

**ИБМХ**



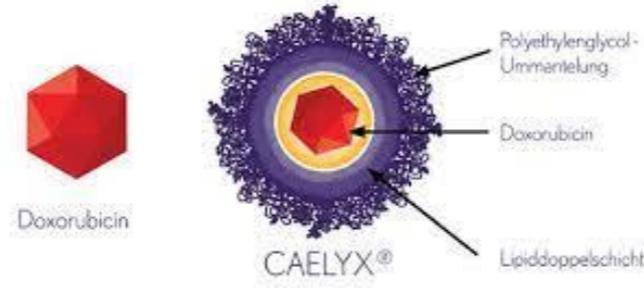
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Орехови

Научный центр мирового уровня  
«Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение»

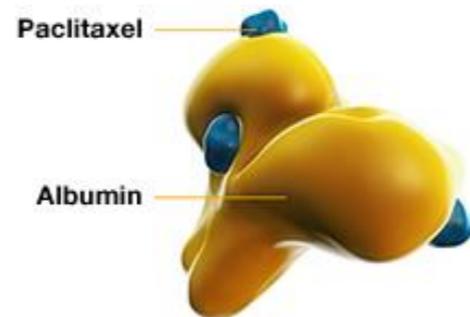
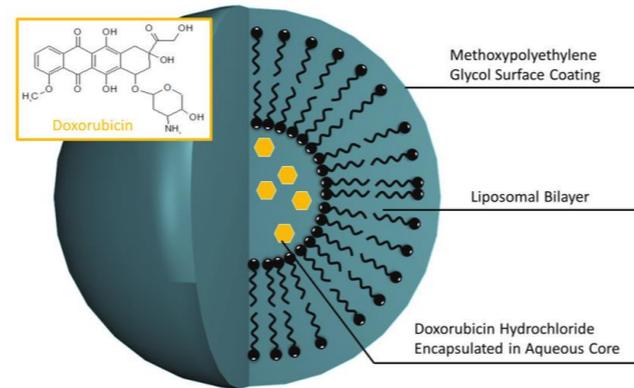
# **Результаты исследований накопления наночастиц в клеточных сфероидах различного состава**

Вахрушев И.В., с.н.с. Лаборатории клеточной биологии

Семинар «Наночастицы в тераностике» 15.11.2023



Важнейшим свойством наночастиц является **селективность** – способность проникать и накапливаться в определенном типе клеток, оказывая незначительное воздействие на окружающую ткань.



**Сфероиды** – трехмерные клеточные агрегаты, при культивировании в составе которых клетки самоорганизуются и образуют межклеточные контакты, а также обмениваются регуляторными сигналами и продуцируют экстрацеллюлярный матрикс.

THE DISSOCIATION AND AGGREGATION OF CELLS FROM  
ORGAN RUDIMENTS OF THE EARLY CHICK EMBRYO

BY A. MOSCONA AND H. MOSCONA\*

*Strangeways Research Laboratory, University of Cambridge*

INTRODUCTION

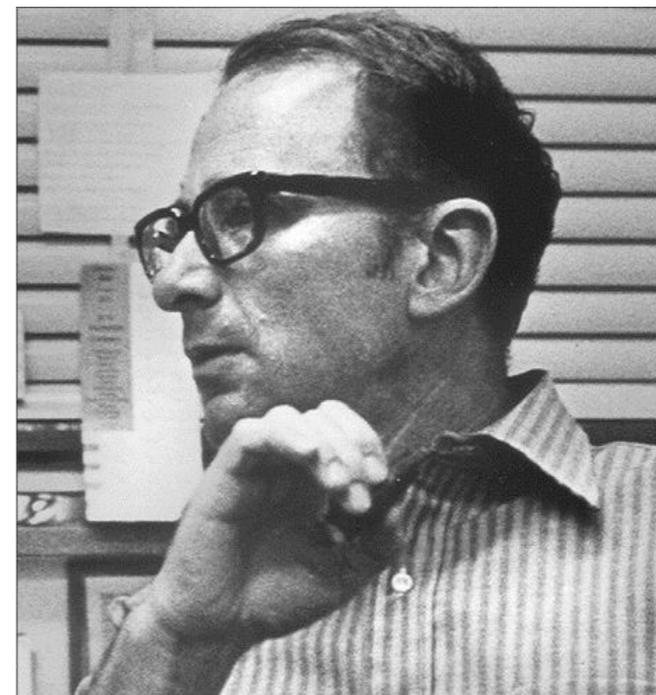
The character and organization of tissues are determined by the spatial arrangement, the mutual relations and the typical groupings of cells which, together with the intercellular material, combine into developmental and functional patterns. To the structure and integrity of these cellular patterns are related the course of the prospective development of embryonic tissues and their characteristics when fully differentiated.

Many attempts have been made to study the capacity of these patterns for regulation and regeneration after their partial or complete destruction. It is well known, for instance, that in certain invertebrates, the tissues can be broken down into isolated cells which are able to reassociate into tissue-like structures; such reorganization of dissociated cells has been reported in sponges (Wilson, 1908; Galtsoff, 1925; and others), and in Coelenterates (DeMorgan & Drew, 1914; Chalkey, 1945). Furthermore, it has been shown that early embryonic amphibian cells also possess this capacity to a remarkable extent (Holtfreter, 1948*a*). In all these instances, however, the individual cells are either able to maintain themselves in isolation for some time as autonomous units (invertebrates), or they are provided with a sufficient amount of nutritive material, in the form of yolk, for a few days' survival in the isolated state (embryonic amphibian cells). With the tissues of warm-blooded animals, the experimental requirements are more exacting, the cells being absolutely dependent on adequate nutritional and thermal conditions.

In another communication (Moscona, A., 1952) it was shown that in the limb rudiments and the mesonephros of early chick embryos, the cellular pattern could be disrupted by the progressive destruction of the intercellular materials by enzymatic digestion. The present study was undertaken to find whether the cells of these disrupted tissues could become reorganized into integrated systems and resume their presumptive histogenetic development.

By partially dissolving the intercellular material, the cells can be loosened and released from their mutual connexions so that their original spatial arrangement is greatly changed, while the continuity of the tissue is still maintained. Observations are reported on the behaviour of such partly disintegrated tissues when cultivated *in vitro*, as compared with the development of normal control explants.

If the intercellular matrix is completely destroyed the tissue can be dissociated into a suspension of discrete, viable cells which, under certain conditions of cultivation *in vitro*, reaggregate into clusters and so re-establish a tissue-like association.



**Aron A. Moscona**  
**1921 - 2009**

J Anat. 1952 Jul; 86(Pt 3): 287–301.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1273752/pdf/janat00473-0067.pdf>

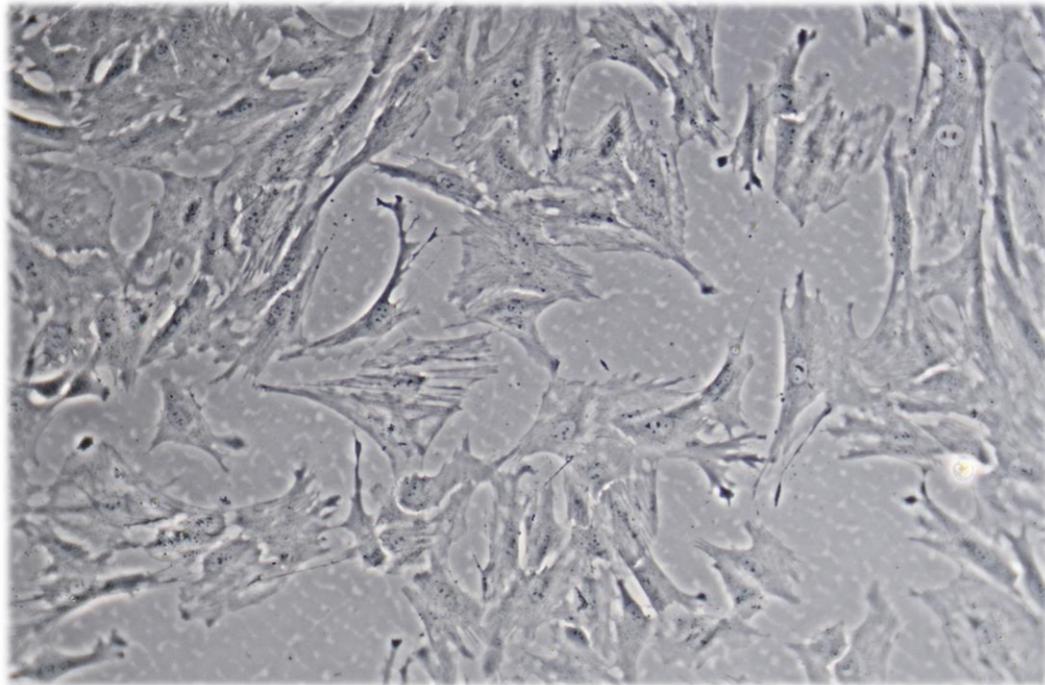
## Цели исследования

- Сравнение способности МСК и эндотелиоцитов к захвату и накоплению наночастиц на основе сополимера молочной и гликолевой кислот в двумерной культуре и в условиях трехмерного сокультивирования
- Оценка возможности применения смешанноклеточных сфероидов из МСК и эндотелиоцитов в качестве *in vitro* модели специфической тропности наночастиц

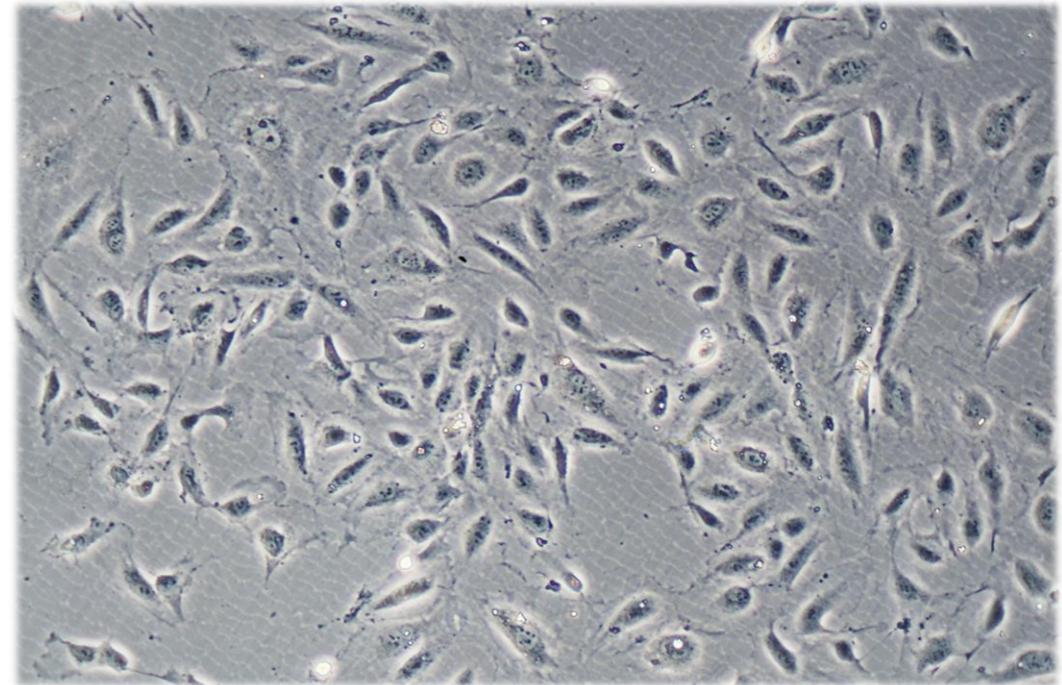
# Использованные наночастицы

- Наночастицы были получены методом «простых эмульсий» на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (50:50), предварительно конъюгированного с флуоресцентным красителем Cy5
- Средний размер составлял 90-100 нм (средний гидродинамический диаметр)
- Отрицательный дзета-потенциал поверхности наночастиц ( $-23,2 \pm 0,6$  мВ) обуславливал коллоидную стабильность нано-суспензии

# Получение первичных культур



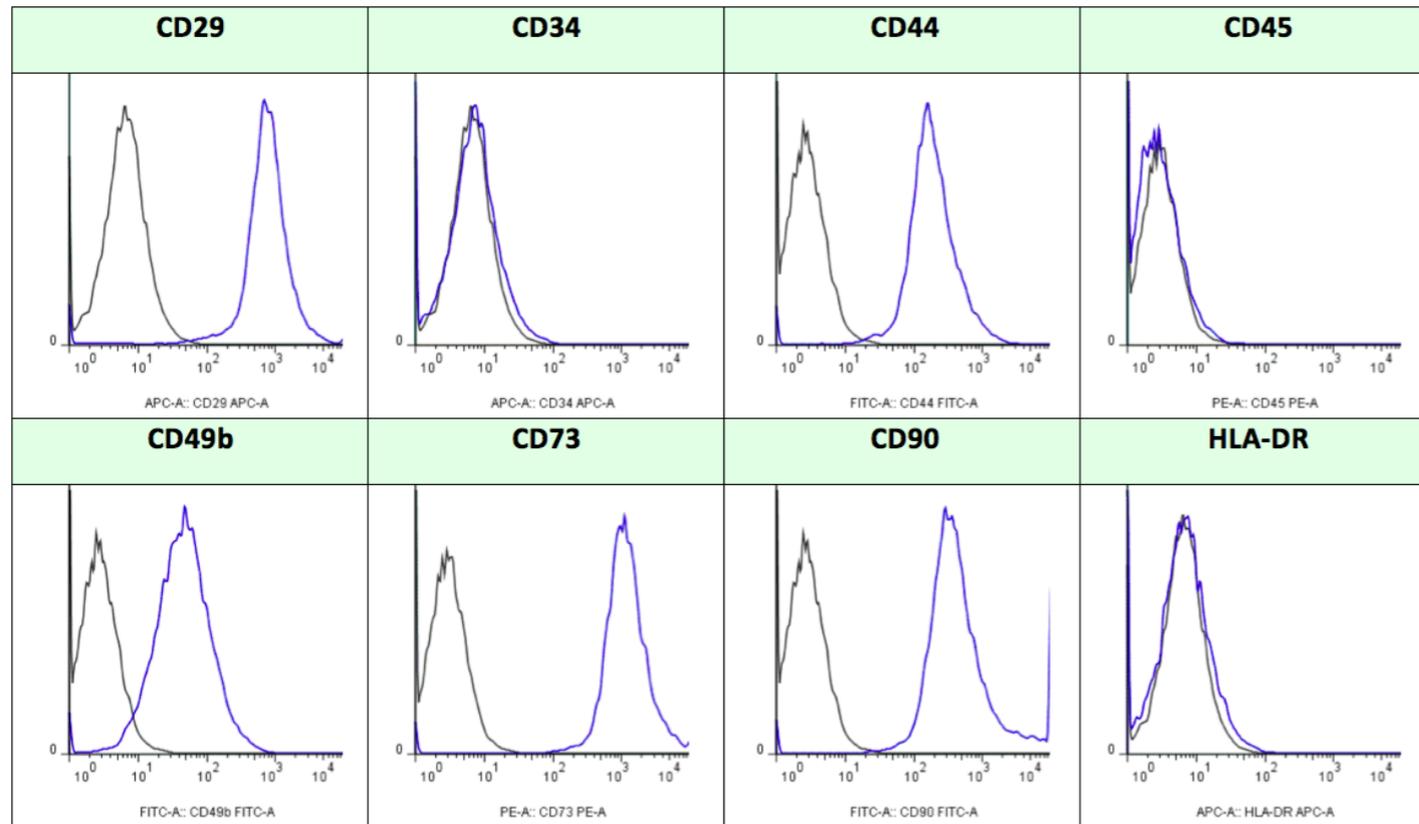
**МСК пуповины (UCSC)**



**Эндотелиоциты (HUVEC)**

Культуры МСК Вартонова студня пуповины, а также эндотелиоцитов пуповинной вены человека.  
Фазово-контрастная микроскопия. Увеличение  $\times 100$ .

# Подтверждение наличия ММСК



## ПРОТОЧНАЯ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЯ

По оси **абсцисс** отложена интенсивность флуоресценции, отражающая уровень экспрессии поверхностного маркера;

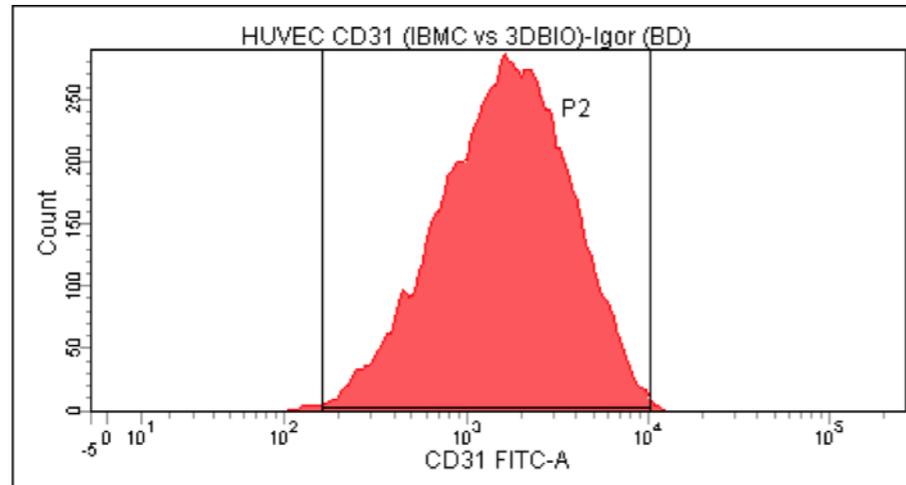
По оси **ординат** отложено количество регистрируемых событий (клеток).

Изотипический контроль обозначен черной линией.

**CD29+ CD34- CD44+ CD45- CD49b+ CD73+ CD90+ HLA-DR-**

Клетки из всех источников продемонстрировали сходный фенотип, соответствующий мультипотентным мезенхимальным стромальным клеткам (по критериями Международного общества клеточной терапии)

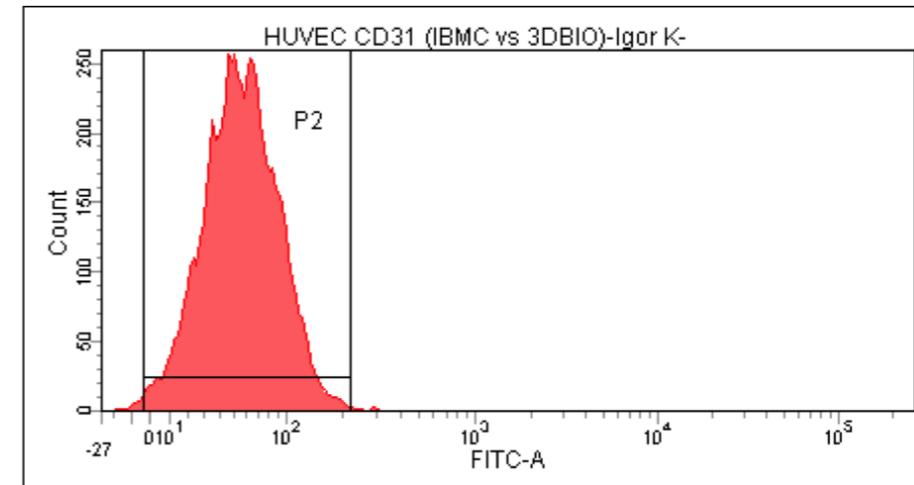
# Экспрессия CD31 в культуре HUVEC



|                  |                            |
|------------------|----------------------------|
| Experiment Name: | HUVEC                      |
| Specimen Name:   | HUVEC CD31 (IBMC vs 3DBIO) |
| Tube Name:       | Igor (BD)                  |
| Record Date:     | Nov 16, 2018 5:53:34 PM    |
| Operator:        | Alex                       |

| Population                             | #Events | %Parent | CD31 FIT... Mean | CD31 FIT... Median | CD31 FIT... %CV |
|--|---------|---------|------------------|--------------------|-----------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> P2 | 14,372  | 99.3    | 2,052            | 1,592              | 78.7            |

**Окрашенные клетки**



|                  |                            |
|------------------|----------------------------|
| Experiment Name: | HUVEC                      |
| Specimen Name:   | HUVEC CD31 (IBMC vs 3DBIO) |
| Tube Name:       | Igor K-                    |
| Record Date:     | Nov 16, 2018 5:39:58 PM    |
| Operator:        | Alex                       |

| Population                             | #Events | %Parent | FITC-A Mean | FITC-A Median | FITC-A %CV |
|--|---------|---------|-------------|---------------|------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> P2 | 7,310   | 98.7    | 58          | 53            | 54.5       |

**Контроль**

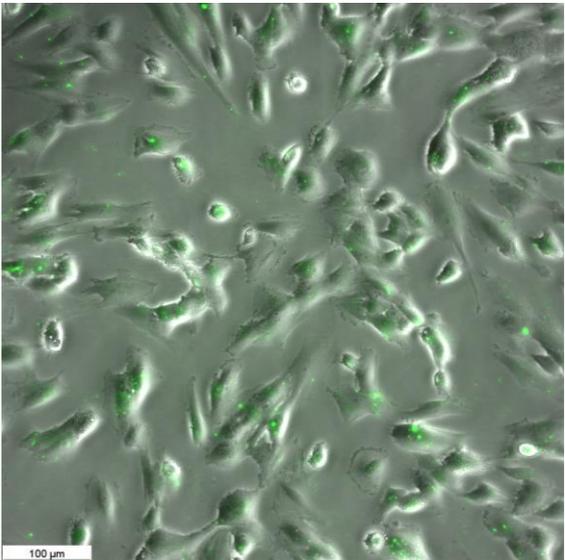
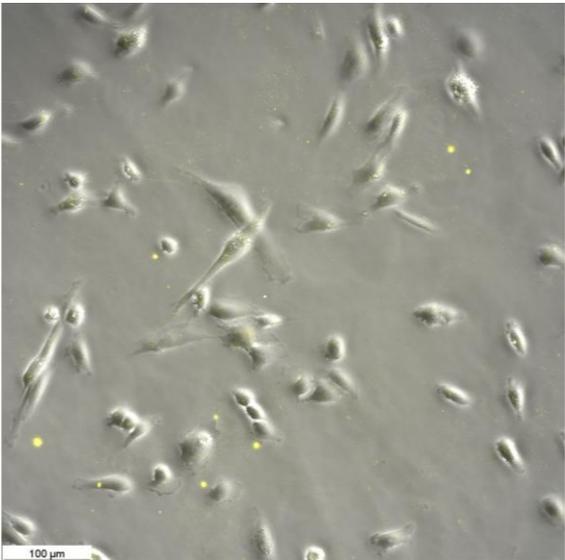
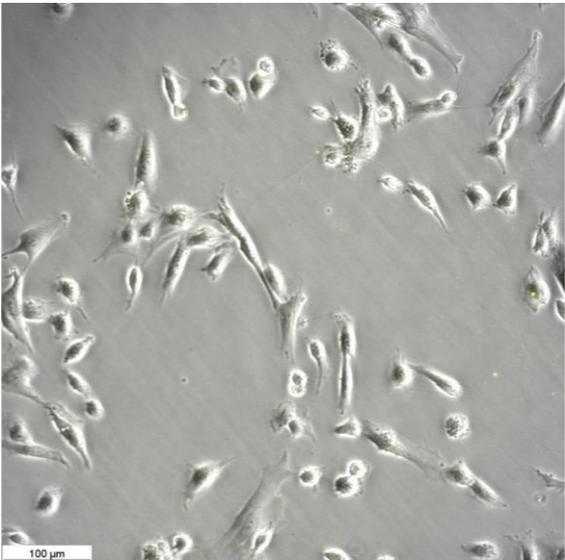
# Накопление наночастиц в 2D культурах

0 часов

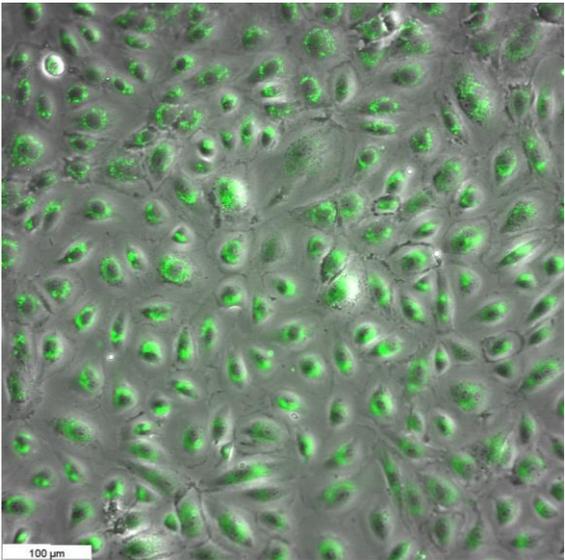
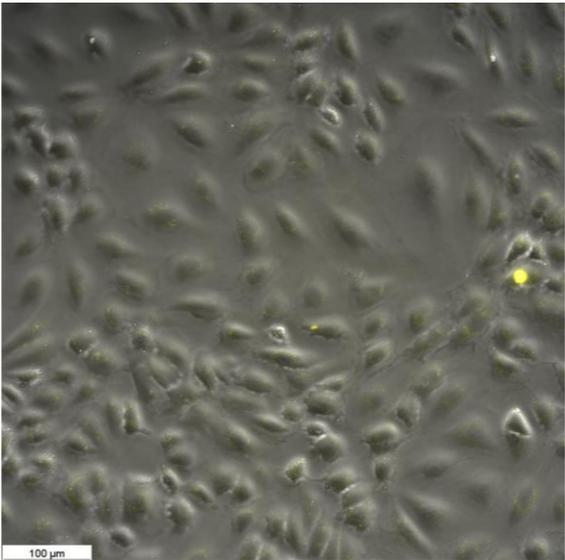
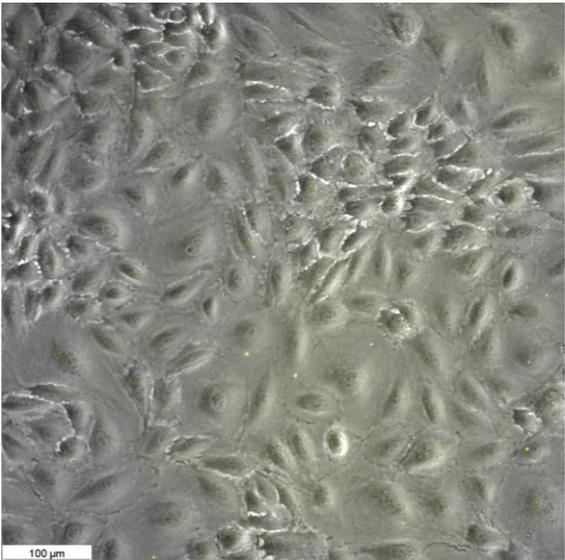
1 час

4 часа

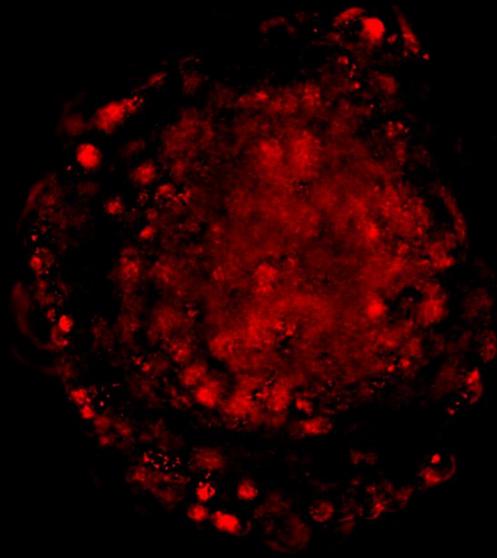
**UCSC**



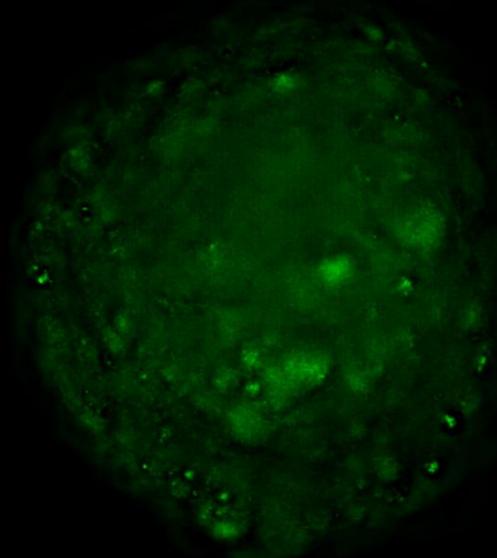
**HUVEC**



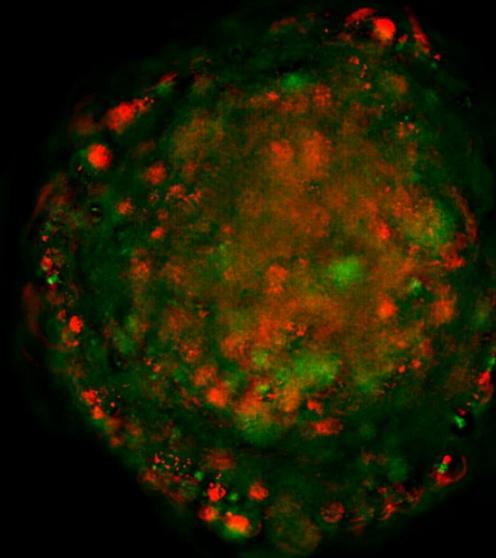
# Получение смешанных сфероидов



100  $\mu\text{m}$



100  $\mu\text{m}$



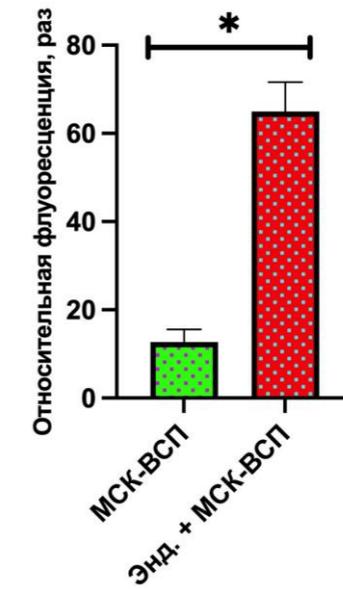
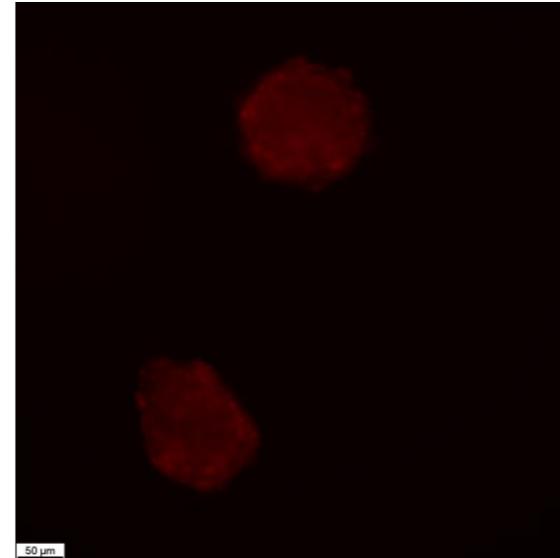
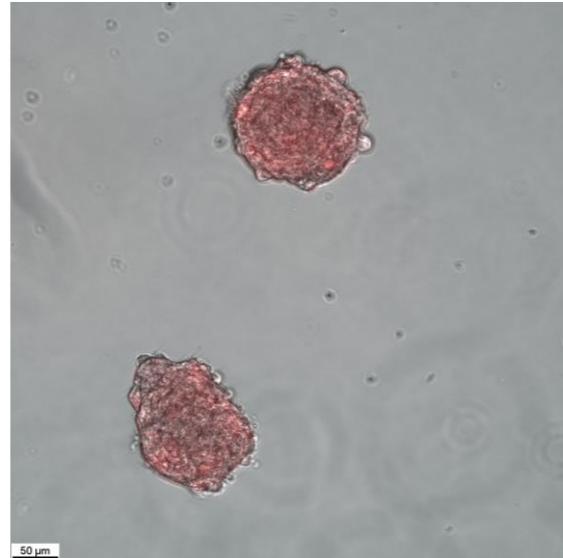
100  $\mu\text{m}$

Сфероиды на основе эндотелиоцитов и МСК,  
прижизненно меченных флуоресцентными  
красителями DiI и PKH-67

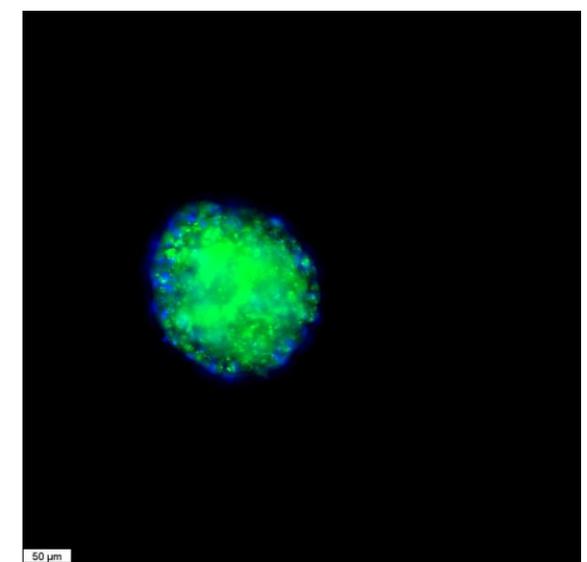
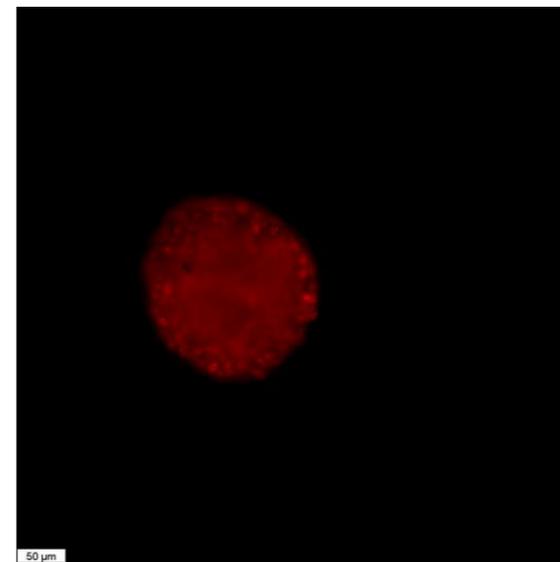
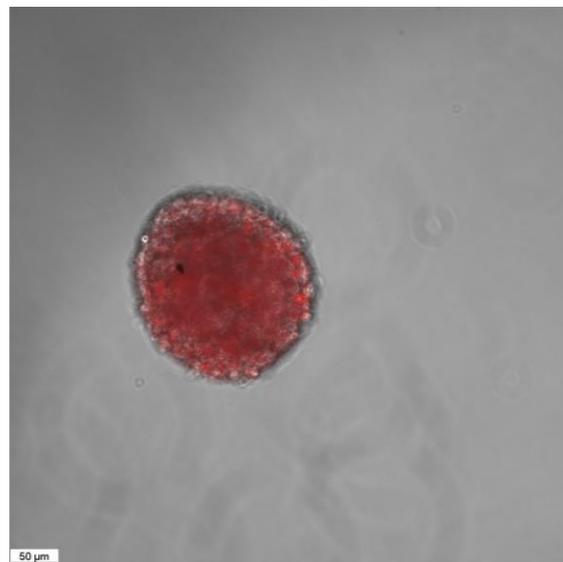
■ Эндотелиоциты (DiI.)  
■ МСК (PKH-67)

# Накопление наночастиц в сфероидах

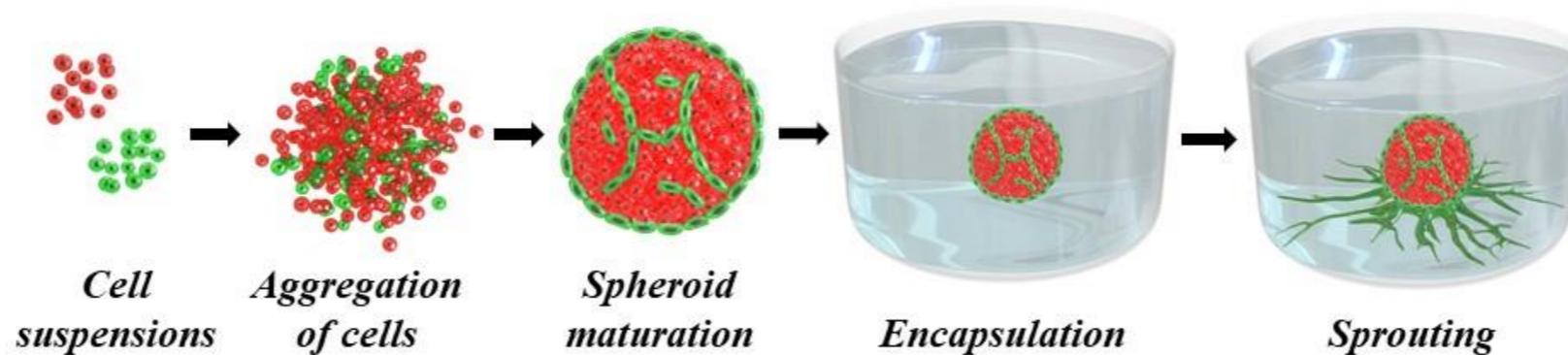
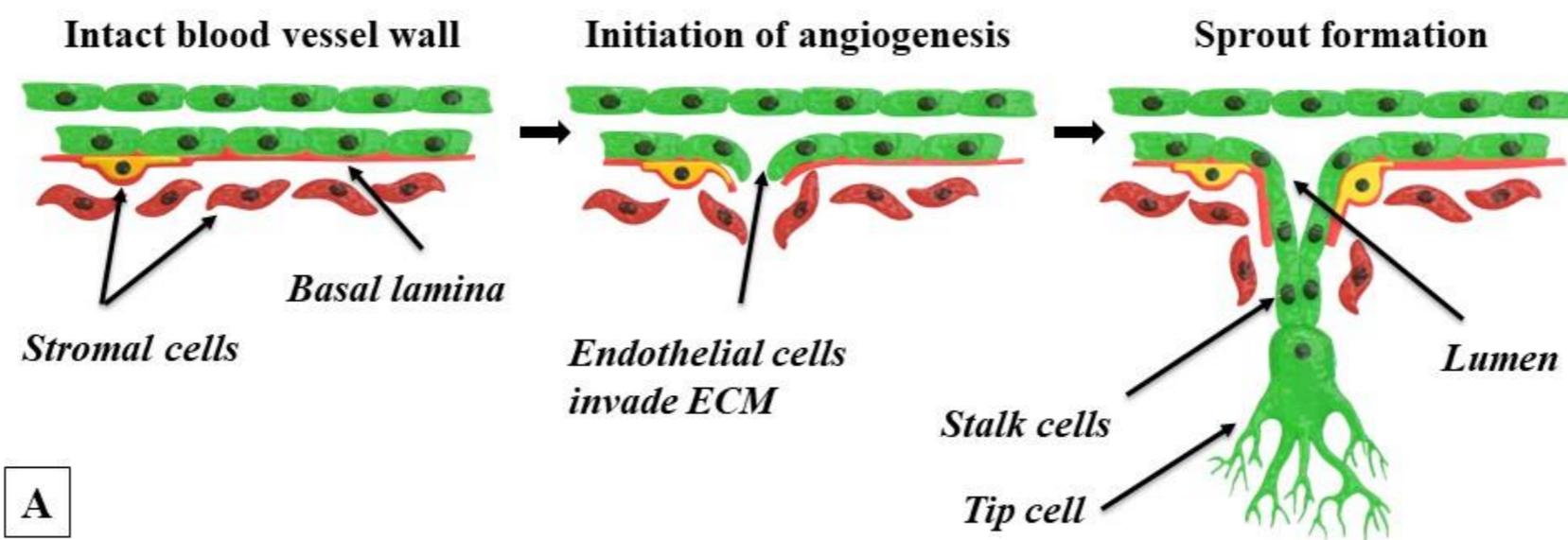
**UCSC**



**HUVEC+  
UCSC**

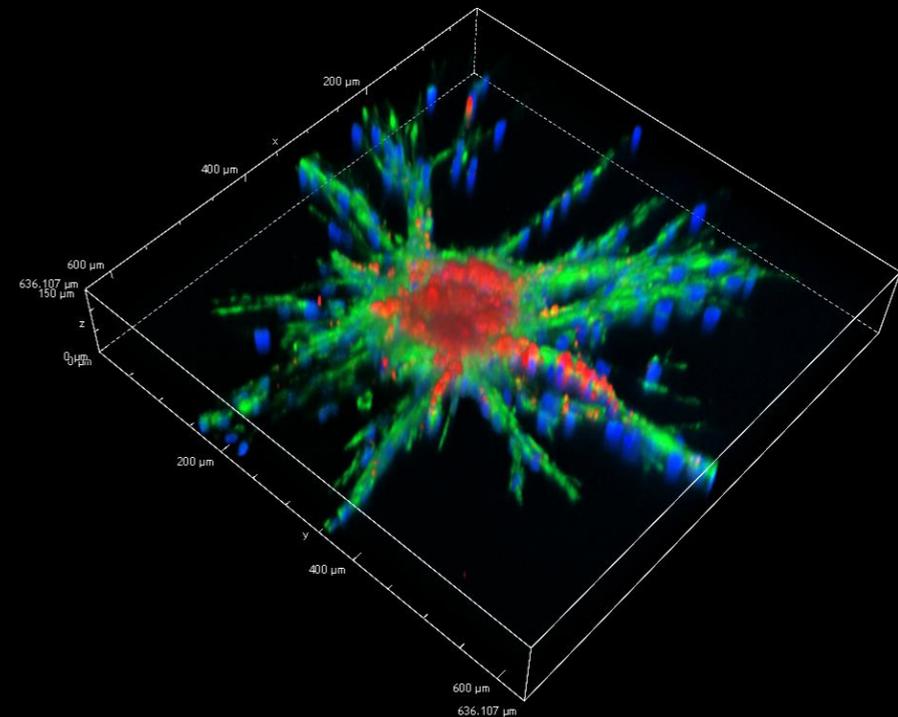
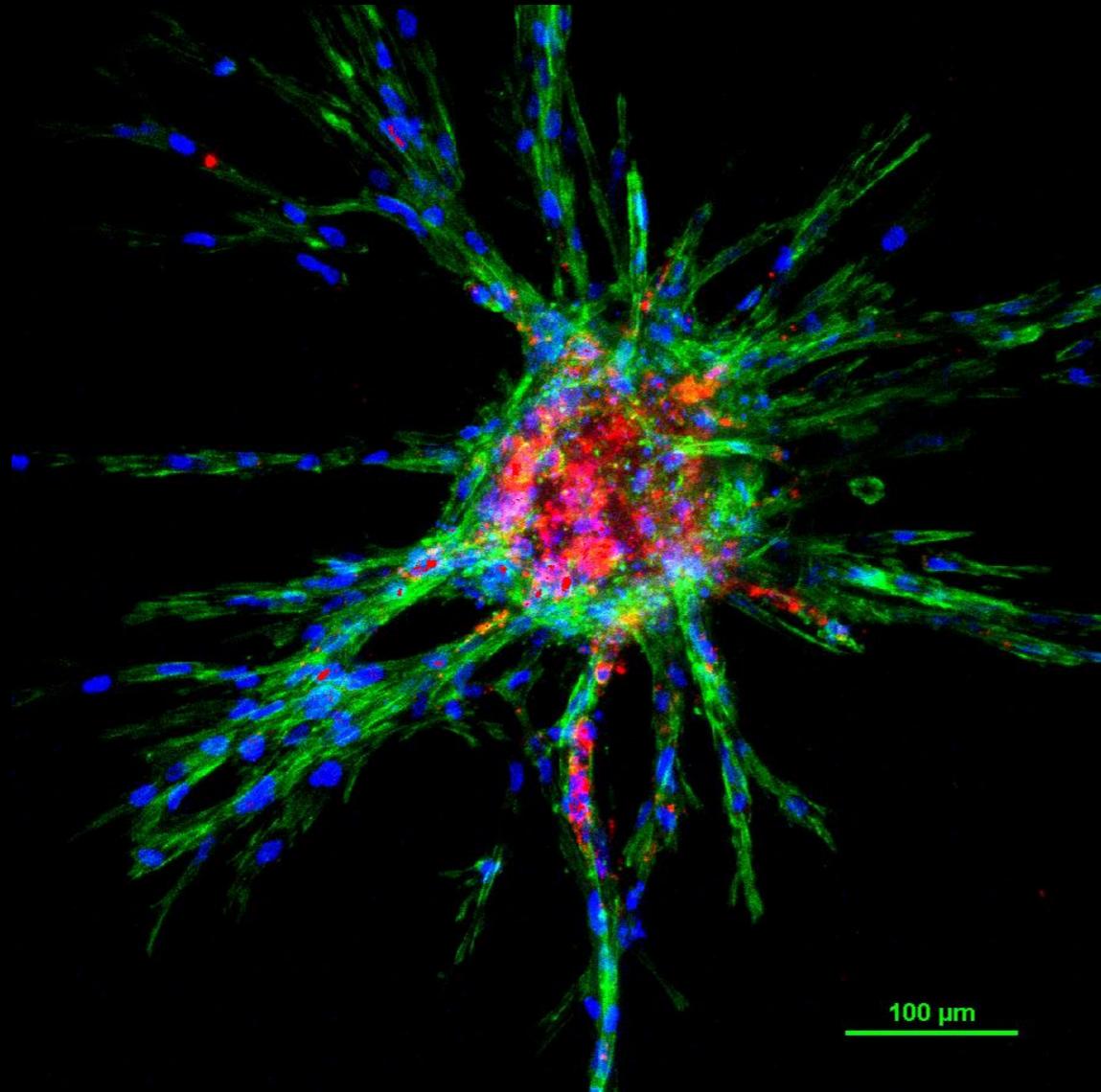


# Моделирование ангиогенеза *in vitro* с применением клеточных сфероидов на основе со-культивируемых эндотелиоцитов и мезенхимальных стромальных клеток



*Vakhrushev et al., 2022*

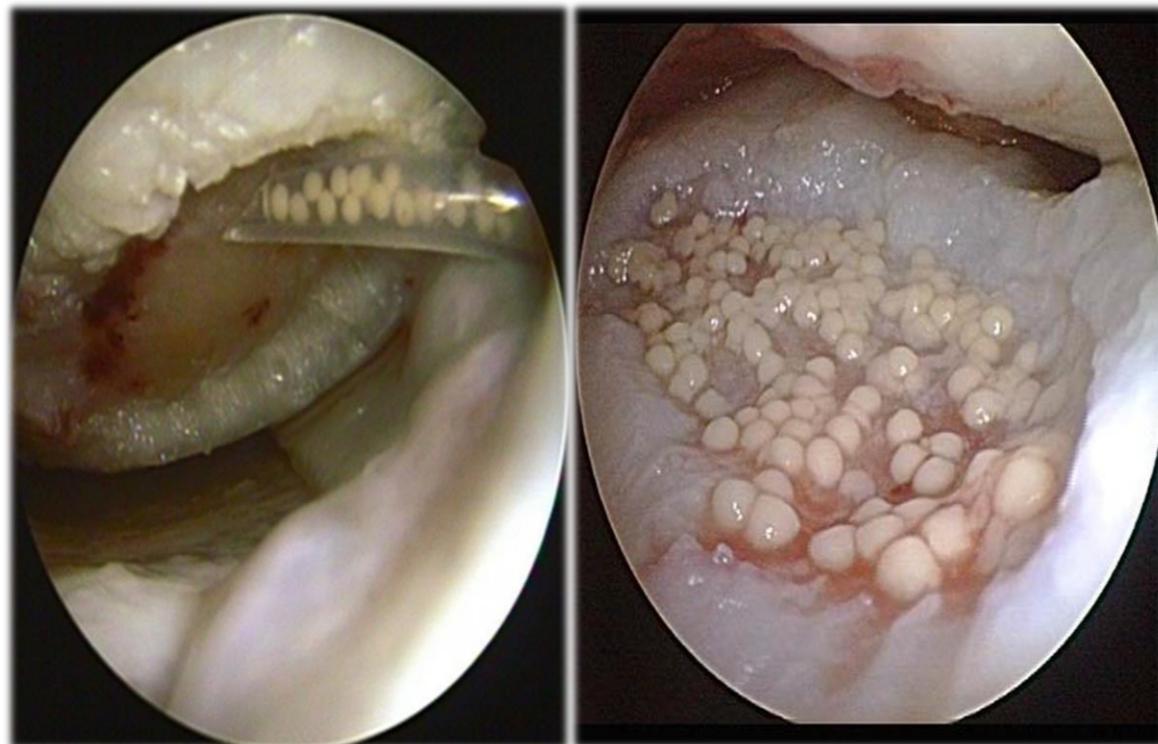
# Формирование сосудистых отростков в 3D условиях



Сфероиды на основе эндотелиоцитов и МСК, культивируемые в трехмерном фибриновом геле.  
Эндотелиоциты прижизненно помечены флуоресцентным красителем DiI.

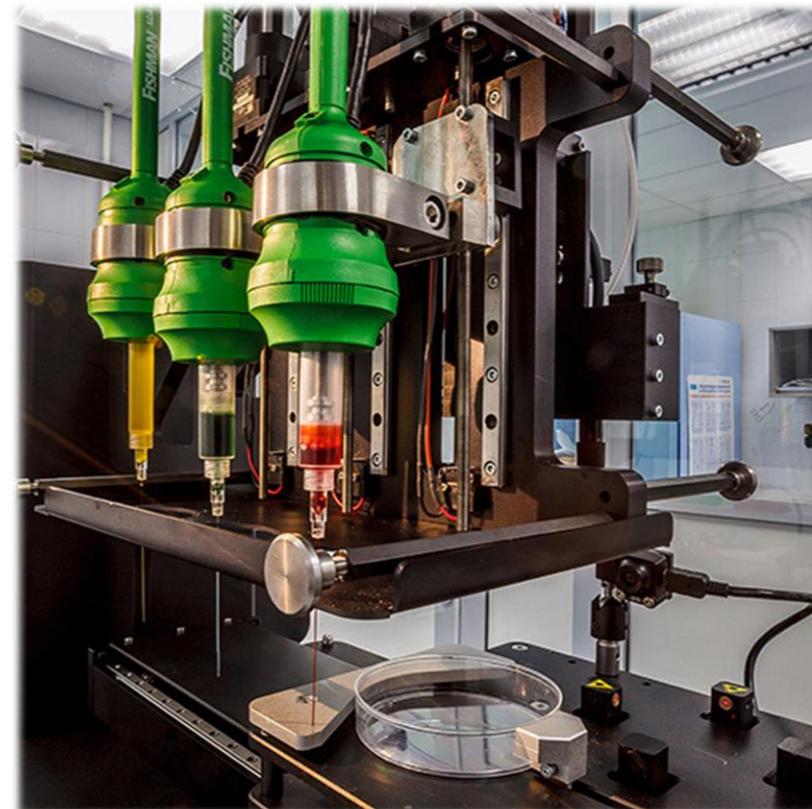
**Спасибо за внимание!**

# Клеточные сфероиды в регенеративной медицине



**Клиническая технология  
восстановления суставного хряща  
(CO.DON, Германия).**

Основана на трансплантации  
сфероидов из аутологичных  
хондроцитов пациента.



**Биопринтер FABION®  
(3D Bioprinting Solutions, Россия).**

В качестве «чернил» для послойной  
печати живых тканей используются  
клеточные сфероиды.