

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА СТЕРИЛИЗАЦИИ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ В АЛЬГИНАТНЫЙ ГЕЛЬ КЛЕТОК КУЛЬТУРЫ MOLT-4

О.И. Кит, С.Ю. Филиппова, А.О. Ситковская, В.В. Позднякова, О.В. Хохлова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России;
Россия, 344000 Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63

Контакты: Светлана Юрьевна Филиппова filsv@yandex.ru

Введение. Инкапсуляция в альгинатный гель широко применяется в биомедицинских исследованиях для защиты клеток от механического воздействия и контакта с иммунной системой реципиента. Применение альгината для пересадки биомедицинских клеточных продуктов человеку налагает высокие требования к стерильности конечного продукта. С целью подбора оптимального протокола инкапсуляции клеток для дальнейшего применения *in vitro* или трансплантации заключенных в альгинатный гель клеток необходимо изучить, как процессы стерилизации влияют на такие характеристики получаемого геля, как способность к поддержанию жизнеспособности и клеточной пролиферации.

Цель исследования — сравнительное изучение влияния ультрафиолетового излучения и автоклавирования на биологические свойства альгинатного геля.

Материалы и методы. Клетки культуры MOLT-4 были заключены в бусины из 1, 2 и 4 % альгината в концентрации $0,75 \times 10^6$ кл./мл. На 8-е сутки культивирования проводилось измерение размера колоний и определение жизнеспособности клеток в автоматическом клеточном счетчике.

Результаты. Площадь колоний для всех вариантов концентрации альгинатного геля оказалась достоверно выше для геля, стерилизованного обработкой ультрафиолетовыми лучами, по сравнению с автоклавированием. Разница в размерах колоний для 2 способов стерилизации альгината оказалась достоверной при принятом уровне значимости для всех вариантов концентраций геля ($\alpha = 0,05$, $df = 198$, $t = 1,972$). При этом в вариантах опыта существенных отличий в количестве жизнеспособных клеток после растворения альгината не отмечено.

Заключение. Стерилизация автоклавированием приводит к подавлению пролиферации заключенных в него клеток и не может быть рекомендована для применения в протоколах подготовки альгинатных капсул с заключенными в них клетками для культивирования *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: автоклавирование, ультрафиолетовое излучение, альгинат, инкапсуляция, MOLT-4

Для цитирования: Кит О.И., Филиппова С.Ю., Ситковская А.О. и др. Влияние способа стерилизации на пролиферацию и жизнеспособность инкапсулированных в альгинатный гель клеток культуры MOLT-4. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(3):46–51.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-3-46-51



INFLUENCE OF THE STERILIZATION METHOD ON THE PROLIFERATION AND VIABILITY OF MOLT-4 CELLS ENCAPSULATED IN ALGINATE GEL

O.I. Kit, S.Yu. Filippova, A.O. Sitkovskaya, V.V. Pozdnyakova, O.V. Khokhlova

National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation;
63 14th Liniya St., Rostov-on-Don, 344000, Russia

Introduction. Alginate gel encapsulation is widely used in biomedical research to protect cells from mechanical stress and contact with the recipient's immune system. The use of alginate for transplanting biomedical cellular products to humans imposes high requirements on the sterility of the final product. To select the optimal protocol for cell encapsulation for further *in vitro* use or transplantation of cells enclosed in an alginate gel, it is necessary to study how sterilization processes affect such characteristics of the obtained gel as the ability to maintain cell viability and proliferation.

The purpose of the study was to compare the effect of ultraviolet radiation and autoclaving on the biological properties of alginate gel.

Materials and methods. MOLT-4 culture cells were encapsulated in 1, 2 and 4 % alginate beads at a concentration of 0.75×10^6 cells/ml. On the eighth day of cultivation, we measured the size of the colonies and determined the viability of the cells in an automatic cell counter.

Results. The colony area for all variants of the concentration of alginate gel was significantly higher for a gel sterilized by UV treatment compared with autoclaving. The difference between the colony sizes for the two methods of alginate sterilization was significant at the accepted level of significance for all variants of gel concentrations ($\alpha = 0.05$, $df = 198$, $t = 1.972$). Moreover, the number of viable cells after dissolution of alginate did not significantly differ between the experimental variants.

Conclusion. Thus, autoclaving sterilization leads to proliferation retardation of encapsulated cells and cannot be recommended for use in protocols for the preparation of alginate capsules with encapsulated cells for *in vitro* and *in vivo* cultivation.

Key words: autoclaving, ultraviolet germicidal irradiation, alginate, encapsulation, MOLT-4

For citation: Kit O.I., Filippova S.Yu., Sitkovskaya A.O. et al. Influence of the sterilization method on the proliferation and viability of MOLT-4 cells encapsulated in alginate gel. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(3): 46–51. (In Russ.).

Введение

Развитие медицины сопровождается ростом потребности в биомедицинских клеточных продуктах — аутологичных или аллогенных клетках человека или животных, замещающих недостающую функцию организма или продуцирующих биологически активные вещества *in situ*. В частности, интенсивные исследования ведутся в области трансплантации клеток островков Лангерганса, секретирующих инсулин, для замещения функции поджелудочной железы при диабете [1, 2] и гепатоцитов для компенсации печеночной недостаточности различной этиологии [3]. Трансплантация биомедицинских клеточных продуктов — перспективное направление в онкологии. Применение модифицированных стволовых клеток, продуцирующих противоопухолевые вещества или трансформирующих пролекарства до активной формы, уже позволило добиться прогресса в борьбе с рядом онкологических заболеваний [4, 5]. Во всех случаях при трансплантации аллогенных клеток остро встает проблема продления жизни пересаженных клеток в организме реципиента. Для решения этой задачи используют заключение клеток в различные матриксы, в которых чужеродные клетки защищены от взаимодействия с иммунной системой при сохранении их нормального функционирования. Одним из наиболее популярных компонентов матрикса для инкапсуляции клеток является альгинат — получаемый из водорослей полисахарид, образующий гель при взаимодействии с двухвалентными ионами. Гель обладает высокой механической и химической стабильностью, из-за отсутствия специфических ферментных систем он медленно разрушается в организме человека. Образованные в альгинатном геле поры имеют достаточный размер для транспорта белковых молекул и обеспечения заключенных в гель клеток питательными веществами и кислородом, но они непроницаемы для клеток иммунной системы [6]. Применение технологии инкапсуляции в альгинат позволило добиться увеличения жизнеспособности модифицированных клеток, вырабатывающих биотерапевтические молекулы, при трансплантации животным-опухоленосителям, а также выраженного эффекта экспери-

ментальной терапии на моделях глиомы [7] и меланомы [8, 9].

Применение альгинатных гелей в культуре клеток и в трансплантации биомедицинских клеточных продуктов налагает высокие требования к стерильности конечного продукта. Основные способы стерилизации альгината, применяемые в лабораторных условиях, — облучение ультрафиолетовым (УФ) светом порошка альгината или автоклавирование готового раствора. Оба эти воздействия приводят к повреждению молекул альгината и росту количества низкомолекулярных фрагментов в его составе, что отражается на вязкости раствора и способности к образованию геля [10]. Тем не менее неизвестно, какой из 2 способов стерилизации альгината более предпочтителен, поскольку до конца не исследовано влияние измененных физических и химических свойств геля на пролиферативную способность клеток, заключенных в гель.

Цель исследования — сравнительное изучение влияния 2 способов стерилизации альгината на пролиферацию и жизнеспособность заключенных в гель клеток Т-лимфобластной лейкемии человека MOLT-4 для подбора оптимальных протоколов для культивирования *in vitro* и трансплантации заключенных в альгинатный гель клеток.

Материалы и методы

Для исследования были подготовлены 8 % растворы альгината натрия (W201502, Sigma-Aldrich, США) в DPBS (Биолот, Россия) в 2 вариантах. В 1-м варианте готовый раствор нестерильного порошка альгината подвергали автоклавированию путем выдерживания при 121 °С и давлении водяного пара 210 кПа в течение 15 мин. Во 2-м варианте раствор приготавливали путем растворения в стерильном буфере DPBS порошка альгината, предварительно стерилизованного воздействием УФ-лучей. Стерилизация альгината проводилась следующим образом: сначала тонкий слой порошка подвергали облучению УФ-лучами в течение 30 мин в стерильном боксе, затем под той же лампой порошок переносили в бутылку.

Клеточные линии и условия культивирования. Клеточная линия Т-лимфобластной лейкемии человека

MOLT-4 была получена из ФГБУН «Институт цитологии РАН». Культивирование клеток проводили на среде RPMI 1640 (Gibco, США) с добавлением 10 % FBS (Биолот, Россия) без антибиотиков. Для эксперимента клетки были отобраны из суспензии, подсчитаны и ресуспендированы в среде культивирования до концентрации $1,5 \times 10^6$ кл/мл. Далее выполняли смешивание полученной клеточной суспензии и предварительно прогретых на водяной бане до 37°C стерилизованного одним из двух исследуемых способов 8 % раствора альгината и стерильного DPBS в необходимых пропорциях для получения рабочих растворов с концентрацией клеток $0,75 \times 10^6$ кл/мл и 1, 2 и 4 % концентрациями альгината. Для получения альгинатных бусин растворы альгината с клетками медленно продавливали при помощи шприца через иглу диаметром 30G в 50 mM раствор CaCl_2 и выдерживали в нем 5 мин при комнатной температуре до отверждения геля. Далее полученные альгинатные бусины дважды отмывали в стерильном DPBS и помещали в среду культивирования. В каждую лунку 12-луночного планшета было помещено всего по 20 бусин. Для каждого варианта опыта было заложено по 6 лунок. Культивирование альгинатных бусин с заключенными клетками MOLT-4 проводили при 37°C и 5,5 % CO_2 . Замену среды культивирования выполняли каждые 2 дня.

Измерения и статистический анализ. На 8-й день культивирования производили фотографирование лунок в проходящем свете для получения репрезентативных серий изображений образующихся колоний MOLT-4. Далее при помощи программы ImageJ на полученных изображениях определяли среднюю площадь колоний. Было проведено измерение площади 100 колоний для каждого варианта опыта. По окончании эксперимента на 8-е сутки культивирования альгинат растворяли путем выдерживания бусин в 60 mM растворе цитрата натрия в течение 10 мин. Высвобожденные таким образом клетки дважды отмывали в среде культивирования, после чего на автоматическом счетчике клеток EVE (NanoEnTek, Южная Корея) определяли их жизнеспособность в 3 технических повторах на лунку, из которых затем вычисляли среднее значение. Сравнение средних значений площади колоний и доли жизнеспособных клеток для всех вариантов опыта проводили с применением t-критерия Стьюдента в программе Statistica.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что оба способа стерилизации альгината эффективны в плане поддержания стерильных условий культивирования клеточных линий. На всем протяжении эксперимента признаков микробной контаминации культур клеток, заключенных в альгинатные бусины, не выявлено, несмотря на отсутствие антибиотиков в среде культивирования.

Деление клеток и образование колоний наблюдались во всех образцах начиная с 3-го дня культивирования. На 8-е сутки культивирования стала заметна разница в форме колоний в образцах с различной концентрацией альгината, которая прослеживалась как в вариантах, стерилизованных автоклавированием, так и в подвергнутых обработке УФ-лучами. В 1 % альгинатном геле колонии были симметричными, имели округлую форму и довольно рыхлую поверхность, на которой можно было различить контуры отдельных клеток (рис. 1а, б). По мере увеличения концентрации альгината колонии MOLT-4 становились более вытянутыми, асимметричными, их поверхность становилась более гладкой. Так, при 2 % концентрации геля колонии чаще имели бобовидную или эллипсовидную форму (рис. 1в, г), а при 4 % концентрации альгината колонии могли иметь дисковидную или сигарообразную форму (рис. 1д, е).

Наблюдаемое изменение формы колоний может быть связано с увеличением плотности геля при возрастании концентрации альгината. При этом клетки испытывают большее механическое сдавливание, которое тем не менее неравномерно по различным направлениям роста колоний, что приводит к преимущественному делению клеток в направлении наименьшей плотности среды и, соответственно, появлению асимметричных колоний.

По результатам измерения площади колоний MOLT-4 можно заключить, что стерилизация готового раствора автоклавированием приводит к значительному уменьшению размера колоний, статистически значимых при всех использованных концентрациях альгината (рис. 2).

Значения критерия Стьюдента при попарном сравнении средних показателей площади колоний, полученных в автоклавированном и облученном УФ альгинате, составили: $t = 6,375$ для 1 % (число степеней свободы $df = 198$), $t = 8,016$ для 2 % ($df = 198$), и $t = 16,248$ для 4 % геля ($df = 198$). Полученные значения критерия превышали критическое значение при уровне значимости $\alpha = 0,05$ и количестве степеней свободы $df = 198$ ($t_{\text{критическое}} = 1,972$). Таким образом, разница между размерами колоний для 2 способов стерилизации альгината оказалась достоверной при всех вариантах концентрации геля. При этом существенных отличий в вариантах опыта в количестве жизнеспособных клеток после растворения альгината не отмечено. При попарном сравнении средних значений доли жизнеспособных клеток, культивированных в автоклавированном и облученном УФ альгинате, значения критерия Стьюдента не превысили критическое значение для уровня значимости $\alpha = 0,05$ и количества степеней свободы $df = 4$ для всех вариантов концентраций геля ($t_{\text{критическое}} = 2,776$) (см. таблицу).

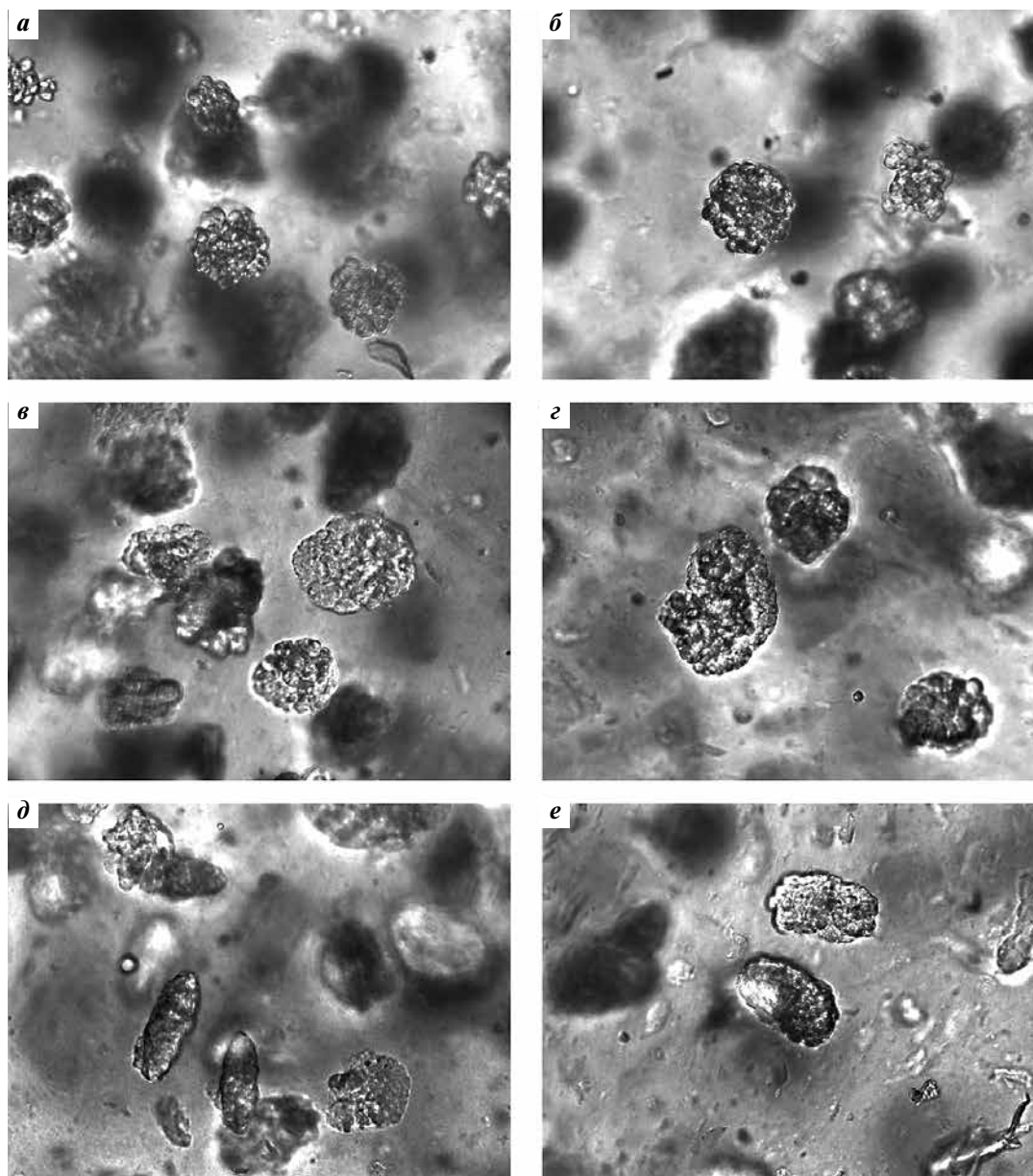


Рис. 1. Форма колоний культуры MOLT-4 в зависимости от способа стерилизации и концентрации альгината: а – 1 % гель, стерилизация автоклавированием; б – 1 % гель, стерилизация УФ-облучением; в – 2 % гель, стерилизация автоклавированием; г – 2 % гель, стерилизация УФ-облучением; д – 4 % гель, стерилизация автоклавированием; е – 4 % гель, стерилизация УФ-облучением. $\times 200$

Fig. 1. The shape of the MOLT-4 culture colonies depending on the sterilization method and the concentration of alginate: а – 1 % gel, sterilization by autoclaving; б – 1 % gel, sterilization by ultraviolet; в – 2 % gel, sterilization by autoclaving; г – 2 % gel, sterilization by ultraviolet; д – 4 % gel, sterilization by autoclaving; е – 4 % gel, sterilization by ultraviolet. $\times 200$

Известно, что как обработка высокими температурами, так и УФ-облучение приводят к частичному разрушению молекул альгината. Причем данное явление оказалось наиболее выраженным именно при автоклавировании готового раствора [10]. В исследовании E. Hodder и соавт. [10] также было показано, что сами по себе продукты разложения альгината не обладают цитостатическим действием при культивировании клеток в присутствии раствора альгината. Однако по результатам нашего исследования можно сделать вывод,

что цитостатическое действие может проявляться при заключении клеток в альгинатный гель. Мы связываем это с возможным уменьшением размера и количества пор в готовом геле, приводящим к замедлению скорости поступления питательных веществ и кислорода к клеткам, что приводит к подавлению клеточной пролиферации. Для проверки данного предположения требуются дополнительные исследования физических свойств альгинатного геля, подвергнутого различным способам стерилизации.

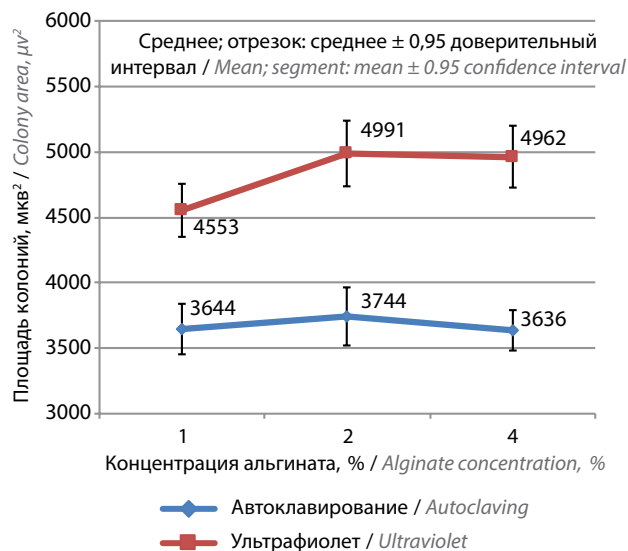


Рис. 2. График средних значений площади колоний MOLT-4 в зависимости от концентраций и способов стерилизации альгината

Fig. 2. A plot of the average area of MOLT-4 colonies versus alginate concentration and sterilization methods

Заключение

Таким образом, стерилизация готового раствора альгината автоклавированием приводит к замедлению роста колоний, образуемых заключенными в него клетками. Поэтому данный способ стерилизации

Таблица 1. Доля жизнеспособных клеток в альгинатных гелях на 8-е сутки культивирования в зависимости от концентраций и способов стерилизации альгината

Table 1. The proportion of viable cells in alginate gels on the eighth day of cultivation, depending on alginate concentrations and sterilization methods

Концентрация альгината, % Alginate concentration, %	Доля жизнеспособных клеток, % Cell viability proportion, %		t**	df***
	Автоклавирование Autoclaving	Ультрафиолет Ultraviolet		
1	91,5 ± 2,6*	90,6 ± 1,4	0,599	4
2	90,8 ± 1,64	93,6 ± 1,6	2,395	4
4	90,6 ± 1,36	92,5 ± 1,3	1,96	4

*Значение доли приведено как среднее значение ± 0,95 доверительный интервал; **значение критерия Стьюдента при сравнении средних значений доли; ***количество степеней свободы

*Proportion is given as mean value, ± 0.95 confidence interval; **Student's criterion when comparing mean proportion value; ***degrees of freedom

в протоколах подготовки альгинатных капсул для культивирования *in vitro* и *in vivo* следует применять с осторожностью, и рекомендуется по возможности заменять автоклавирование на более щадящие процедуры.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Omami M., McGarrigle J.J., Reedy M. et al. Islet microencapsulation: strategies and clinical status in diabetes. *Curr Diab Rep* 2017;17(7):47. DOI: 10.1007/s11892-017-0877-0.
- Espona-Noguera A., Ciriza J., Cañibano-Hernández A. et al. Review of advanced hydrogel-based cell encapsulation systems for insulin delivery in type 1 diabetes mellitus. *Pharmaceutics* 2019;11(11):597. DOI: 10.3390/pharmaceutics11110597.
- Cernigliaro V., Peluso R., Zedda B. et al. Evolving cell-based and cell-free clinical strategies for treating severe human liver diseases. *Cells* 2020;9(2):386. DOI: 10.3390/cells9020386.
- Bhere D., Shah K. Stem Cell-Based Therapies for Cancer. *Adv Cancer Res* 2015;127:159–89. DOI: 10.1016/bs.acr.2015.04.012.
- Mohr A., Zwacka R. The future of mesenchymal stem cell-based therapeutic approaches for cancer – from cells to ghosts. *Cancer Lett* 2018;414:239–49. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.11.025.
- Andersen T., Auk-Emblem P., Dornish M. 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels. *Microarrays (Basel)* 2015;4(2):133–61. DOI: 10.3390/microarrays4020133.
- Read T., Sorensen D.R., Mahesparan R. et al. Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells. *Nat Biotechnol* 2001;19(1):29–34. DOI: 10.1038/83471.
- Teng H., Zhang Y., Wang W. et al. Inhibition of tumor growth in mice by endostatin derived from abdominal transplanted encapsulated cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2007;39(4):278–84. DOI: 10.1111/j.1745-7270.2007.00273.x.
- Zhang Y., Wang W., Xie Y. et al. *In vivo* culture of encapsulated endostatin-secreting Chinese hamster ovary cells for systemic tumor inhibition. *Hum Gene Ther* 2007;18(5):474–81. DOI: 10.1089/hum.2006.166.
- Hodder E., Duin S., Kilian D. et al. Investigating the effect of sterilisation methods on the physical properties and cytocompatibility of methyl cellulose used in combination with alginate for 3D-bioplotting of chondrocytes. *J Mater Sci Mater Med* 2019;30(1):10. DOI: 10.1007/s10856-018-6211-9.

Вклад авторов

О.И. Кит: разработка концепции и дизайна исследования;

С.Ю. Филиппова: экспериментальная работа;

А.О. Ситковская: анализ и интерпретация данных, написание текста статьи;

В.В. Позднякова: научное редактирование;

О.В. Хохлова: техническое редактирование, оформление библиографии, подготовка иллюстраций.

Authors contributions

O.I. Kit: development of the concept and design of the study;

S.Yu. Filippova: experimental work;

A.O. Sitkovskaya: data analysis and interpretation, article writing;

V.V. Pozdnyakova: scientific editing;

O.V. Khokhlova: technical editing, preparation of bibliography and illustrations.

ORCID авторов/ORCID of authors

О.И. Кит/O.I. Kit: <https://orcid.org/0000-0003-3061-6108>

С.Ю. Филиппова/S.Yu. Filippova: <https://orcid.org/0000-0002-4558-5896>

А.О. Ситковская / A.O. Sitkovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-6035-1756>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 21.05.2020. Принята к публикации: 30.06.2020.

Article submitted: 21.05.2020. Accepted for publication: 30.06.2020.