Belagt nanofibernätverk för tredimensionell cellodling av neurala celler

UPPFINNINGENS OMRÅDE

Den aktuella uppfinningen ligger inom det tekniska området för bioteknik, mer specifikt, ligger uppfinningen inom det tekniska området för cellodlingssystem
mer specifikt, ligger uppfinningen inom det tekniska området för neurala cellodlingssystem
mer specifikt, ligger uppfinningen inom det tekniska området för tredimensionella neurala cellodlingssystem
mer specifikt, ligger uppfinningen inom det tekniska området för tredimensionella neurala cellodlingssystem med nanofibernätverk.

UPPFINNINGENS BAKGRUND OCH TIDIGARE KÄND TEKNIK

Många biologiska processer och metaboliska funktioner för enskilda celltyper är särskilt svåra att studera in vivo (i kroppen på naturlig plats) på grund av det enormt stora antalet olika celler som kommunicerar med varandra. Vidare är det ofta i många fall både tekniska och etiska överväganden som inte tillåter att experiment utförs in vivo. Det har därför utvecklats in vitro baserade (utanför kroppen i artificiell miljö) cellodlingssystem som specifikt gör det möjligt att studera enskilda celltyper samt celltyper som är särskilt svåra att studera in vivo, såsom celler som härrör från mänsklig vävnad. De vanligaste cellodlingssystemen använder en tvådimensionell yta såsom plast eller glas för att odla celler på. Detta resulterar i en högst artificiell miljö där cellerna tvingas växa på ett sätt som de aldrig gör inuti kroppen. Det finns ett ökat erkännande av nackdelarna med traditionella in vitro baserade cellodlingssystem, nämligen avsaknaden av ett adekvat bevarande av de biologiska funktioner och den komplexitet som återfinns in vivo. För att en cell skall få korrekta signaler som ger upphov till förökning, differentiering, migration eller programmerad celldöd är de spatiala signalerna och de topologiskt definierade positionerna hos specifika receptorer på cellernas membran, molekyler för vidhäftning eller utsläpp av humorala faktorer essentiella. Dessa signalers vägar för transduktion stimuleras

och influeras av organisationen och strukturen hos cellskelettet vars uppbyggnad består av och definieras av ett brett spektrum av kontakter mellan cell-cell, cell-matrix samt cellskelett-receptorstruktur. Samtliga av dessa faktorer som bestämmer cellens funktion är högst förändrade i konventionella tvådimensionella cellodlingssystem då en ändrad cellform och morfologi hos cellskelettet leder till en avvikande sammansättning hos cellskelettet. Under de senaste åren har forskningen därför blivit alltmer fokuserad på cellodlingssystem som kan efterlikna de tredimensionella miljöerna som återfinns in vivo.

Ett antal olika metoder för att etablera tredimensionella cellodlingssystem har genomförts med huvudsyfte att efterlikna den extracellulära matrixen (ECM) samt konfigurationen och ge strukturell och dimensionell stabilitet till cellerna som odlas. Den senaste forskningen har påvisat ett stort inflytande från och vikten av unika mikro- och nanobaserade miljöer för rumslig organisering av celler i vävnadslika mönster samt för deras signaltransduktion och differentierande funktioner (Mueller-Klieser 1997; Cukierman, Pankov et al. 2001; Walpita and Hay 2002). Bland de mest framgångsrika odlingsmetoderna är gel- och kollagensystem, nanofibernätverk samt porösa nätverk med syfte att främja tredimensionell cellväxt (för överblick se (Lee, Cuddihy et al. 2008)). Dock har samtliga av de plattformar som utvecklats hittills markanta nackdelar såsom aggregering av celler, låg cellöverlevnad samt experimentella begränsningar.

Endast ett fåtal försöka har genomförts för att utveckla funktionella tredimensionella cellodlingssystem genom att använda nanofibernätverk. Dessa nätverk bestå typiskt av en fibrös struktur. Fördelarna med en tredimensionellt fibrös matris är en stor yta gentemot volym och en struktur som liknar den som nätverk av kollagen och elastin uppvisar in vivo. I dagsläget finns dock endast en kommersiellt tillgänglig produkt som erbjuder en tredimensionell plattform bestående av nanofibernätverk (Celltreat™). Dessa fibrer levereras i linjerad form med väldefinierad distribution och utan behandling av fiberytan såsom ytbeläggning med molekyler från extracellulär matrix. Linjerade fiber verkar också tillsynes ge upphov till högst specifika effekter på cellodlingen, främst på migrering och morfologi, vilket icke önskvärt i vår uppfinning.

USA-patentpublikationen US20070269481 beskriver en "biometriskt nätverk" bestående av linjerade nanofibrer med eller utan tvärbunden beläggning

av fibrerna. Dock är linjering något som inte är önskvärt i många cellodlingssystem. Vidare beskriver USA-patentet US20060263417 "Elektrospunna blandningar av naturliga och syntetiska polymerfibrer som nätverk för vävnadsteknik". På liknande sätt beskriver USA-patentet US7704740 "Nanofibrösa strukturer och användningsområden som inkluderar celler och vävnadsodling" tillverkning av slumpartat orienterade elektrospunna nanofiber med syfte att växa celler och odla vävnad.

SAMMANFATTNING AV UPPFINNINGEN

Den aktuella uppfinningen består av ett speciellt belagt elektrospunnet nanofibernätverk som fungerar som en cellodlingsmatris som stöder neural celltillväxt på ett tredimensionellt sätt, vilket leder till att cellmorfologin liknar den verkliga cellmorfologin, och bevarar cellmetabolismen, receptor aktivering och proteinutsöndring på ett sätt som efterliknar det riktiga fallet i hjärnan (in vivo). Nanofibernätverket används som en insättbart cellodlingsplatta och kan storleksanpassas for att fungera i alla typer av cellodlingssystem. Vår forskning som utförts med detta tredimensionella cellodlingssystem visar att det fungerar mycket väl för neurala cellodlingar och ger oväntade resultat gällande morfologi, tillväxt och metabolism för olika celltyper.

En aspekt av uppfinningen erbjuder ett slumpartat orienterat nanofibernätverk som är belagt med bioaktiva molekyler som tillåter tredimensionell neural cellväxt under odling. I en annan aspekt av uppfinningen består nätverket av nanofibrer belagda med platina och/eller guld under beläggningen av bioaktiva molekyler som tillåter mätningen av ledningsförmågan och resistansen hos neurala celler växta i nätverket. Den föredragna typen av fibrer har en medeldiameter som är större än 1000 nm, helst 1200 nm med en standard avvikelse på +/-300 nm då detta ger optimal funktion i neural cellväxt. Andra förkroppsligande av uppfinningen beskrivs i följande paragrafer:

Ett biokompatibelt nätverk för tredimensionell cellodling i cellkultur bestående av en eller flera nanofiber med slumpartad orientering i form av ett nätverk med öppna ytor för odlade celler; och en bioaktiv beläggning på en eller flera nanofiber. I detta förkroppsligande fästes eller placeras nätverket på en yta hos ett substrat, vari substratet består av en glas- eller plastyta.

Ett nanofibernätverk som beskrivet ovan vari substratet är en glas- eller plastskiva, täckglas eller disk.

I ett förkroppsligande av uppfinningen består nanofibrerna av elektrospunna biokompatibla polyeterbaserade polyuretanfibrer, med en diameter i området mellan 1000-3000nm. Företrädesvis för växt av neurala cellodlingar och med nanofibrer av diameter i området mellan 1000-1800 nm. Den mest föredragna diametern av elektrospunna nanofibrer är cirka 1200 nm med en standard avvikelse av +/-300nm.

Vidare har nanofibernätverket en porositet (dvs. förhållande mellan luft och fiber i en volym i ett nätverk) på 60-75% och 75-85%, företrädesvis 65- 75%, eftersom en porositet under 60% inte tillåter tillräckligt utrymme för neurala celler att integreras med nätverket.

I ett annat förkroppsligande består nätverket av elektrospunna polymer fibrer, där materialet är av en polymer såsom Poly-styren (PS), Poly-akrylo-nitril (PAN), Poly-karbonat (PC), poly-vinyl-pyrrolidon (PVP), poly-butadien, Poly-vinyl-butyral (PVB), Poly-vinyl-klorid (PVC), Poly-vinyl-metyl-eter (PVME), poly-laktisk-co-glykolsyra (PLGA), poly(l-laktisk syra), poly-ester, poly-kaprolakton (PCL), poly-etylen-oxid (PEO), poly-anilin (PANI), poly- flourener, poly-pyrroler (PPY), poly-etylen-dioxytiofen (PEDOT), eller företrädesvis polyuretan (PU).

Ett biokompatibel elektrospunnet nanofibernätverk, vari den bioaktiva beläggningen består utav minst en bioaktiv molekyl utvald från kollagen I, poly-D-lysin, poly-L-ornithine och laminin.

I ett annat förkroppsligande integreras de bioaktiva molekylerna in i de elektrospunna polyeterbaserade polyuretanfibrerna under tillverkning. Detta uppnås genom att tillsätta de bioaktiva molekylerna till polymerlösningen som elektrospinns.

I ett annat förkroppsligande parallell-elektrospinns de bioaktiva molekylerna med polymerfibrerna för att uppnå förbindning mellan de bioaktiva molekylerna och ytan på nanofibrerna som utgör nanofibernätverket.

En annan aspekt av uppfinningen är en struktur av nanofibernätverk med en vertikal tjocklek på 200-100 µm, 100-50 µm, företrädesvis en vertikal tjocklek på cirka 50 µm eller mindre.

Den aktuella uppfinningen är också inriktad mot att mäta elektrisk

ledningsförmåga hos celler och därför innefattar ett annat förkroppsligande ett elektriskt ledande material placerat mellan polymernanofibrerna och den biokompatibla beläggningen såsom en sputter-deponerad beläggning av titan, platina eller guld.

I ett annat förkroppsligande av uppfinningen innefattas ett nanofibernätverk vari nätverket består av en blandning mellan slumpartat och linjerade nanofibrer. De linjerade fibrerna som finns bland de slumpartat orienterade fibrerna är belagda med elektriskt ledande material.

Vidare, i ett annat förkroppsligande, plasmabehandlas det elektrospunna nanofibernätverket vilket leder till en förändring i fibrernas ytegenskaper innan de beläggs med bioaktiva molekyler.

En cellodlingsapparatur bestående av: en behållare att hålla celler och cellodlingsmedium samt ett nanofibernätverk enligt någon av de ovan nämnda förkroppsliganden inuti behållaren. Cellodlingsapparaturen kan, men är ej begränsad till, en testtub, en cellodlingsplatta såsom petriskål ~~dish~~ eller platta med multipla brunnar.

Nanofibernätverken används för att odla neurala celler såsom astrocyter, neuroner, oligodendrocyter och Schwannceller eller en kombination av dessa.

En cellodlingsmetod innefattande att celler sås ut på något av ovannämnda nätverken och inkuberas med cell media; inkubering av den resulterande tredimensionella odlingen under förhållande som är lämpliga för cellvidhäftning till nätverket samt växt av cellerna vid 37°C i en fuktig atmosfär innehållande 5% CO_2.

I ett annat förkroppsligande är uppfinningen riktad mot ett system för ~~drog- och~~ läkemedelsscreening där neurala celler växes på ett av de ovannämnda nätverken och som efter infästning av cellerna till nanofibernätverket samt vilofas behandlas med ett läkemedel som appliceras till odlingsmediet.

I ett annat förkroppsligande undersöks olika läkemedelsbehandlingar, som nämnts ovan, med hjälp av standard immunocytokemitester (för metod se ex. "Immunocytochemsitry-A practical approach", Oxford University press, 1993, ISBN 0-19-963271-7).

Vidare kan effekterna från läkemedelbehandlingarna, enligt tidigare beskrivning, undersökas med standardtester av proteiner, såsom Western blot

tester för att bestämma förändringar i proteinnivåer, efter behandling hos astrocyter växta i 3d (för Western blot metoder se: Protein Blotting Guide, A Guide to Transfer and Detection, Third Edition, BIO-RAD homepage).

KORT BESKRIVNING AV ILLUSTRATIONER

Fig. 1 är perspektivbilder på astrocyter växta på en standard två-dimensionell plastyta (Fig. 1a) jämfört med tredimensionellt växta astrocyter odlade på ett belagt polyuretannanofibernätverk från den aktuella uppfinningen (Fig. 1b).

Fig. 2 är perspektivbilder på cellskelettet hos astrocyter växta på en standard två-dimensionell plastyta (Fig. 2a) jämfört med tredimensionellt växta astrocyter odlade på obelagt (Fig. 2b) samt belagt (Fig. 2c) polyuretannanofibernätverk från den aktuella uppfinningen.

Fig. 3 är datorsammansatta modeller av representativa astrocyter växta på en standard två-dimensionell plastyta (Fig. 3a) jämfört med tredimensionellt växta astrocyter odlade på ett belagt polyuretannanofibernätverk från den aktuella uppfinningen (Fig. 3b).

Fig. 4 är perspektivbilder på cellskelettet hos astrocyter när de växes i standard tvådimensionella odlingar (Fig. 4a), på belagda polyuretannanofibernätverk från den aktuella uppfinningen (Fig. 4b) samt på belagda nanofibernätverk där fiberdiametern på nanofibrerna är mindre än hälften hos diametern på fibrerna i den aktuella uppfinningen (Fig. 4c).

Fig. 5 är perspektivbild på en cirkulär ringstruktur som håller nanofibernätverket på plats. Fig. 5a är bild ovanifrån på en ringstruktur medan Fig. 5b och Fig. 5c visar bilder ur sidperspektiv på en (Fig. 5b) eller två (Fig. 5c) cirkulära ringstrukturer som håller nanofibernätverket på plats.

DETALJERAD BESKRIVNING AV UPPFINNINGEN

I. Definitioner

Termen “nanofiber”, som används här, refererar till en tunn fiber tillverkad av en icke-cytotoxisk polymer som kan bestå i, men inte är begränsad till, polyuretanfibrer.

Termen ”biokompatibel fiber” refererar till nanofibrer som beskrivs i denna

uppfinning, vilka består av material som är icke-cytotoxiskt.

Termen "belagda nanofibernätverk för tredimensionell neural cellodling" som används i denna uppfinning refererar till en struktur bestående av en eller flera slumpartat orienterade nanofibrer, belagda med bioaktiva molekyler, som beskrivs under patentkrav, vilket skapar en miljö för växt av neurala celltyper på ett tredimensionellt sätt. I en del förkroppsliganden av uppfinningen deponeras nanofibernätverket på en yta på ett substrat. Linjering, topografin hos nanofibernätverket tillsammans med beläggningen konstrueras för att tillåta en cellodlingsmiljö som tillåter tredimensionell växt av neurala celler i ett eller multidimensionella lager. De belagda nanofibernätverken kan användas för att växa en eller flera neurala celltyper tillsammans simultant.

I ett förkroppsligande av uppfinningen refererar "nanofibrer" till polyeterbaserade polyuretanfibrer och kolfibrer inklusive, men inte begränsat till, beläggning av fibrerna med titan, guld, platina, titan plus guld eller platina plus guld. I ett annat förkroppsligande av uppfinningen plasmabehandlas nanofibrerna innan de beläggs med metaller och/eller bioaktiva molekyler.

Termen "belagda nanofiber" refererar till nanofiber beskrivna enligt ovan belagda med poly-L-ornitin+laminin eller poly-D-lysin.

Termen "substrat" som används här refererar till godtycklig yta såsom, men ej begränsad till, plast eller glas på vilken nanofibrerna och nanofibernätverken deponeras.

Termen "bioaktiv molekyl" refererar till poly-D-lysin, laminin, poly-L- ornitin och deras funktionella peptidgrupper.

Termen "storleksanpassas" som används refererar till tillverkning till storlek och dimension för insättning i en cellodlingsbehållare, t.ex. beskärning till en disk som kan placeras i en standard 24 brunnars odlingsplatta.

II. Ritningar

För att återge uppfinningen i mer detalj, ses i Fig. 1a en standard tvådimensionell odling av astrocyter på en plan plastyta. Astrocyterna har en tillplattad och utspridd morfologi. I Fig. 1b visas två astrocyter som har växt på poly-L-ornitin+laminin-belagda elektrospunna polyuretannanofibernätverk på ett glassubstrat. Dessa astrocyter uppvisar typisk in vivo morfologi.

I Fig. 2a visas cellskelettet hos astrocyter växta på plana tvådimensionella plastytor. Astrocyterna förefaller platta och jämnt utspridda. I Fig. 2b visas samma odling av astrocyter som blivit växta på obelagda polyuretannanofiber, vilket resulterar i en förlust av livskraftiga astrocyter, liten utväxt av cellskelettet och låg cellvidhäftning.

Fig. 2c visar astrocyter växta på poly-L-ornitin+laminin-belagda elektrospunna polyuretannanofibernätverk. Astrocyterna har komplexa strukturer, god vidhäftning och en tredimensionell morfologi.

I Fig. 3 visas datorsammansatta modeller av morfologin hos astrocyter växta i en standard tvådimensionell odling (Fig. 3a) jämfört med astrocyter växta på poly-L-ornithine+laminin-belagda elektrospunna polyuretan nanofibernätverk (Fig. 3b).

Fig. 4 demonstrerar vikten av korrekt nanofiberdiameter för riktig tredimensionell tillväxt hos astrocyterna. I Fig. 4a växes astrocyter på en standard tvådimensionell plastyta med cellmorfologier som förefaller platta och utspridda. Fig. 4b visar astrocyter växta på fiberdiameter som beskrivs i denna uppfinning där astrocyterna omhöljer fibrerna och påvisar en tredimensionell morfologi. I Fig. 4c växes astrocyter på smalare nanofibrer (approximativt 450 nm diameter) vilket demonstrerar en morfologi som liknar den som uppnås av astrocyter på tvådimensionella odlingar.

I Fig. 5 visas perspektivbilder på ringstrukturerna som håller nätverken på plats i en cellodlingsbehållare. I Fig. 5a visas en toppvy på strukturen. Nanofibernätverket vilar under ringstrukturen på en jämn yta såsom botten av en petriskål. I Fig. 5b ges en sidovy på ringstrukturen ovanpå nanofibernätverket. Fig 5c visas en alternativ immobiliseringsmetod för nanofibernätverket där två ringstrukturer fixerar nanofibernätverket för att hålla det på plats.

III. Sätt att implementera uppfinningen

I ett förkroppsligande av uppfinningen består nanofibrerna av elektrospunnen biokompatibel polyeterbaseradepolyuretanfibrer med en diameter i området 1000-3000nm. Företrädesvis för växt av neurala cellodlingar används nanofiber med en diameter i området 1000-1800nm. Det mest föredragna är en fiberdiameter på cirka 1200nm med en standardavvikelse på

+/-300 nm. Lösningar för elektrospinningen bereds genom att mixa 11 vikt% biokompatibla polyeterbaserad polyuretanharts i en 60:40 blandning av tetrahydrofuran (THF) och n,n-dimetylformamid (DMF) (NaCl kan tillsättas för att öka lösningens ledningsförmåga för att möjliggöra elektrospinning av tunnare fibrer). Lösningen mixas med magnetomrörare i 24 timmar och överförs sedan till en spruta med metallkanyl för elektrospinning. Elektrospinningens processparametrar är: en matningshastighet på 2ml/timme, en positiv spänning på 18 kV, en 21 G metallkanyl och ett avstånd på 18 cm från kanylens mynning till kollektorn. Nanofibrer som tillverkas under dessa förhållanden erhåller en medeldiameter på cirka 1200 nm. Fibrerna ansamlas på en bärare såsom täckglas fästa på aluminiumfolie som svepts över ett jordat, ~~och~~ roterande transportband.

För att spinna nanofiber med en betydligt mindre fiberdiameter än 1200nm, ex. 450nm är proceduren enligt följande: Lösningarna som elektrospinns bereds genom att mixa 9 vikt% biokompatibla polyeterbaserad polyuretan harts i en 60:40 blandning av THF och DMF samt 0,45 % av NaCl. Lösningen mixas med magnetiskomrörare i 24 timmar och överförs till en spruta med metallkanyl för elektrospinning. Elektrospinningens processparametrar är: en matningshastighet på 2ml/timme, en positiv spänning på 18 kV, en 27 G metallkanyl och ett avstånd på 18 cm från mynningen till kollektorn.

För att spinna nanofiber med en betydligt tjockare fiberdiameter än 1200nm, i praktiken 2300 nm används följande procedur: Lösningarna som elektrospinns bereds genom att mixa 13 vikt% biokompatibla polyeterbaserad polyuretanharts i en 60:40 blandning av THF och DMF. Lösningen mixas med magnetiskomrörare i 24 timmar och överförs till en spruta med metallkanyl för elektrospinning. Elektrospinningens processparametrar är: en matningshastighet på 2ml/timme, en positiv spänning på 18 kV, en 19 G metallkanyl och ett avstånd på 18 cm från mynningen till kollektorn.

Fiberdiameter kan justeras genom, men är inte begränsad av, att ändra elektrospinningsparametrar såsom spänning, avstånd mellan kollektor och mål, matningshastighet på lösning, nåldiameter, omgivningens tillstånd såsom luftfuktighet, temperatur och lösningsparametrar såsom koncentration, ledningsförmåga, lösningsmedelsförhållande samt val av lösningsmedel.

I ett förkroppsligande av uppfinningen är porositeten hos nanofibernätverket, dvs. ration mellan luft och fibermaterial i nätverket, från 60-85% med en föredragen porositet av 65-75%. Nanofibernätverkets porositet är oundvikligen länkat till nanofibrernas diameter. Ändringar i tillverkningsprocessen av nanofibrerna som beskrivits ovan påverkar således automatisk nätverkets porositet.

Fibrerna kan spinnas på ett substrat för att användas som cellodlingsplattor för insättning. Nanofibernätverken är belagda med en blandning av bioaktiva molekyler för att skapa en miljö som är gynnsam för neurala celler.

För att belägga nanofibrerna med bioaktiva molekyler steriliseras dessa med 70% etanol, tvättas i ddH_2O efterföljt med inkuberingssteg enligt något av följande:

1. Poly-L-Ornitin: (10μg/ml i ddH_2O med 285 μl/cm^2 yta) i 2 timmar efterföljt av tre tvättningssteg i ddH_2O. Denna första beläggning följs av ett inkubering steg över natten med Laminin (5μg/ml i DPBS (Dulbecco's fosfatbuffrad saltlösning) med 285 μl/cm^2 yta) för minst 2 timmar.

2. Poly-D-Lysine: (10μg/ml i DPBS med 285 μl/cm^2 yta) med inkubering över natt.

3. Kollagen 1: (5μg/ml i DPBS med 285 μl/cm^2 yta i ddH_2O innehållande 0,02 M (slutgiltig koncentration) ättiksyra) inkubering under 1 timma.

Efter ytterligare tvätt med DPBS är beläggningen av fibrerna färdig. Samtliga inkuberingssteg utförs i en cellodlingsinkubator i en fuktig atmosfär vid 37°C och 5% CO_2.

I ett annat förkroppsligande elektrosprayas de bioaktiva molekylerna tillsammans med elektrospinningen av nanofibernätverket. Elektrospinningen utförs enligt beskrivning ovan med tillägget av ytterligare en spruta med metallkanyl innehållande en lösning av de bioaktiva molekylerna. Lösningen med de bioaktiva molekylerna matas med liknande hastighet som polymerlösningen under elektrospinningen. Då processen initieras och en positiv spänning appliceras på kanylen innehållande de bioaktiva molekylerna sprayas dessa in i nanofibernätverket samtidigt som det formas.

Nanofibernätverket kan undergå en partiell eller komplett ytmodifiering för

att öka cell eller proteinvidhäftning på ytan. Nanofibernätverket behandlas med plasma med en kombination av olika processgaser för att skapa ett nätverk som har förändrade ytfunktionaliteter som möjliggör att bioaktiva molekyler binder till ytan i större utsträckning. Plasmabehandlingen etsar också nanofiberytan för att öka porositeten på fiberytan och fibrernas ytråhet. För att plasmabehandla nanofibernätverket placeras dessa i ett plasmaetsningsverktyg och en eller en kombination av följande behandlingar appliceras:

1. I ett förkroppsligande utsätts nanofibernätverket för syreplasma under 15 sekunder med ett gasflöde på 30 sccm, 100mTorr processtryck, och 10^{-6} mbar bastryck och 100 W RF effekt på elektroden. Efter behandlingen exponeras nanofibernätverket för luft för att låta fria radikaler att reagera klart.

2. I andra förkroppsliganden, appliceras processen som beskrivs i 1) i 30 sek, 1, 3 eller 5 min.

3. I ett annat förkroppsligande utsätts nanofibernätverket för argonplasma i 15 sek, med ett gasflöde på 30 sccm, 100mTorr processtryck, och 10^{-6} mbar bastryck och 100 W RF effekt på elektroden. Efter behandlingen exponeras nanofibernätverket för luft för att låta fria radikaler att reagera klart.

4. I andra förkroppsliganden, appliceras processen som beskrivs i 3) i 30 sek, 1, 3 eller 5 min.

5. I ett annat förkroppsligande utsätts nanofibernätverket för väteplasma i 15 sek, med ett gasflöde på 10 sccm, 250mTorr processtryck, och 10^{-6} mbar bastryck och 50 W RF effekt på elektroden. Efter behandlingen exponeras nanofibernätverket för luft för att låta fria radikaler att reagera klart.

6. I andra förkroppsliganden, appliceras processen som beskrivs i 5) i 30 sek, 1, 3 eller 5 min.

7. I ett annat förkroppsligande utsätts nanofibernätverket för Tetraflourometan-plasma i 15 sek, med ett gasflöde på 10 sccm, 250mTorr processtryck, och 10^{-6} mbar bastryck och 50 W RF effekt på elektroden. Efter behandlingen exponeras nanofibernätverket för luft för att låta fria radikaler att reagera klart.

8. I andra förkroppsliganden, appliceras processen som beskrivs i 7) i 30 sek, 1, 3 eller 5 min.

I ett annat förkroppsligande av uppfinningen är polyuretannanofibrerna

partiellt eller fullständigt belagda med ledande material såsom titan (Ti), guld (Au), platina (Pt), Ti plus Au eller Pt plus Au i form av en tunn eller tjock film för att skapa ett ledande nätverk som kan användas för elektrisk stimulering av celler eller i avläsningssyfte. Dessa beläggningar tillåter mätning av ändringar i ledningsförmågan hos nanofibernätverket som ett mätning på ändringar i neural cellmigrering, förökning och celldöd då döende celler lossnar och orsakar en ändring i ledningsförmågan. På liknande sätt, leder förökning av neurala celler på nanofibernätverken till en ändring i ytan täckt av celler vilket orsakar ändringar i ledningsförmågan. För att belägga nanofiber med ledande material appliceras en eller en kombination av följande metoder:

1. Nanofibernätverket placeras i ett sputtringsverktyg. Kammaren pumpas ner till ett bastryck $<10^{-6}$ mbar. Sputtringsmålen kan vara godtycklig typ av ledande metaller, företrädesvis Ti, Au eller Pt. Det sputtrade materialet deponeras med en hastighet av 0.5 – 3 nm/s beroende på applicerad effekt. Den slutgiltiga tjockleken på varje individuellt lager av film är mindre än 200 nm. Processgasen är en inert gas, företrädesvis kväve eller argon.

2. I ett annat förkroppsligande placeras nanofibernätverket i ett sputtringsverktyg. Kammaren pumpas ner till ett bastryck $2*10^{-7}$ mbar. Ti målet sputtras med DC magnetronsputtring med en effekt på 1kW och Ti filmen deponeras på nanofibernätverket med en hastighet på ~1.6 nm/s tills tjockleken är 50nm. Kvävgas används som processgas.

3. I ett annat förkroppsligande placeras nanofibernätverket i ett sputtringsverktyg. Kammaren pumpas ner till ett bastryck $2*10^{-7}$ mbar. Au målet sputtras en DC magnetronsputtring med en effekt på 0.22 kW och Au-filmen deponeras på nanofibernätverket med en hastighet på ~1.1 nm/s tills tjockleken är 50nm. Kvävgas används som process gas.

4. I ett annat förkroppsligande sputtras både Ti och Au enligt processerna som beskrivs i 2) och 3).

I ett annat förkroppsligande av uppfinningen, sås neurala celler i sina respektive odlingsmedia (DMEM +10% fetalt kalvserum för astrocyter, neurobasalt medium + 1xB27 för neuroner etc.) på nanofibernätverket och inkuberas 24 timmar för att tillåta cellinfästning till ytan innan byte av media och potentiella behandlingar utförs. Odlingsförhållandena (dvs. miljö, odlingsmedia,

temperatur och CO_2-nivåer) för neurala cellodlingar på nanofibernätverken är identiska med de i standard tvådimensionella cellodlingar.

I ett annat förkroppsligande genomförs överlevnadstester av neurala celler som såtts på nätverken. Neurala cellodlingar på nanofibernätverken behandlas med ett läkemedel och jämförs med obehandlade neurala cellodlingar. Det överliggande mediet skördas från båda cellodlingarna vid olika tidpunkter efter behandlingen och standardöverlevnadstester såsom "LDH"-tester (ex. LDH cytotoxiskt detekteringskit TaKaRa) genomförs för att undersöka läkemedelsberoendet på cellöverlevnad.

Vidare används nanofibernätverken för att undersöka ändringar i proteinutsöndringsnivåer efter läkemedelsbehandling. I detta förkroppsligande tas nanofibernätverket med infästa neurala celler av från bärarglasplattan efter läkemedelsbehandlingen och dränks i proteinnedbrytande buffert (innehållande i 30 sek för att lösa ut proteinerna. Denna proteinlösning kan sedan användas i Western blot tester för att undersöka ändringar i proteinutsöndring av de intressanta proteinerna efter läkemedelsbehandlingen (för Western blot metoder se: Protein Blotting Guide, A Guide to Transfer and Detection, Third Edition, BIO-RAD hemsida).

I ett annat förkroppsligande undersöks läkemedelsbehandlingen av neurala celler som beskrivits ovan med hjälp av standard immunocytokemiska tester. Efter inkubering av de neurala cellodlingarna växta på nanofibernätverk tvättas cellodlingarna i PBS (Fosfatbuffrad saltlösning) med efterföljande fixering av cellerna med 4% PFA (paraform-aldehyd). Efter ytterligare tvättningssteg och inkubering med antikroppar mot de intressanta proteinerna märks dessa proteiner med flourofor-länkade antikroppar. Detta möjliggör att mikroskopibilder kan tas av de intressanta proteinerna och jämföras med bilder på tredimensionella neurala cellodlingar som inte läkemedelbehandlats (för metoder se exempelvis: "Immunocytochemsitry-A practical approach", Oxford University press, 1993, ISBN 0-19-963271-7)

Exempel

Exempel 1

Astrocyter odlade på belagda nanofibrer antar en morfologi som efterliknad in vivo situationen till högre grad.

För att demonstrera effekterna av våra förbättrade, belagda tredimensionella nätverk på astrocyters morfologi odlades celler på poly-L-ornitin+laminin-belagda 1200 nm tjocka elektrospunna nanofibrer och jämfördes med celler växta på poly-L-ornitin+laminin-belagda tvådimensionella odlingsplattor av plast (Fig. 1, a-b). Astrocyter växta på de tvådimensionella odlingarna med plastytor förefaller platta, utspridda och polygonalt formade med en, i hög grad, symmetrisk morfologi (Fig. 1a). Vid odling på de tredimensionella belagda polyuretan-nanofibernätverken var celler mer komplexa i sin morfologi med en sann tredimensionell form med filopodia utsträckta in i nanofibernätverket (Fig 1b).

Infärgning av cellskelettet på astrocyter växta på tvådimensionella plastytor uppvisar en tillplattad morfologi som beskrivits ovan (Fig. 2a). När de växtes på fibrer belagda med poly-L-ornitin+laminin i enlighet med vår uppfinning, detekterades inga cellkluster och cellkärnorna var inte förtätade vilket indikerade friska celler (Fig. 2c). Cellerna spreds jämt over hela fibernätverket och immunocytokemisk infärgning för GFAP, nestin och vimentin visade fibrösa och stjärnformade astrocyter med tunna utskott som omvälvde fibrerna, i kontrast till celler växta på en tvådimensionell odlingsplatta av plast.

Celler växta på nanofibernätverket utan beläggning tenderade att klumpa ihop och bilda kluster på nätverket (Fig. 2b). Cellkärnorna hos celler växta på obelagda fibrer föreföll kondenserade vilket indikerar döende celler.

Därför demonstreras att beläggningen på nanofibernätverket är en väsentlig del av uppfinningen.

Högupplöst konfokalmikroskopi och svepelektronmikroskopbilder bekräftade den högst komplexa morfologin hos astrocyternas cellskelett, vilket även kan ses in vivo, när de växtes på belagda fibrer. Cellfilopodia har observerats att delvis omvälva runt fibernätet och, i visa fall, dramatisk ändra riktning efter att utbredning skett mot korsande fiber. Dessa data demonstrerar den enorma förbättring hos astrocytcellodlingar, som nu antar en in vivo-lik morfologi när de växes på våra belagda tredimensionella nätverk. För att vidare demonstrera denna in vivo-lika, sanna morfologi hos astrocyter, användes

astrocyter som kan visualiseras med en fluorescerande markör (grönt fluorescerande protein, GFP) i tredimensionella cellodlingar. Det cytoplasmiska gröna flourescerande proteinet sprids över cellerna. Konfokala z-stack-bilder tas och bilddata från individuella celler modelleras till en tredimensionell volym (Fig. 3). Inga signifikanta skillnader i cellvolym (14235 ± 2309 μm^3 för tvådimensionella gentemot 14930 ± 1784 μm^3 för tredimensionella, n= 9 för tvådimensionella, n= 6 för tredimensionella) eller cellytarea (15753 ± 2346 μm^2 för tvådimensionella gentemot 15907 ± 2368 μm^2 för tredimensionella) kunde detekteras. Emellertid är morfologin hos de tredimensionellt växta astrocyter betydligt mer komplexa och avlånga med stjärnlika utskott (Fig. 3b) jämfört med tvådimensionella standardastrocytodlingar (Fig. 3a) och påminner om astrocyter in vivo.

Samtliga procedurer som beskrivits ovan kan också tillämpas för andra neurala celltyper såsom neuroner, Schwannceller och oligodendrocyter.

Exempel 2

Fiber diameter är avgörande för riktig tredimensionell cellväxt.

För att demonstrera effekterna från fiberdiameter på cellmorfologi jämfördes astrocyter växta på de nanofibernätverken baserade på 1200 nm i fiberdiameter (Fig.4a) med nätverk som producerats av nanofibrer med en diameter av cirka 450 nm (Fig. 4b). Nanofibernätverken belades med poly-L- ornitin och laminin. För att utvärdera skillnader i morfologi och proteinutsöndring från cellskelettet utfördes standard immunocytokemiska experiment för astrocyters cellskelettsprotein GFAP enligt beskrivning ovan. Astrocyterna växta på fibrer med tunnare diameter integrerades inte i nätverket utan var morfologiskt mer lika de tvådimensionella cellodlingarna (Fig. 4a). Cellkropparna spreds vidlyftigt över ytan utan att filopodia omslöt fibrerna. Vidare fanns en tillsynes högre utsöndring av GFAP-protein när cellerna växtes på fibrerna med tunnare diameter. Denna upptäckt är oväntad och demonstrerar möjligheten för astrocyter att integreras med fiber av speciell fiberdiameter och porositet samt att detta ändrar metabolismen hos cellerna och följaktligen utsöndringen av cellskelettsprotein. Astrocyter växta på fibrer med mindre diameter än vad som beskrivs i denna uppfinning är tillsynes mer reaktiva

utifrån en bedömning baserad på deras utsöndring av GFAP, vilket är en oönskad effekt i läkemedelsbehandlingsförsök och inom livsvetenskap. Detta demonstrerar vikten av den rätta fiberdiametern för astroglial cellväxt i vår uppfinning.

Exempel 3

Effekter av typ av nätverksbeläggning på vidhäftning och överlevnad hos astroctyer.

För att demonstrera överlevnad hos astrocyter 24 timmar efter överföring, mättes LDH-nivåer i cellodlingens överliggande vätska som en indikator på celldöd hos astrocyterna. Flera olika metoder för att belägga nanofibrerna undersöktes, mer specifikt poly-D-Lysin, kollagen I, poly-L-ornitin+laminin (se förklaring under sätt att implementera uppfinningen) och jämfördes med en standard tvådimensionell cellodling. LDH-tester utfördes enligt tillverkarens specifikationer (TaKaRa, Cat# MK401). Det fanns inga signifikanta skillnader i celldöd/hälsa mellan astrocyter växta på tvådimensionella plattor och nanofibernätverken, vilket indikerar att vår uppfinning är icke-cytotoxisk och främjar en minst lika, om inte bättre, miljö för cellväxt som standard tvådimensionella cellodlingsplattor av plast (Fig. Exempel 3/4 A). Signifikanta skillnader i celldöd fanns dock mellan olika varianter av ytbeläggningar. Den lägsta cellöverlevnad fanns i odlingar utan ytbeläggning, emedan den högsta cellöverlevnaden uppnåddes efter beläggning av ytorna med poly-L-ornitin+laminin. Detta innebär att beläggningen är en högst vital och integrerad komponent i vår uppfinning. Vidare har vi demonstrerat att nanofibrerna kan beläggas med olika bioaktiva molekyler för att tillgodose individuella behov av speciella celltyper.

Utöver LDH-test som mätningar för överlevnad räknades antalet celler som vidhäftat 24 timmar efter överföring. Beläggning av fibrerna med poly-L-ornit~~hine~~+laminin uppnådde högst cellvidhäftning utan signifikanta skillnader mellan standard tvådimensionella odlingar och nanofibernätverken (Fig. Exempel 3/4 B).

Exempel 4

Astrocyternas förökning minskas när de växes på belagda nanofibernätverk

(begränsad förökning är en önskad funktion för astrocytodlingar).

Det reaktiva tillståndet hos astrocyter definieras generellt sett av ökad utsöndring cytoskelettala protein samt hyperaktiv förökning. Astrocyter in vivo förökas endast mycket lite i frisk, oskadad vävnad. Emellertid får in vitro i standard tvådimensionella cellodlingar astrocyter att komma i ett tillstånd där de är reaktiva och förökar sig. Det är således önskvärt att odla astrocyter under mindre reaktiva och förökningsbenägna förhållanden. Immunocytokemi för den endogena förökningsmarkören Ki67 demonstrerade lägre förökning och därför mindre reaktiva astrocyter när celler växtes på nanofibrerna oavsett beläggning, vilket återigen demonstrerar förbättringen av vårt odlingssystem jämfört med existerande tvådimensionella system (Fig. Exampel 3/4 C).

Eftersom Ki67 är en endogen förökningsmarkör och varaktigheten hos Ki67s antigen är okänd undersöktes cellförökningen med ett exogent markörsystem, EdU-Click-It (Invitrogen), för att vidare befästa skillnaderna i förökning hos astrocyter i standard tvådimensionella cellodlingssystem gentemot vår uppfinning. Testet använder en modifierad nukleosid, EdU (5-ethynyl-2´-deoxyuridine), vilken inkorporeras under DNA-syntes in i cellernas kärnor. Det fanns inga signifikanta skillnader vid 24 timmar efter överföring av cellerna (Fig. 3/4 D). Vid 3 dagar efter överföring fanns dock en signifikant lägre andel av astrocyterna växta på det belagda nanofibernätverket som var i förökningstillstånd, vilket liknar de resultaten som erhållits från Ki67 immunocytokemi. En intressant observation var att vid dag 5 var den tredimensionellt växta astrocyterna något mer förökningsbenägna än de tvådimensionellt växta astrocyterna. Detta är möjligen på grund av att vid 5 dagar i odling så har de tvådimensionellt växta astrocyterna flutit ihop och alltså ingått i ett tillstånd där det inte sker ytterligare förökning, på grund av att cell- cell kontakt hämnar förökning. Celler i detta stadiet är kända att vara icke-responsiva för de flesta behandlingarna och är därför inte önskvärda för forskningsexperiment. Cellerna i det tredimensionella system var dock fortfarande responsiva och lätt förökningsbenägna efter 5 dagar efter överföring, vilket återigen demonstrerar överlägsenheten hos vårt system i jämförelse med andra cellodlingssystem. För att vidare bekräfta den ändrade förökningshastigheten genomfördes Wester blot analys vid 3 och 5 dagar efter

överföring av cellerna. Förökningen utvärderades genom analys av MCM-2 protein. MCM-2 är en del av det mini-kromosombevarande komplexets (mini-chromosome maintenance complex) (MCM) proteiner och är en nyckelkomponent hos pre-replikationskomplexet involverat i sammanställandet av andra DNA replikerande protein. MCM-2 har visats vara inblandat i reglering av helikasaktivitet och uppreglering är därför ett tecken på ökad DNA-replikering, dvs. förökning av eukaryotiska celler.

Vid båda tidpunkterna minskade MCM-2 protein nivåerna i de tredimensionella cellodlingarna, vilket återspeglar observationerna från Ki67 och EdU experimenten (Fig. Experiment 3/4 E). Vidare detekterades en minskning av förökningen hos astrocyter i tvådimensionella odlingar över tid, såsom det visats för EdU upptag.

Exempel 5

Western blot analys av cytoskelettala protein och stressproteiner bekräftar förbättrade cellodlingsförhållanden för astrocyter odlade på belagda nanofibernätverk.

För att vidare bekräfta resultaten erhållna från immunicytokemin kontrollerades de faktiska proteinutsöndringsnivåerna med Western blot metoden. Western blot analys bekräftade ändrad utsöndring av cytoskelettal protein när astrocyter växters på vårt poly-L-ornitin+laminin-belagda tredimensionella nätverk. Vi fann skillnader i utsöndringsnivåer av synemin, vimentin och nestin (Fig. Exempel 5), vilka är markörer för omogna och reaktiva astrocyter. Dessa markörer är kända för att uppregleras i tvådimensionella cellodlingar, vilket är en oönskad sidoeffekt av den tvådimensionella odlingsmetoden. Vår uppfinning kan dock frångå dessa problem, vilket tillåter cellodling att bli mer in vivo-lik. I astrocyter växta på våra belagda nanofibernätverk utsöndrades betydligt lägre nivåer av alla dessa tre proteiner. Densitometrimätningar av den kemiluminiscerande signalen som härstammade från Western blot experimenten bekräftade signifikant minskning av vimentin, nestin och synemin proteiner vid odling på tredimensionella poly-L-ornitin+laminin-belagda nanofibrer.

Vi undersökte vidare stressnivåerna hos tredimensionellt odlade astrocyter

genom Western blot tester för heat-shock proteiner HSP70 och HSC70. Medan det inte fanns några konsekventa ändringar av HSP-proteinnivåer mellan astrocyter från två- och tredimensionella odlingar, minskade stressprotein nivåerna för HSC70 signifikant för odlingar växta på de belagda nanofibernätverken, vilket vidare indikerar att vår uppfinning erbjuder en mycket bättre miljö för cellväxt än standard tvådimensionella cellodlingssystem.

Exempel 6

Andra neurala celltyper växta på nanofibernätverk: Neuronodlingar

"Primära" neuronodlingar är ofta känsliga för kontaminering av astrocyter. Givet en minskad förökningshastighet hos astrocyterna i det tredimensionella cellodlingssystemet, kommer de neurala cellodlingarna vara mycket enklare att odla utan oönskad kontaminering med astrocyter av odlingarna.

För att demonstrera effekterna av poly-L-ornitin+laminin-belagda tredimensionella nätverk på neurala cellväxt, såddes kortikala neuroner på tvådimensionella poly-L- ornitin+laminin-belagda täckglas och tredimensionella poly-L- ornitin+laminin-belagda nanofiber. Då det är känt att neurala odlingar är mycket känsligare än astrocytodlingar utvecklades förvåningsvärt neurala tredimensionella odlingar extremt väl med neuroner som växte långa axoner som omslöt fibrerna. Neuroner i tvådimensionella odlingar växte kortare axoner och var mycket känsligare för hantering under experimentering och vid hantering av odlingarna.

För att vidare undersöka ändringarna i metabolism av neuronodlingar utfördes Western blot experiment för att mäta ändringar i proteinutsöndring. Neuronerna, som växtes på poly-L- ornitin+laminin-belagda nanofibernätverk visade en minska utsöndring av PSD95 och, i kontrast, en ökning utav synaptotagmin proteinnivåer (Fig. Exempel 6). Detta demonstrerar den signifikanta olika metabolismen mellan neuroner växta i standard tvådimensionella odlingssystem jämfört med belagda nanofibernätverk.

Exempel 7

Astrocyter ökar sina GFAP nivåer efter inkubering med TGFbeta1.

För att demonstrera att astrocyter kan bli reaktiva när de växes

tredimensionellt på vårt nanofibernätverk undersöktes deras förmåga att öka GFAP-proteinnivåer efter behandling med TGFbeta1. TGFbeta1 har rapporterats att öka GFAP nivåer i standardcellodlingar för astrocyter. Här växte vi astrocyter i 7 dagar på våra belagda nanofibernätverk med efterföljande inkubering med TGFbeat1 (10ng/ml cellodlingsmedium) under 6 timmar. Dessa odlingar jämfördes med obehandlade astrocytodlingar växta på uppfinningen som presenteras här. Nanofiberdiameterna var 1200 nm. Efter avlägsnande av odlingsmedium tvättades cellerna i PBS och nätverket skalades av den glasplattan som agerade bärare och sänktes ner i proteinnedbrytande buffert. Standard Western blot proteintester genomfördes och GFAP-utsöndringsnivåerna undersöktes. Vi fann en signifikant ökning i GFAP-nivåer i de TGFbeta1-behandlade odlingarna jämfört med de obehandlade odlingarna, vilket demonstrerar att astrocyterna kan bli reaktiva i vårt system av nanofibernätverk.

BIBLIOGRAFI

Cukierman, E., R. Pankov, et al. (2001). "Taking cell---matrix adhesions to the third dimension." Science 294(5547): 1708---1712.

Lee, J., M. J. Cuddihy, et al. (2008). "Three---dimensional cell culture matrices: state of the art." Tissue Eng Part B Rev 14(1): 61---86.

Mueller---Klieser, W. (1997). "Three---dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications." Am J Physiol 273(4 Pt 1): C1109---1123.

Walpita, D. and E. Hay (2002). "Studying actin---dependent processes in tissue culture." Nat Rev Mol Cell Biol 3(2): 137---141.