скаффолда показывают наличие в них флюоресцирующих структур поликапролактона и биологических флюорофоров, т. е. являются многокомпонентными. Для анализа подобных массивов спектральных данных часто используется метод главных компонент (МГК), с помощью которого вычисляются главные компоненты, наиболее точно описывающие исходные данные. В общем случае они являются знакопеременными вследствие их ортогональности.

Для обработки спектральных данных использовался алгоритм на основе МГК, модифицированный для анализа матриц возбуждения-эмиссии оптически тонких многокомпонентных образцов [14]. Данный алгоритм использует МГК в тензорном виде и основан на модели флюоресценции однородной, оптически тонкой биологической ткани. Число главных компонент (ГК) задается априори, исходя из первоначального предположения о составе образца. Как правило, матрицы возбуждения-эмиссии биологических тканей полностью описываются тремя-четырьмя главными компонентами (в пределах 10 % по интенсивности). В случае если предполагаемое число главных компонент недостаточно точно описывает исходные матрицы во время расчета, данное значение изменяется. Векторы главных компонент уточняются в течение нескольких сотен итераций с использованием тензора исходных данных, в котором учитываются вклады всех компонент, кроме уточняемой. Данные модификации позволяют для оптически тонких образцов перейти от знакопеременных компонент к положительно определенным, т. е. вычислить спектры, которые можно сопоставить со спектрами известных флюорофоров. Таким образом, представлен-

ный вычислительный алгоритм позволяет рассчитывать с использованием матриц многокомпонентных образцов спектры возбуждения и флюоресценции исходных флюорофоров, а также весовые коэффициенты, пропорциональные концентрации вещества. При этом не используется какая-либо априорная информация о спектрах. Это имеет большое значение в случае биологических тканей, точный состав которых неизвестен и спектры флюоресцирующих компонент которых могут меняться в зависимости от микроокружения.

**2. Результаты исследования и их обсуждение.** Рассмотрим основные результаты численного моделирования, которые использовались для выбора частоты вращения реактора в проведенном эксперименте по выращиванию клеточного материала, а также результаты анализа спектральных данных полученных образцов.

*2.1. Выбор режима работы биореактора.* Описанная выше математическая модель позволяет оценить значение касательного напряжения, действующего на поверхность внутреннего цилиндра, соответствующую скаффолду с клеточным материалом в реальном биореакторе, и определить структуру течения.

Течение жидкости в зазоре между стенкой реактора и внутренним цилиндром, являющимся каркасом для скаффолда, характеризуется наличием вихрей Тейлора. В зазоре размещаются два вихря, вращающихся в противоположных направлениях (рис. 3,а). Полученные результаты использовались при выборе режима работы ротационного биологического реактора в эксперименте по выращиванию костной ткани на скаффолде. Для выращивания ткани была выбрана частота вращения 8 об/мин. Это значение соответствует среднему касательному напряжению 6 мПа (4 ÷ 10 мПа в середине и на краях скаффолда), что согласуется с данными работы [15].

При наличии вихрей Тейлора касательное напряжение  $\tau_y$  неравномерно распределяется вдоль образующей внутреннего цилиндра (рис. 3,б). В области сопряжения вихрей касательное напряжение имеет низкое значение, в области на краях — повышенное. Таким образом, клетки на поверхности скаффолда подвергаются неравномерному механическому воздействию. Однако несимметричность реальной геометрии реактора приводит к периодическому перемешиванию вихрей, в результате чего осредняется значение касательного напряжения, действующего на участки поверхности скаффолда [12].

*2.2. Конфокальная лазерная микроскопия.* Поверхность скаффолда представлена ячейстыми структурами овальной формы с максимальным диаметром ячейки, приблизительно равным 120 мкм (рис. 4). По окончании этапа адгезии перед загрузкой тканеинженерных конструкций в реактор через 48 ч после заселения численная плотность стволовых клеток составляла  $(1,77 \cdot 10^5 \pm 10^2)$  шт./см<sup>2</sup>.

После культивирования скаффолда в течение трех недель обнаружено, что происходит образование костной ткани (неоостеогенез), о чем свидетельствуют распространенная диффузная экспрессия остеопонтина и наличие сплошного слоя коллагена первого типа (протоколлагена), состоящего из депозитов размером 10 ÷ 25 мкм (рис. 5). Наблюдалось статистически значимое увеличение численной плотности остеогенных клеток на 36 % ( $P < 0,001$ ) по сравнению с численной плотностью при статическом культивировании в течение того же периода. Интенсивность флюоресцентного излучения метки, соответствующей коллагену, выше на 53 %.

Можно констатировать, что после трех недель многослойная культура стволовых клеток в динамических условиях трансформируется в неоматрикс кости.

*2.3. ЛИФ-спектроскопия.* На рис. 6 представлены спектры флюоресцентного излучения заселенных стволовыми клетками поверхностей скаффолдов для различных групп в процессе культивирования при длине волны возбуждения  $\lambda_e = 250$  нм. Для удобства сравнения спектры нормировались на максимальное значение интенсивности при длине волны флюоресцентного излучения 435 нм. При культивировании в различных условиях

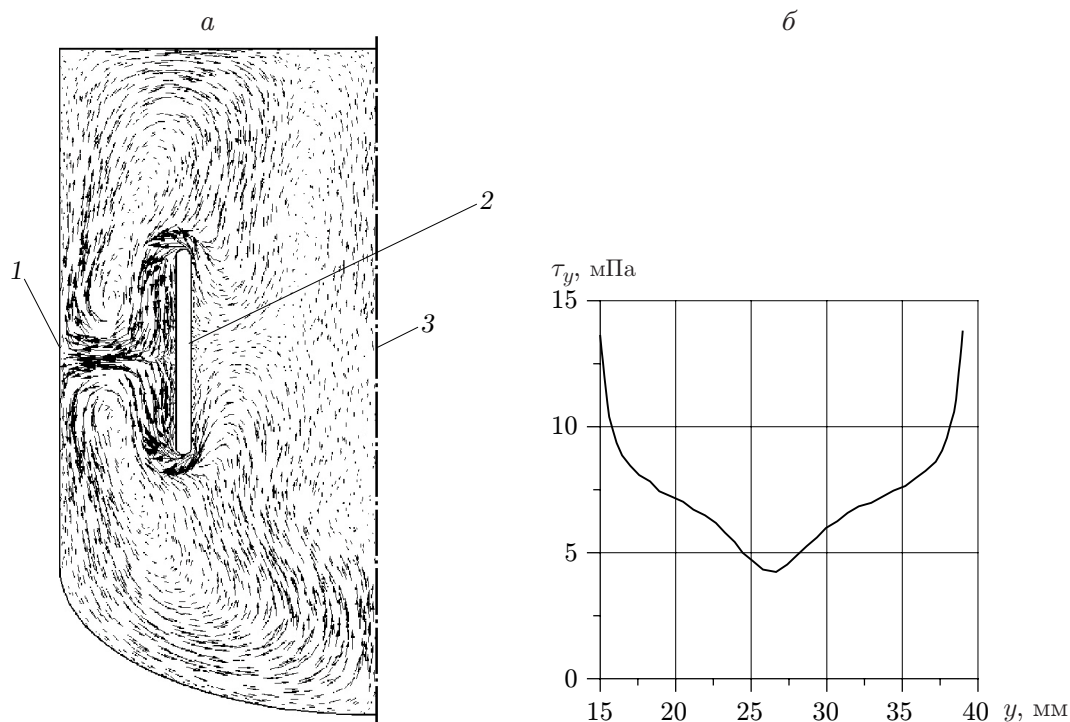


Рис. 3. Вихри Тейлора в зазоре между стенкой реактора и внутренним цилиндром (а) и распределение касательного напряжения вдоль образующей внутреннего цилиндра (б):

1 — стенка, 2 — внутренний цилиндр, 3 — ось вращения

интенсивность флюоресцентного излучения заселенного скаффолда (кривые 1–3 на рис. 6) повышается в области длин волн  $300 \div 360$  нм по сравнению со спектром излучения незаселенной пленки (кривая 4 на рис. 6). При этом спектры образцов, которые подвергались вращению в биореакторе, отличаются в этой области от спектров, полученных при статическом культивировании, как по форме, так и по относительной интенсивности. Таким образом, данный спектральный интервал содержит информацию о клетках и процессах, происходящих при их культивировании.

Спектры флюоресценции в области длин волн  $300 \div 360$  нм, измеренные на заселенной клетками поверхности, отличаются от спектров, измеренных на противоположной поверхности, не более чем на 20 %. Пленки скаффолда формировались с помощью метода электроспиннинга и имели размер волокон  $(860 \pm 40)$  нм и толщину 40 мкм [6]. Учитывая близость спектров, измеренных на поверхностях полотна, образцы можно считать оптически тонкими: лазерное излучение на расстоянии, равном толщине образца, ослабляется незначительно и возбуждает флюоресцентное излучение клеток. На основе этого полученный набор матриц возбуждения-эмиссии анализировался с помощью алгоритма, описанного выше.

Результирующие ГК представлены на рис. 7. Исходные матрицы возбуждения-эмиссии всех групп скаффолдов можно с достаточной точностью (в пределах 10 % по интенсивности) описать суммой представленных спектров с соответствующими весовыми коэффициентами. При этом выбор четырех компонент для описания спектров оправдан, так как выбор дополнительной пятой компоненты не привел к существенному увеличению точности подбора спектров. Поскольку данные компоненты описывают флюоресцентное излучение многосоставного образца, их характеристики вследствие взаимодействия флюо-



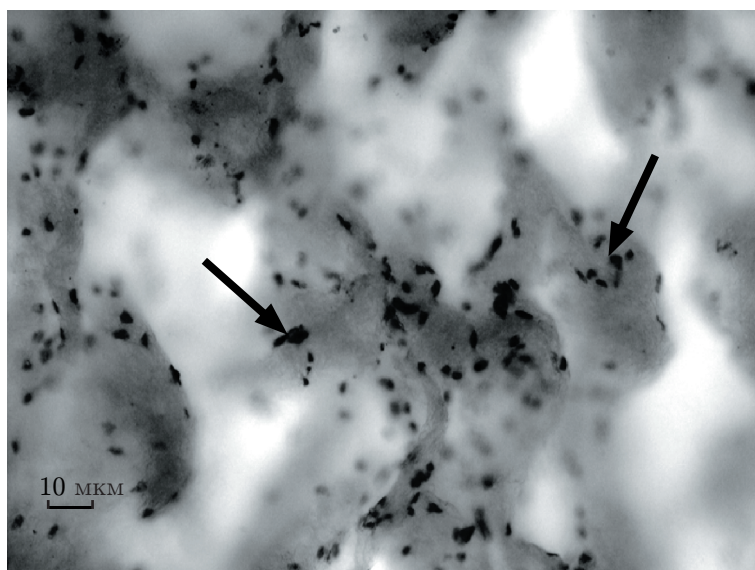


Рис. 4. Ячеистая структура скаффолда, на поверхности которого адгезирована культура мезенхимальных стромальных стволовых клеток человека (стрелки), выявленная с помощью окраски по Романовскому

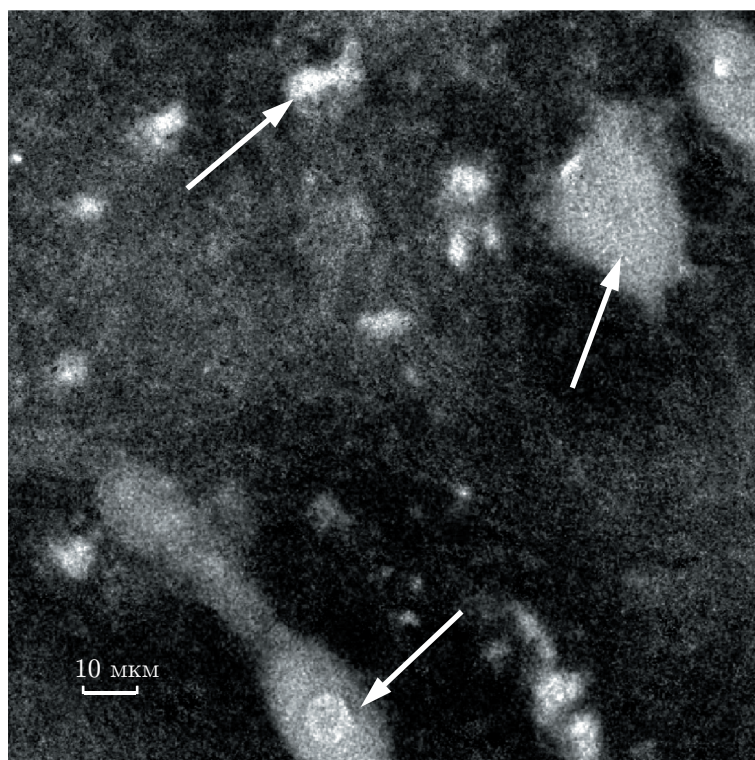


Рис. 5. Пространственное изображение скаффолда, культивированного в течение трех недель в условиях биореактора (лазерная конфокальная микроскопия): стрелки — области, заполненные коллагеном первого типа

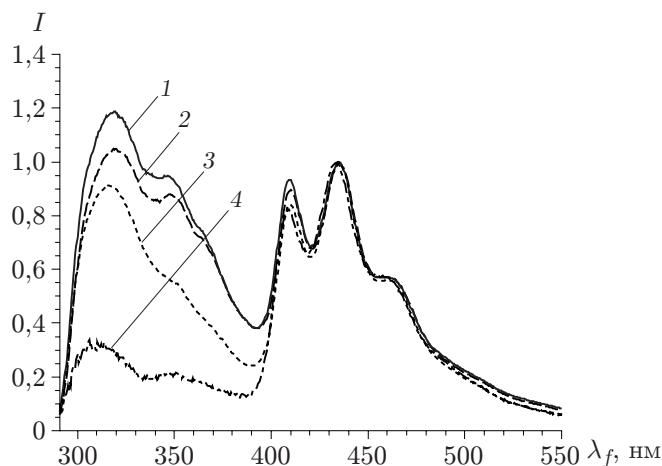


Рис. 6. Спектры флуоресцентного излучения образцов при длине волны возбуждения  $\lambda_e = 250$  нм:

1, 2 — заселенные скаффолды, культивированные в течение трех и двух недель при наличии вращения в биореакторе, 3 — заселенный скаффолд, культивированный в течение трех недель в отсутствие вращения в биореакторе, 4 — незаселенный скаффолд

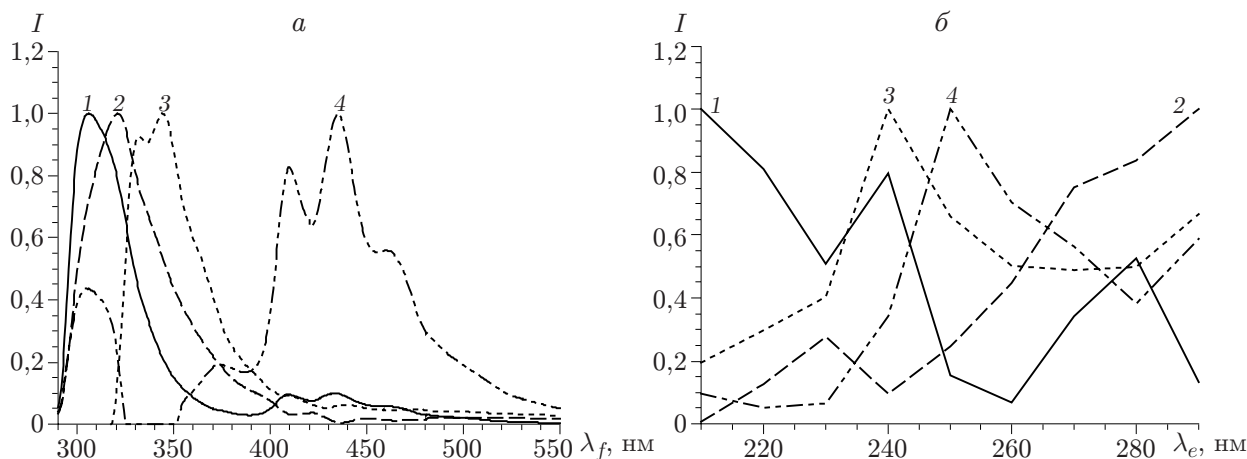


Рис. 7. Спектры флуоресцентного излучения (а) и возбуждения (б) главных компонент в образцах скаффолда:

1 — ГК1, 2 — ГК2, 3 — ГК3, 4 — ГК4

рофоров с окружением, оптических свойств ткани могут отличаться от характеристик для “чистых” веществ. Сравнение со спектром 4 (см. рис. 6) показывает, что компонента ГК4 принадлежит флуоресцирующим структурам поликапролактона. Максимальное значение интенсивности флуоресцентного излучения компоненты ГК1 соответствует длине волны  $\lambda_f = 305$  нм, эффективность возбуждения при увеличении длины волны уменьшается, характеристики данной компоненты соответствуют аминокислоте тирозину. Максимальное значение интенсивности флуоресцентного излучения компоненты ГК2 соответствует длине волны  $\lambda_f = 325$  нм, эффективность возбуждения при увеличении длины волны увеличивается, характеристики данной компоненты соответствуют аминокислоте триптофану. Максимальное значение интенсивности флуоресцентного излучения компоненты ГК3 соответствует длине волны  $\lambda_f = 350$  нм, а эффективность возбуждения максимальна при

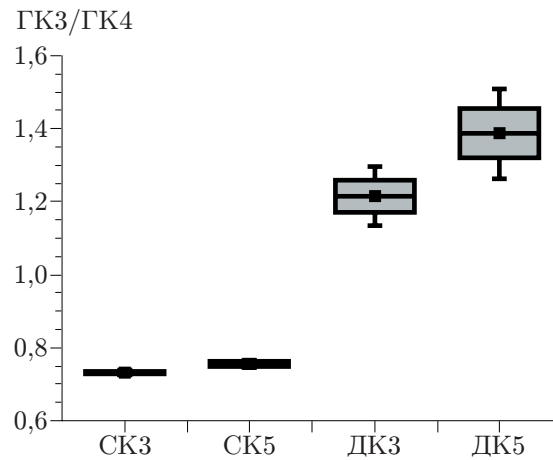


Рис. 8. Отношение весовых коэффициентов компонент ГК3/ГК4 для исследуемых групп скаффолдов:

СК3, СК5 — статическое культивирование в течение трех и пяти недель, ДК3, ДК5 — динамическое культивирование в течение трех и пяти недель

$\lambda_e = 240$  нм. Данную компоненту можно связать с коллагеном, молекулярная структура которого зависит от его типа. Обычно флюоресцентное излучение коллагена определяется поперечными связями пиридинолина, максимальное значение интенсивности для которых соответствует длине волны  $\lambda_f = 390 \div 400$  нм, однако в некоторых случаях имеет место флюоресценция мономеров с одним из максимумов при  $\lambda_f = 350$  нм [16]. При этом компонента имеет два пика, что может быть обусловлено наличием в образцах двух флюорофоров с одинаковыми спектрами возбуждения либо специфической структурой коллагена.

Данные о весовых коэффициентах, пропорциональных концентрации вещества, свидетельствуют о том, что отношение весовых коэффициентов компонент ГК3 (коллаген) и ГК4 (поликапролактон) можно использовать для идентификации групп образцов. На рис. 8 представлены типы образцов скаффолда при различных значениях отношения указанных параметров. Видно, что для образцов, подвергнутых вращению в реакторе, отношение весовых коэффициентов ГК3/ГК4 значительно больше, чем для контрольных образцов. При увеличении времени культивирования образцов в биореакторе до пяти недель данное отношение продолжает увеличиваться, что свидетельствует о росте биологического материала на скаффолде.

Учитывая гистофлюоресцентные данные о значительно большем уровне коллагена при динамическом культивировании в течение трех недель, чем при статическом культивировании, можно предположить, что увеличение коэффициента ГК3/ГК4 при динамическом культивировании в течение пяти недель свидетельствует о формирующемся неоматриксе кости, а значение этого соотношения позволяет оценить степень сформированности ткани.

**Заключение.** Разработка скаффолд-технологии для замещения дефектов костной ткани с использованием тонких полимерных пленок требует решения множества методических задач. В частности, для выращивания биологического материала в новом ротационном биореакторе большое значение имеют определение оптимального режима культивирования клеток и диагностика динамики роста костной ткани в процессе выращивания.

Численное моделирование позволяет упростить медицинский эксперимент. Моделирование течения жидкости в полости биореактора позволило визуализировать структуру течения и показать наличие вихрей Тейлора, вызывающих неравномерность распределения параметров течения, характеризующих механическое воздействие жидкости на клетки. Результаты проведенных параметрических расчетов позволяют определить оптимальную частоту вращения скаффолда, равную 8 об/мин, что соответствует среднему касательному напряжению 6 мПа. Результаты проведенных при таких условиях экспериментов показывают, что длительное динамическое культивирование скаффолда, заселенного мезенхимальными стволовыми клетками, в условиях ротационного реактора позволяет эффективно формировать внеклеточный матрикс кости в течение двух-трех недель.

Для исследования образцов выращиваемого костного материала применялся метод лазерно-индуцированной флюоресценции. Обработка матриц возбуждения-эмиссии проводилась с использованием модифицированного алгоритма на основе метода главных компонент в тензорном виде. Данный алгоритм позволяет оценить количество основных флюоресцирующих компонент в образцах скаффолда и рассчитать их спектры возбуждения и флюоресценции, не используя априорную информацию. С помощью этого алгоритма также рассчитаны весовые коэффициенты основных флюорофоров, пропорциональные концентрации этих веществ. Установлено, что в спектры флюоресцентного излучения заселенных скаффолдов вносят вклад аминокислоты тирозин и триптофан, коллаген и флюоресцирующие структуры поликапролактона. Показано, что при культивировании образцов в ротационном биореакторе вклад компоненты, соответствующей коллагену, больше, чем при культивировании образцов в статических условиях. Результаты гистофлюоресцентного исследования образцов свидетельствуют о формировании неоматрикса кости.

Полученные результаты свидетельствуют об эффективности применения механотрансдукции для создания костного неоматрикса в заселенных стволовыми клетками скаффолдах, перспективности применения биологических реакторов ротационного типа для тканевой инженерии и лазерной флюоресцентной спектроскопии с целью диагностики растущей ткани. Метод главных компонент можно использовать для обработки спектральных данных при исследовании не только биологических тканей, но и других образцов неизвестного состава.

## ЛИТЕРАТУРА

1. **Henkel J., Woodruff M. A., Epari D. R., et al.** Bone regeneration based on tissue engineering conceptions — a 21st century perspective // *Bone Res.* 2013. V. 1. P. 216.
2. **Arnsdorf E. J., Jones L. M., Carter D. R., Jacobs C. R.** The periosteum as a cellular source for functional tissue engineering // *Tissue Engng. Pt A.* 2009. V. 15, N 9. P. 2637–2642.
3. **Oryan A., Kamali A., Moshiri A., Baghaban Eslaminejad M.** Role of mesenchymal stem cells in bone regenerative medicine: What is the evidence? // *Cells Tissues Organs.* 2017. V. 204, N 2. P. 59–83.
4. **Gelinsky M., Bernhardt A., Milan F.** Bioreactors in tissue engineering: Advances in stem cell culture and three-dimensional tissue constructs // *Engng Life Sci.* 2015. V. 15. P. 670–677.
5. **Stolberg S., McCloskey K. E.** Can shear stress direct stem cell fate? // *Biotechnol. Progr.* 2009. V. 25, N 1. P. 10–19.
6. **Larionov P. M., Maslov N. A., Papaeva E. O., et al.** Perfusion properties of scaffolds: A new approach to tissue engineering designs for bone regeneration // *AIP Conf. Proc.* 2017. V. 1882, N 1. 020042.

7. **Ganimedov V. L., Papaeva E. O., Maslov N. A., Larionov P. M.** Mathematical model of a rotational bioreactor for the dynamic cultivation of scaffold-adhered human mesenchymal stem cells for bone regeneration // AIP Conf. Proc. 2017. V. 1882, N 1. 20020.
8. **Haudenschild A. K., Sherlock B. E., Zhou X., et al.** Nondestructive fluorescence lifetime imaging and time-resolved fluorescence spectroscopy detect cartilage matrix depletion and correlate with mechanical properties // Europ. Cells Materials. 2018. V. 36. P. 28–41.
9. **Лакович Дж.** Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 1986.
10. **Lakhotia S., Papoutsakis E. T.** Agitation induced cell injury in microcarrier cultures. Protective effect of viscosity is agitation intensity dependent: Experiments and modeling // Biotechnol. Bioengng. 1992. V. 39, N 1. P. 95–107.
11. **Ganimedov V. L., Papaeva E. O., Maslov N. A., Larionov P. M.** Numerical simulation of fluid flow model of a rotational bioreactor for the dynamic in a rotational bioreactor // AIP Conf. Proc. 2017. V. 1883, N 1. 30006.
12. **Ганимедов В. Л., Цибульская Е. О., Маслов Н. А., Ларионов П. М.** Моделирование течения жидкости в биологическом реакторе ротационного типа // Теплофизика и аэромеханика. 2018. Т. 25, № 2. С. 219–226.
13. **Maslov N. A.** Ultraviolet pulsed laser-induced fluorescence nonlinearity in optically thick organic samples // J. Fluorescence. 2018. V. 28. P. 689–693.
14. **Маслов Н. А., Папаева Е. О.** Статистический анализ матриц возбуждения-эмиссии для метода лазерно-индуцированной флуоресценции // Письма в ЖТФ. 2016. Т. 42, № 14. С. 7–13.
15. **Bancroft G. N., Sikavitsas V. I., van den Dolder J., et al.** Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner // Proc. Nat. Acad. Sci. 2002. V. 99, N 20. P. 12600–12605.
16. **Fujimori E.** Changes induced by ozone and ultraviolet light in type I collagen: Bovine Achilles tendon collagen versus rat tail tendon collagen // Europ. J. Biochem. 1985. V. 152, N 2. P. 299–306.

*Поступила в редакцию 4/VI 2020 г.,  
после доработки — 4/VI 2020 г.  
Принята к публикации 29/VI 2020 г.*

---