

УДК 57.085.23, 57.089.67

ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ХОНДРОЦИТОВ КРОЛИКА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ПОЛИЛАКТИДНЫХ СКАФФОЛДАХ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ

Копелев П.В.¹, Нащекина Ю.А.^{1,2}, Александрова С.А.²¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,²Институт цитологии

EVALUATION OF THE VIABILITY OF RABBIT CHONDROCYTES IN CULTIVATION ON POLYLACTIC SCAFFOLDS INTENDED FOR TISSUE ENGINEERING OF CARTILAGINOUS TISSUE

Kopelev P.V.¹, Naschekina Y.A.^{1,2}, Alexandrova S.A.²¹Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University,²Institute of Cytology

Аннотация

Была проведена качественная и количественная оценка жизнеспособности хондроцитов кролика при культивировании на полилактидных скаффолдах, предназначенных для тканевой инженерии хрящевой ткани. Для оценки были использованы методы световой и электронной сканирующей микроскопии, МТТ-тест. Было выявлено, что полилактидные носители не являются токсичными для хондроцитов: клетки сохраняют характерную морфологию, остаются жизнеспособными, сохраняются свои пролиферативные и дифференцировочные свойства.

Ключевые слова: полилактидные матрицы, хондроциты, тканевая инженерия, суставной хрящ, регенеративная медицина.

Abstract

A qualitative and quantitative assessment of the viability of rabbit chondrocytes cultivated on polylactic scaffolds intended for tissue engineering of cartilaginous tissue was carried out. The methods of light and electron scanning microscopy, MTT test were used for evaluation. It was found that polylactic carriers are not toxic to chondrocytes: cells retain characteristic morphology, remain viable, retain their proliferative and differentiating properties.

Keywords: polylactic scaffolds, chondrocytes, tissue engineering, articular cartilage, regenerative medicine.

Введение

Наиболее разработанным методом клеточных технологий для восстановления хрящевой ткани в настоящее время является метод трансплантации аутологичных хондроцитов (АСТ, autologous chondrocyte transplantation) [1]. Он заключается в том, что у пациента в ходе операции проводят забор здорового участка хряща, размножают хондроциты в лаборатории *in vitro* (в культуре) и трансплантируют в место повреждения, покрывая фрагментом надкост-

ницы. Однако в месте дефекта может происходить естественное вымывание клеточного материала, поэтому для успешного применения данной технологии необходимо найти способ фиксации клеточного препарата в зоне поражения. Кроме того, нужно убедиться, что в результате проведенных манипуляций будет формироваться ткань с механическими и биологическими свойствами, близкими хрящевой ткани (например, упругость и выработка клетками специфического внеклеточного матрикса) [2]. Со времени первого использования АСТ

в клинике в 1987 году появились новые варианты метода. Аппликация суспензии хондроцитов в комбинации с участком надкостницы была модифицирована помещением в рану хондроцитов на подложке из плотного коллагенового геля (тип I/III). В настоящее время активно разрабатываются подходы, в результате которых доставка хондроцитов происходит в составе трехмерных искусственных скаффолдов [3]. Основным аргументом использования скаффолдов является необходимость обеспечения структурной поддержки поврежденной ткани до тех пор, пока не будут секретированы свои собственные матриксные белки.

Для разработки тканеинженерных скаффолдов используются природные и синтетические материалы. Хотя природные материалы более привлекательны из-за их состава и биосовместимости, вопросы очистки, патогенного заражения и ограниченные механические свойства ограничивают их клиническое применение. По своей преобладающей структуре скаффолды можно разделить на две категории – гидрогели и мембраны. Для тканевой инженерии хряща исследуются следующие материалы. Природные гидрогели: альгинаты, агароза, хитозан, целлюлоза, хондроитин сульфат, гиалуроновая кислота, коллаген I и II типов, фибрин; синтетические: полиэтилен гликоль диакрилат, поливиниловый спирт и др. Природные мембраны: фрагмент перистоа, двуслойные мембраны из коллагенов I/III; синтетические: алифатические полиэфиры (поликапролактон, полигликолевая и полимолочная кислоты), их сополимеры (полилактид-полигликолид) и др. Изучаются также всевозможные сочетания данных материалов [4]. Основными критериями соответствия материалов для целей тканевой инженерии являются их биосовместимость, биорезорбируемость и нетоксичность для клеток.

В течение ряда лет в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург) активно проводятся исследования по разработке тканеинженерных конструкций для восстановления разных тканей из поли(L,L-лактида) [5]. Полилактид является биodeградируемым полимерным материалом на основе молочной кислоты. Интерес к данному полимеру вызван возможностью получения скаффолдов требуемой формы и степени пористости, с высокой степенью чистоты, необходимой для изделий медицинского назначения. Со-

трудниками Института были получены полилактидные скаффолды, размер пор которых варьирует от 150 до 300 мкм. В результате исследований была установлена нетоксичность материала для фибробластов, кератиноцитов и стромальных клеток костного мозга [6]. Однако исследования жизнеспособности хондроцитов при культивировании на таких полилактидных скаффолдах не проводились. Целью настоящей работы является оценка жизнеспособности хондроцитов кролика при культивировании на полилактидных скаффолдах.

Материалы

Первичная культура хондроцитов новорожденного кролика. Первичную культуру хондроцитов получали из фрагментов суставного хряща новорожденного кролика (питомник «Рапполово»). Хрящи тщательно отделяли от скелетных тканей и сухожилий, промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ), измельчали с помощью скальпеля на мелкие фрагменты, инкубировали в смеси трипсин/ЭДТА (Invitrogen, Великобритания), разведенной на ФСБ (1:4) 1 ч при 37°C с покачиванием. Далее избавлялись от дебриса фильтрованием через нейлоновый фильтр. Клеточную суспензию центрифугировали 5 мин при 300 g, осадок ресуспендировали в ростовой среде α MEM (Sigma, США) с 20% сыворотки эмбрионов коров (СЭК) (HyClone, США) и высевали на чашки Петри. Пересев проводили по достижении клетками субконфлуентного монослоя. Культивировали хондроциты в ростовой среде α MEM с 10% СЭК в инкубаторе с 5 % CO₂ при температуре 37°C. В экспериментах использовали клетки 2-4 пассажа.

Субстраты. Пленки. Для получения плёнок на покровные стёкла диаметром 12 мм наносили раствор поли(L,L-лактида) (Sigma, США, $\eta=4.0$ дл/г) с концентрацией 2 мг/мл. Исследуемые субстраты помещали на дно лунок культуральных планшетов. Скаффолды. В качестве скаффолдов для культивирования клеток использовали матрицы из поли(L,L-лактида), изготовленные Никоновым П.О. (Институт цитологии РАН) методом выщелачивания [6]. Для этого во фторопластовую форму помещали 1 г NaCl с диаметром кристаллов 250 мкм. Поли(L,L-лактид) растворяли в метилхлориде («Реактив», РФ), наливали в форму с NaCl и оставляли сушиться на воздухе в течение 2 сут. После испарения растворителя матрицу выдерживали в дистиллированной

воде до полного растворения соли. Приготовленные матрицы стерилизовали в растворе 70%-ного этанола в течение 1 ч, промывали раствором ФСБ, высушивали в потоке стерильного воздуха 1 сут, проводили озонирование и обработку УФ-светом в ламинарном боксе в течение 2 ч.

Методы

Световая микроскопия. Хондроциты кролика помещали в лунки 24-луночного планшета в количестве 75 тыс. клеток в объеме 10 мкл на стекла, покрытые полилактидными пленками, и оставляли на 1 ч в стандартных условиях инкубации для прикрепления к поверхности. Затем добавляли ростовую среду и инкубировали в течение 28 сут, проводя смены среды два раза в неделю. Для формирования сфероидов хондроциты в высокой плотности (250 тыс. клеток в 5 мкл среды) помещали на полилактидную пленку, через 2 ч добавляли индукционную среду StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Life Technologies, США) и культивировали в течение 28 сут. В ходе опыта проводились прижизненные наблюдения с фотофиксацией под инвертированным микроскопом Nikon Eclipse TS100.

Сканирующая электронная микроскопия. Хондроциты в виде клеточной суспензии (100 тыс. клеток в ростовой среде объемом 50 мкл) наносили на матрицы, помещенные в лунки 24-луночного планшета, и оставляли в CO₂-инкубаторе для прикрепления к поверхности материала. После 2-часовой адгезии в лунки планшета добавляли среду и оставляли для инкубации на 26 сут, проводя смену ростовой среды 2 раза в неделю. После окончания инкубации образцы с клетками последовательно обрабатывали растворами ФСБ, глутарового альдегида (2,5%), этанола и эфира. На лиофильно высушенные образцы наносили слой золота толщиной 5 нм. Образцы были подготовлены и исследованы под электронным микроскопом марки Jeol JSM-35C (Япония) научным сотрудником НИИ ОЧБ И.Л. Потокиным.

Определение количества жизнеспособных клеток с помощью МТТ-теста. Качественную оценку жизнеспособности хондроцитов проводили методом МТТ-теста. Это колориметрический метод с использованием МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) (Sigma, USA), основанный на способности митохондриальных ферментов живых клеток восстанавливать желтый МТТ-субстрат до темносинего формазана [7] Число жизнеспособ-

ных клеток прямо пропорционально количеству восстановленного формазана, которое можно определить спектрофотометрически после растворения в органическом растворителе.

Для разных вариантов посева клеток изначально было взято по 40 тыс. кл на лунку, инкубация продолжалась 7 сут. Из лунок планшетов, в которых росли клетки или находились матрицы с клетками, убрали кондиционированную среду. В каждую лунку добавляли раствор МТТ (стоковая концентрация 5 мг/мл) в ростовой среде в количестве 10% от общего объема среды и оставляли на 3 ч до формирования кристаллов формазана. Затем аккуратно отбирали среду, добавляли диметилсульфоксид и оставляли до растворения кристаллов. Далее переносили по 200 мкл полученного раствора в лунки 96-луночного планшета и проводили измерения оптической плотности раствора на иммунохимическом анализаторе Fluorofot "Charity" при длине волны 570 нм (референсная длина 630 нм). Значения оптической плотности подвергали статистической обработке с помощью программы Statistika 13.0. Достоверность различий средних значений оценивали по t-критерию Стьюдента для независимых выборок. Приемлемой границей статистической значимости считали p (уровень значимости t-критерия), не превышающие 0,05.

Оценку жизнеспособности хондроцитов при длительном культивировании проводили качественными (микроскопия) и количественными (МТТ-тест) методами.

Общую морфологию хондроцитов и их распределение по поверхности полилактидных скаффолдов изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

Результаты и обсуждение

Жизнеспособность хондроцитов исследовали в условиях двумерного (на пленках) и трехмерного (на скаффолдах) культивирования качественными и количественными методами.

Сформированные на предметных стеклах полилактидные пленки оказались практически прозрачными, поэтому было возможно провести прижизненные исследования морфологии клеток, прикрепившихся к пленкам, в течение всего срока инкубации. После помещения клеточной суспензии в высокой плотности и 1-часовой адгезии можно было наблюдать, что практически все клетки прикрепилась к подложке. После 1-суточной инкубации можно было наблюдать прикрепление клеток в центре лунки.

Ко времени завершения инкубации (28 сут) клетки пролиферировали и заполняли всю поверхность полилактидной пленки. При этом хондроциты проявляли веретенообразную фибробластоподобную морфологию и располагались плотным монослоем (Рис. 1.). Можно заключить, что полилактидные пленки нетоксичны и адгезивны для хондроцитов кролика.

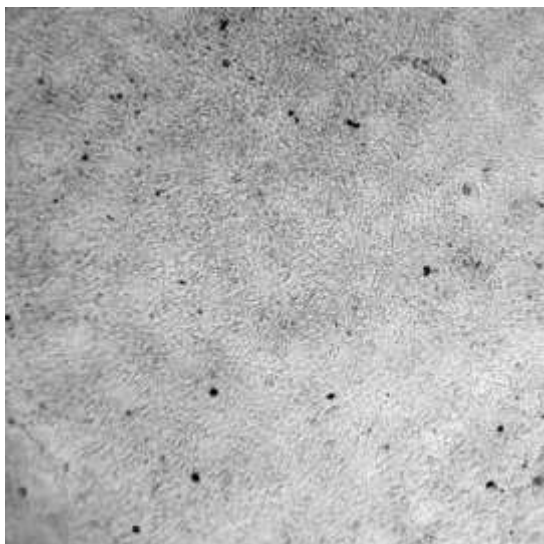


Рис. 1. Хондроциты кролика. Культивирование на полилактидных пленках в ростовой среде в течение 3 сут. Световая микроскопия, Ув. $\times 100$.

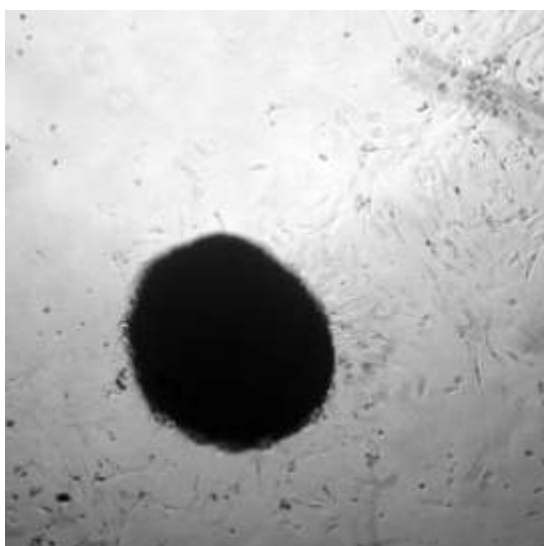


Рис. 2. Хондроциты кролика. Культивирование на полилактидных пленках в дифференцировочной среде в течение 3 сут. Световая микроскопия, Ув. $\times 100$.

В условиях культивирования в хондрогенной дифференцировочной среде на следующие сутки из основной массы клеток формировался сфероид, который сохранялся все время эксперимента в неприкрепленном к субстрату состоянии. (Рис. 2.). Сохранение сфероидом своей формы и возможность оставаться в неадгезивном состоянии может говорить о сохранении хондроцитами своих свойств, что проявляется в накоплении специфических неадгезивных белков внеклеточного матрикса при росте клеток в составе сфероидов.

Полилактидные скаффолды с нанесенными на них хондроцитами после 26-суточной инкубации в ростовой среде были изучены с помощью СЭМ. По полученным фотографиям можно было установить, что диаметр пор матрицы варьирует от 350 до 750 нм. Структура матрицы представляет собой систему сообщающихся пор, что позволяет клеткам свободно проникать внутрь матрицы и распространяться внутри ее пространства. Можно видеть, что в результате длительного культивирования поверхность полилактидной матрицы довольно плотно покрыта клетками и выработавшимся матриксом (Рис. 3).

Для количественной оценки жизнеспособности хондроцитов при росте на полилактидных скаффолдах использовали МТТ-тест. Было проведено определение относительного количества жизнеспособных хондроцитов при посеве в разных условиях по сравнению с контролем.

Были получены значения оптической плотности для следующих вариантов посева клеток: 1) - ростовая среда (контроль); 2) – кондиционированная полилактидным

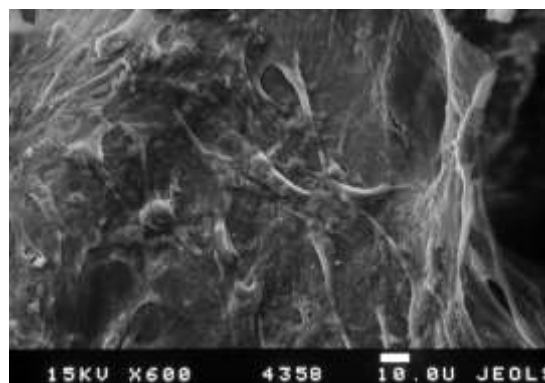


Рис. 3. Хондроциты кролика. Культивирование на полилактидных скаффолдах в ростовой среде в течение 26 сут. СЭМ.

скаффолдом в течение 1 сут среда; 3) – клетки добавлены к полилактидной матрице, находящейся в ростовой среде в течение 1 сут; 4) – клетки добавлены к полилактидной матрице, измельченной и находящейся в ростовой среде в течение 1 сут; 5) – клетки сформировали монослой в ростовой среде, сверху помещена сухая матрица; 6) – на монослой помещали предварительно выдержанный в среде скаффолд.

Статистический анализ значений оптической плотности (ОП) в разных вариантах опыта не выявил отличий от ОП контрольных вариантов: значения ошибок средних попадали в тот же доверительный интервал, значения были статистически достоверны ($P < 0,05$). Это говорит об одинаковом

количестве жизнеспособных клеток в разных условиях опыта после 7-суточной инкубации и, следовательно, об отсутствии токсичности материала для хондроцитов в разных вариантах опыта.

Выводы

Таким образом, можно сделать вывод, что полилактидные носители не являются токсичными для хондроцитов кролика и не влияют на проявление их дифференцировочных свойств. Полилактидные матрицы не оказывают влияния на жизнеспособность хондроцитов кролика и не препятствуют их пролиферации.

Список литературы

1. Brittberg M., Lindahl A., Nilsson A., Ohlsson C., Isaksson O. and Peterson L. "Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation"// The New England Journal of Medicine, 1994 - V. 331, No. 14. - P. 889–895. 10.1056/NEJM199410063311401
2. Huang B.J., Hu J.C., Athanasiou K.A. Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage // Biomaterials, 2016 – V.98 – P. 1-22. 10.1016/j.biomaterials.2016.04.018
3. Brittberg M. Cell carriers as the next generation of cell therapy for cartilage repair: a review of the matrix-induced autologous chondrocyte implantation procedure// Am J Sports Med, 2010 – V.38, No. 6 – P. 1259-1271. 10.1177/0363546509346395
4. Dewan A.K., Gibson M.A., Elisseff J.H. and Trice M.E. Evolution of Autologous Chondrocyte Repair and Comparison to Other Cartilage Repair Techniques// BioMed Research International, 2014 – V. 2014, No. 2014 – P. 1-11. 10.1155/2014/272481.
5. Пинаев Г.П., Швед Ю.А., Кухарева Л.В., Блинова М.И., Билибин А.Ю., Зорин И.М., Горюхина О.А. Способ получения резорбируемой полилактидной матрицы для культивирования и имплантации клеток, предназначенных для заживления ран, патент на изобретение RU 2464987 07.04.2011.
6. Нащекина Ю.А., Никонов П.О., Михайлов В.М., Пинаев Г.П. Зависимость заполнения стромальными клетками костного мозга трёхмерной матрицы от способа посева клеток и типа модификации поверхности матрицы// Цитология, 2014. - №56 (4). – С. 283–290.
7. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays// J Immunol Methods, 1983 – V. 16, No. 65(1-2). – P. 55-63.

Поступила в редакцию 29.05.2017

Сведения об авторах:

Копелев Павел Владимирович – ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» - студент-магистр. ФГБУН «Институт цитологии» РАН – старший лаборант-исследователь, e-mail: raha94@bk.ru.

Нащекина Юлия Александровна – ФГБУН «Институт цитологии» РАН – научный сотрудник. ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» - доцент. Кандидат биологических наук, e-mail: ulychka@mail.ru.

Александрова Светлана Алексеевна – ФГБУН «Институт цитологии» РАН – научный сотрудник. Кандидат биологических наук, e-mail: alekssvet2205@gmail.com.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 14-50-00068 «Стволовые клетки - основа клеточных технологий».