

Е.И. ПУГАЧЕВ

Самарский государственный медицинский университет

**ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ХОНДРОБЛАСТОВ
НА 3D-БИОНОСИТЕЛЕ В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

Данная статья посвящена анализу пролиферативной активности хондробластов на 3D-носителе – деминерализованной лиофилизированной спонгиозе «Лиопласт®» при разных условиях культивирования: в вентилируемой пробирке при 5% CO₂ и 37°C; в герметично закрытой пробирке при 37°C. По результатам ДНК-метрии, через 7 суток культивирования прирост клеток относительно начальной точки (2 часа после посева) наблюдался в обеих опытных группах и составил 29,5% – в CO₂-инкубаторе и 34% – в термостате. При изучении гистологических препаратов различий в морфологических характеристиках клеток, выращенных в разных условиях, обнаружено не было. В обеих группах наблюдаются участки локального роста клеток на поверхности носителя в один или несколько слоёв.

Ключевые слова: хондробласты, 3D-носитель, клеточноинженерная конструкция, ДНК-метрия

Пугачев Евгений Игоревич - очный аспирант института экспериментальной медицины и биотехнологий. E-mail: csrl.sam@mail.ru

E.I. PUGACHEV

Samara State Medical University

**PROLIFERATIVE ACTIVITY OF CHONDROBLASTS ON 3D CARRIER
IN DIFFERENT CULTIVATION CONDITIONS**

The article presents an analysis of the proliferative activity of chondroblast cells on a 3D bio-carrier – a demineralised lyophilised spongiosis. The analysis was carried out in various conditions of cultivation: in a ventilated test tube at 5% CO₂, 37°C; in a sealed airtight test tube; in a test tube completely filled with culture medium at 37°C. According to the results of DNA measurement, on the 7th day of cultivation the growth of cell number in comparison with the 0 day was 29.5% in the CO₂ incubator and 34% in a thermostate. The histology revealed a local growth of the cell numbers (from one to several layers) on the surface of the carrier.

Keywords: chondroblasts; 3D-carrier; tissue-engineered construction; DNA-metry.

Pugachev Evgeniy Igorevich – Postgraduate student, Institute of Biotechnology and Experimental Medicine, E-mail: csrl.sam@mail.ru

Выращивание хондробластов на 3D-матрицах представляет особый интерес для регенеративной медицины. Создаваемые таким образом клеточно-инженерные конструкции (КИК) могут быть использованы для лечения дегенеративно-дистрофических заболеваний и посттравматических повреждений суставного хряща [4-6]. Чаще всего в процессе создания КИК хрящевой ткани используют CO₂-инкубаторы, либо био-реакторные системы, поддерживающие заданные параметры среды. Общепринятыми условиями культивирования клеток хрящевой ткани являются: температура 37°C, постоянная влажность, содержание в газовой среде CO₂ – 5% и O₂ – 21% [1, 2]. Проведённое ранее исследование хондробластов на 3D-носителе «Лиопласт®» в рамках космического и синхронного наземного экспериментов показало жизне-

способность и пролиферацию клеток в герметичных флаконах без воздушной прослойки в течение 3-х недель [3]. В настоящем исследовании оценивается возможность получения КИК хрящевой ткани на основе хондробластов человека и 3D-носителя «Лиопласт®» с помощью менее ресурсозатратной технологии, без использования CO₂-инкубатора.

Цель исследования: сравнить пролиферативную активность хондробластов человека на 3D-бионosite «Лиопласт®» при культивировании в разных условиях: в вентилируемой пробирке при 5% CO₂ и 37°C; в герметично закрытой пробирке при 37°C.

Материалы и методы

Посев культуры хондробластов на 3D-бионosite. Культуру хондробластов из гиалинового хряща человека (патент РФ № 2627817 от 11.08.2017 г.) вы-

севали на пористый 3D-носитель – аллогенную деминерализованную лиофилизированную спонгиозу «Лиопласт®» (патент РФ № 2366173 от 15.05.2008 г.). Согласно ТУ-9398-001-01963143-2004, данный носитель зарегистрирован как изделие медицинского назначения. Посевная доза: 5×10^4 клеток на носитель размером $3 \times 3 \times 3$ мм. Клетки на носителе помещали в культуральную ёмкость объёмом 10 мл (по 2 КИК в каждую ёмкость). Для первого варианта культивации флакон заполняли 7 мл ростовой среды 199 (ООО «Биолот», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Закрывали ёмкость крышкой с фильтром и ставили в CO_2 -инкубатор при 37°C , 5% CO_2 и постоянной влажности. Для второго варианта полностью заполняли флакон полной ростовой средой, герметизировали и ставили в термостат при 37°C . Всего было подготовлено 30 флаконов с КИК (по 15 для каждого варианта культивирования). Флаконы с носителем без клеток служили контролем, для исключения фона от самого матрикса. Количество клеток на носителе через 2 часа после посева было принято за начальную точку, относительно которой наблюдали изменения через 1 и 7 суток эксперимента.

Уровень пролиферации хондробластов определяли по количеству ДНК, выделенного из клеточных ядер.

Определение ДНК. К опытному образцу добавляли 0,05%-й раствор азида натрия и протеиназу К для полного растворения материала. Центрифугировали с хлоридом натрия, отбирали супернатант, добавляли 96%-й этанол и ставили в морозильник на ночь. Процедуру промывки повторяли ещё 2 раза с использованием 70%-го этанола. К супернатанту добавляли 1xTNE и тщательно перемешивали. Все растворы от исходной пробы объединяли. В стеклянной химической пробирке смешивали 1xTNE и экстракт ДНК. Добавляли равный объём приготовленного флюорогена и производили регистрацию флюоресценции на микропланшетном ридере (Paul J.H. et al., 1982) [7].

Морфологическое исследование. Образцы фиксировали в 10%-м формалине, обезжизивали в спиртах восходящей крепости, затем заливали в парафин и изготавливали серийные срезы толщиной 7-10 мкм. Препараты окрашивали пикросириусом красным (Puchtler H. et al., 1973) [8].

Результаты исследования

Через 2 часа после посева (необходимое время для прикрепления клеток) на 3D-носителе обнаружили 37,5 тыс. клеток, что составляет 37,5 % от посевной дозы. Далее измерения проводили в 2-х опытных группах (выращенные в CO_2 -инкубаторе и термостате) через 1 и 7 суток культивирования.

Для статистического анализа полученных данных был применён U-критерий Манна-Уитни. Изменение считали статистически значимым при $p \leq 0.05$ (рис. 1).

Через 1 сутки наблюдалась тенденция

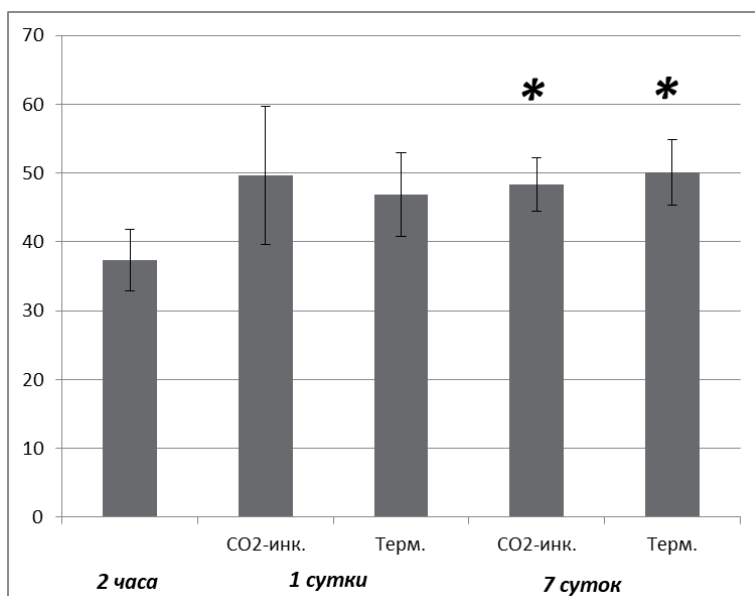


Рис. 1. Изменение количества клеток на бионосителе в течение 7 суток в разных условиях культивирования. Звездочкой отмечен статистически значимый прирост клеток (* $p \leq 0.05$).

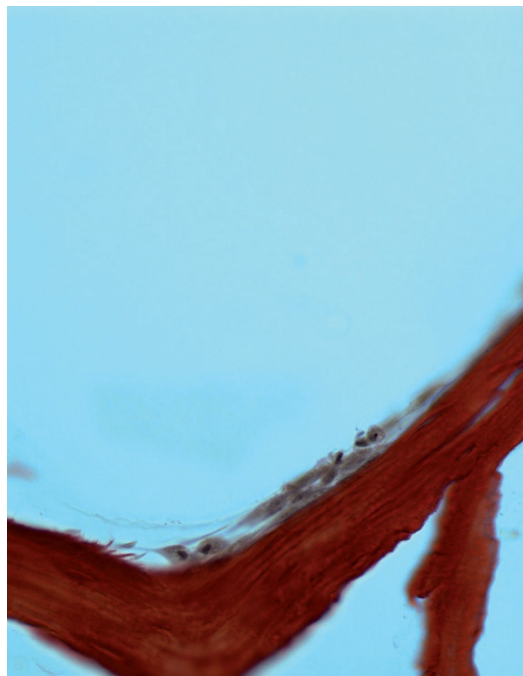
Плankи погрешностей на графиках показывают стандартную ошибку средней ($S_{\bar{x}}$) ($S_{\bar{x}}$)

увеличения числа клеток относительно начального срока. Прирост клеток в CO_2 -инкубаторе составил 33%, а в термостате – 25,5%.

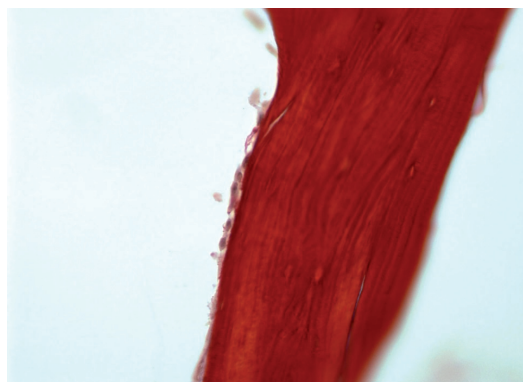
Статистически значимое изменение количества клеток относительно контроля было зафиксировано на 7-е сутки культивирования. Прирост клеток составил 29,5% – в CO_2 -инкубаторе и 34% – в термостате, т.е. в CO_2 -инкубаторе прирост был меньше, чем в термостате, на 4,5%.

При исследовании гистологических препаратов КИК во всех опытных груп-

пах выявлен локальный рост клеток на поверхности носителя в виде плотного монослоя (рис. 2).



А



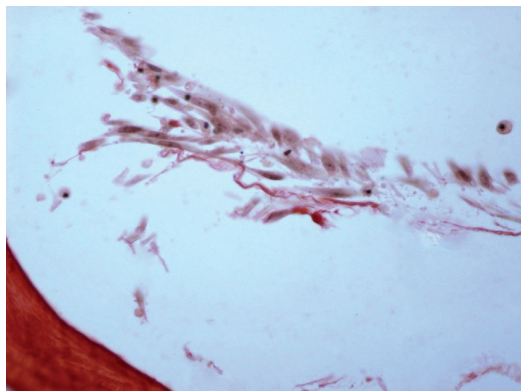
Б

Рис. 2. Клетки, растущие монослоем на балках 3D-носителя:

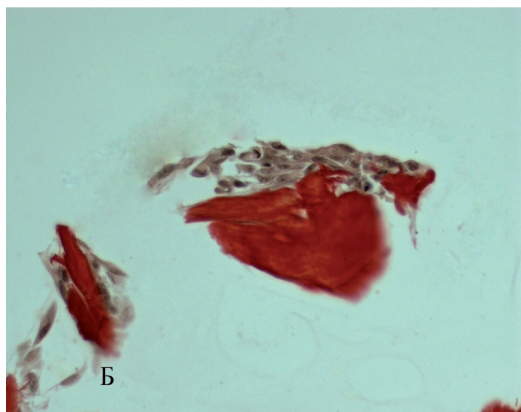
А – в CO₂-инкубаторе, Б – в герметичном флаконе. 7 суток. Пикросириус красный. Ув. 400

Кроме того, как через 1, так и через 7 суток культивирования в обеих опытных группах имеются участки роста хондроцитов в несколько слоёв (рис. 3).

Клетки в монослойных участках, как правило, фибробластоподобные, встречаются клетки полигональной формы. Цитоплазма гомогенная. В ней можно выделить две зоны: центральную, оптически более плотную (эндоплазма), и периферическую, оптически менее плотную (эктоплаз-



А



Б

Рис. 3. Клетки, растущие в несколько слоёв на балках 3D-носителя: А – в CO₂-инкубаторе, Б – в герметичном флаконе. 7 суток. Пикросириус красный. Ув. 400

ма). Ядро крупное, расположено в центре клетки и обычно имеет 1-2 ядрышка.

В стратифицированных участках клеток полигональной формы становится больше. Такие клетки имеют 3-5 коротких отростков.

Выводы

Через 7 суток культивирования прирост в CO₂-инкубаторе составил 29,5%, что на 4,5% меньше, чем в термостате (34%).

Морфологические характеристики клеток, выращенных в разных условиях, не отличаются ни через сутки, ни через неделю культивирования.

Таким образом, выращивание хондроцитов на пористом 3D-матриксе «Лео-пласт®» в течение 7 суток возможно в менее ресурсозатратных условиях – в термостате при 37°C.

Список литературы

1. Арутюнян И.В., Бажанов Н.А. с соавт. Биотрансплантат для лечения дегенеративных и травматических заболеваний хрящевой ткани и способ его получения // Патент РФ № 2301677, 27.06.2007.

2. Басок Ю.Б. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины в лечении дефектов хрящевой ткани суставов / Ю.Б. Басок, В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2016. Т. 18. – № 4. – С. 102-122.
3. Волова Л.Т. Изучение влияния условий космического полета на клеточную популяцию хондробластов человека *in vitro* / Л.Т. Волова, М.Н. Милякова, В.В. Россинская, В.В. Болтовская, Л.Н. Кулагина, Е.И. Пугачёв, Л.В. Курганская // Технологии живых систем. – 2013. – № 8. – С. 54-58.
4. Волова Л.Т. Особенности регенеративных процессов при пластике костно-хрящевых дефектов комбинированными трансплантатами на основе аутологичных и аллогенных культур клеток из реберной хрящевой ткани / Л.Т. Волова, Г.П. Котельников, Ю.В. Ларцев, Д.А. Долгушкин, В.В. Болтовская, М.А. Тертерян // Морфология. – 2014. Т. 146, № 4. – С. 47-52.
5. Котельников Г.П. Новый способ пластики дефектов суставного гиалинового хряща комбинированным клеточно-тканевым трансплантатом / Г.П. Котельников, Л.Т. Волова, Ю.В. Ларцев, Д.А. Долгушкин, М.А. Тертерян // Травматология и ортопедия России. – 2010. – № 1 (55). – С. 150-155.
6. Liu M. Tissue engineering stratified scaffolds for articular cartilage and subchondral bone defects repair / M. Liu, X. Yu, F. Huang, S. Cen, G. Zhong, Z. Xiang // Orthopedics. – 2013. – 36 (11). – P. 868-873.
7. Paul J.H. Fluorometric Determination of DNA in Aquatic Microorganisms by Use of Hoechst 33258 / J.H. Paul, B. Myers // Applied and Environmental Microbiology. – 1982. – 43 (6). – P. 1393-1399.
8. Puchtler H. Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA / H. Puchtler, F.S. Waldrop, L.S. Valentine // Beitr Path. – 1973. – 150. – P. 174-187.