УДК 57.085.23, 57.089.67

РАЗРАБОТКА МЕТОДА МОДИФИКАЦИИ ПОЛИЛАКТИДНЫХ СКАФФОЛДОВ ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТОМ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ

Копелев П.В., Александрова С.А., Нащекина Ю.А., Блинова М.И.
ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»,
ФГБУН «Институт цитологии» РАН

CHONDROITINSULFATE-BASED MODIFICATION OF POLYLACTIC TISSUE-ENGINEERED SCAFFOLDS FOR CARTILAGE REGENERATION

Kopelev P.V., Alexandrova S.A., Naschekina Y.A., Blinova M.I.
FAEI HE "Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University", FSFIS "Institute of Cytology" RAS

Аннотация
Разработан метод нанесения хондроитинсульфата (ХС) на полилактидные матрицы. Определен процент ХС, не связавшегося с поверхностью матрицы. Установлено, что большая часть ХС сохраняется на модифицированных полилактидных пленках при культивировании клеток в стандартных условиях до 4 суток.

Ключевые слова: регенеративная медицина, тканевая инженерия, полилактидные матрицы, хондроитинсульфат, суставной хрящ, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга.

Abstract
A method of chondroitinsulfate depositing on polylactic scaffolds has been developed. The percentage of not bounded to the surface of the scaffolds chondroitinsulfate was determined. It was found that the most part of chondroitinsulfate was retained on modified polylactic films for up to 4 days when cells were cultivated on these films under standard conditions.

Keywords: regenerative medicine, tissue engineering, polylactic scaffolds, chondroitinsulfate, articular cartilage, bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells.

Введение

Одной из перспективных разработок для восстановления определенных повреждений хрящевой ткани в настоящее время является использование тканеинженерных конструкций, состоящих из носителя и клеток, в качестве имплантов. Возможное использование полилактида в качестве материала для тканеинженерных скаффолдов обусловлено тем, что для изделий из него характерны такие свойства как биосовместимость, биорезорбируемость и нетоксичность. Ранее нами были получены трехмерные полилактидные скаффолды, размер пор которых варьирует от 150 до 300 мкм [1]. В результате проведенных in vitro исследований была установлена нетоксичность таких скаффолдов для хондроцитов и мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) костного мозга [1, 2]. Было выявлено, что в присутствии материала клетки сохраняли характерную морфологию, оставались жизнеспособными, проявляли свои пролиферативные и дифференцировочные свойства. Однако в экспериментах с прямым контактом клеток и носителя было выявлено, что полилактидные скаффолды обладают низкой адгезивностью для клеток (вследствие своей высокой гидрофобности), поэтому для более активного прикрепления клеток требуется проведение дополнительных модификаций. В качестве модификаторов при создании скаффолдов для тканевой инженерии суставного хряща было предложено использовать

компонент межклеточного матрикса хрящевой ткани - хондроитинсульфат (ХС). Известно, что ХС стимулирует синтез гиалуроновой кислоты, укрепляя соединительнотканные структуры хряща, а за счет высокого отрицательного заряда в сочетании с высокой плотностью цепей хондроитинсульфата создается градиент заряда, который позволяет хрящу набухать и усиливает способность хрящевой ткани выдерживать нагрузку [3]. Также ХС участвует в межклеточном сигналинге, распознавании клеток и связывании белков межклеточного матрикса с гликопротеинами клеточной поверхности [4]. В зарубежных исследованиях также разрабатываются методики модификации полимерных скаффолдов хондроитинсульфатом [5, 6].

Цель настоящей работы состояла в разработке метода нанесения ХС на полилактидные матрицы и анализе связывания ХС с их поверхностью.

Были поставлены следующие **задачи**: 1) разработать метод нанесения ХС на полилактидные пленки; 2) отработать метод выявления ХС в растворе; 3) оценить связывание ХС с поверхностью полилактидных пленок в динамике на разных сроках инкубации.

Материалы

В работе использовали: поли(L,L)лактид с характеристической вязкостью η=4.0 дл/г (Sigma, США), хондроитинсульфат (Chondroitin 6-sulfate sodium salt from shark cartilage, C4384, Sigma, USA), первичную культуру мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) костного мозга новорожденного кролика.

Методы

Приготовление полилактидных пленок и их стерилизация. В качестве скаффолдов для культивирования клеток использовали покровные стекла диаметром 12 мм, на которые наносили раствор полилактида, растворенного в трихлорметане («Реактив», РФ), с концентрацией 2 мг/мл. Оставляли сушиться на воздухе в течение 2 сут. Приготовленные стекла стерилизовали УФ-светом в течение 1-2 ч.

Модификация пленок хондроитинсульфатом. На стерильные стекла с полилактидной пленкой наносили 100 мкл водного раствора ХС, содержащего 250 мкг ХС на 1 стекле и оставляли их до высыхания (1 сут). После высушивания стекла дополнительно стерилизовали под УФ.

Культивирование клеток. ММСК костного мозга выделяли из конечностей новорожденного кролика породы Шиншилла (питомник «Рапполово») по стандартной методике. Культивирование проводили в ростовой среде αMEM с 10% СЭК (сыворотка эмбрионов коров) в инкубаторе с 5 % CO2 при температуре 37°C. При пересеве для открепления клеток использовали смесь растворов 0,25% трипсина и 0,02% ЭДТА (Invitrogen, Великобритания).

Окрашивание хондроитинсульфата диметилметиленовым синим для количественной оценки. Готовили краситель, содержащий диметилметиленовый синий (ДМС): к 200 мл деионизованной воды добавляли 19 мл 0.1 М соляной кислоты, 0.474 г хлорида натрия, 0.608 г глицина и 3.2 мг порошка ДМС [7]. 2.5 мл раствора красителя добавляли к 100 мкл пробам, отбираемым от образцов в ходе эксперимента. Измерение оптической плотности (ОП) производили непосредственно сразу после смешивания компонентов на спектрофотометре ПЭ-5400УФ (ЭКРОС, Россия) на длине волны 525 нм.

Световая микроскопия. Прижизненное наблюдение с фотофиксацией в процессе инкубации клеток осуществляли под инвертированным микроскопом Nikon Eclipse TS100, оснащенным фотокамерой.

Результаты и обсуждение

Был предложен способ модификации полилактидных пленок хондроитинсульфатом (ХС) и изготовлены образцы (описано в разделе методы).

Для выявления ХС использовали краситель, на основе ДМС, так как он специфически связывается с сульфатированными гликозаминогликанами, такими как хондроитин сульфат, кератан сульфат, гепарансульфат и др.

Для отработки методики выявления ХС в растворе были приготовлены растворы ХС разных концентраций (от 0,5 до 250 мкг в образце объемом 1 мл) и построена калибровочная кривая (Рис.1.).

Была изучена динамика вымывания ХС с поверхности образцов в раствор. Образцы представляли собой покровные стекла и покровные стекла с полилактидными пленками, с содержанием ХС 250 мкг в каждом образце. Они помещались в лунки 24-луночного планшета и были залиты 2 мл деионизованной воды или фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Через определенные

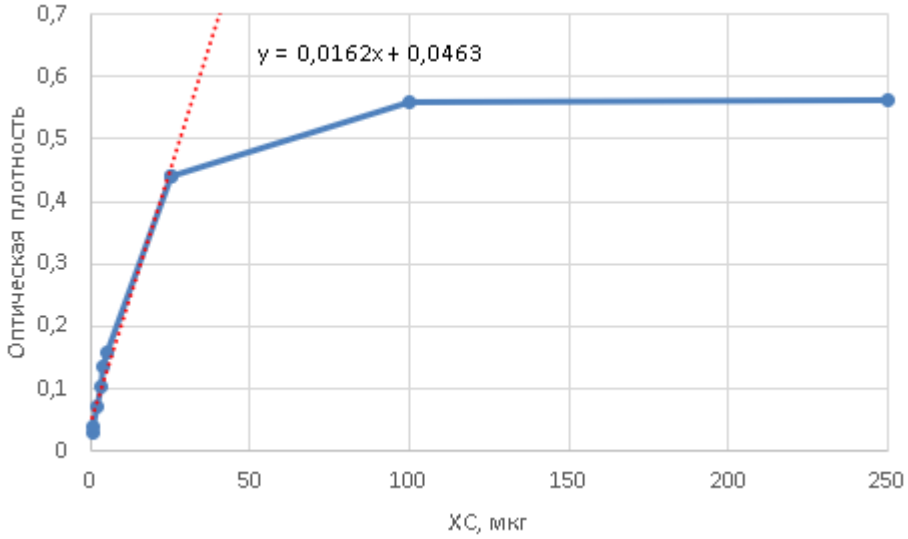

Рис. 1. Калибровочная кривая. Зависимость оптической плотности раствора от концентрации хондроитинсульфата.
Для измерений использовали линейный участок калибровочной кривой (до 25 мкг)

промежутки времени (1 ч, 2 ч, 3 ч, 1 сут) отбирали пробы объемом 100 мкл, окрашивали и определяли по ОП раствора количество ХС, вышедшего в раствор. Количество ХС было рассчитано в процентах относительно количества изначально нанесенного вещества (250 мкг).

Измерение выхода ХС в воду после изучения образцов, полученных путем нанесения ХС на стекло, через разные промежутки времени, выявило наличие 60 % вещества в растворе через 1 ч, 90 % - через 3 ч и 100 % - на следующие сутки. Измерение выхода ХС в ФСБ в течение 1 ч показало, что в случае изучения образцов только с ХС практически сразу после помещения образцов в буфер можно обнаружить 60 % ХС в буфере. И такое количество сохраняется через 1 ч. А в случае изучения

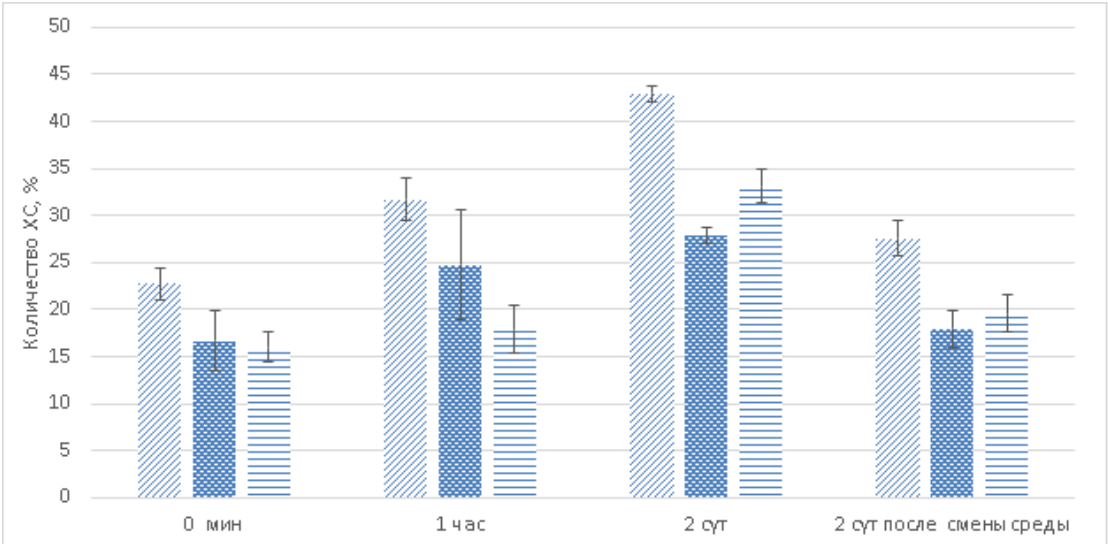

Рис. 2. Количество определяемого ХС (в % по отношению к изначально нанесенному на поверхность) в культуральной среде в динамике.
- стекло (контроль) - ММСК на стекле - ММСК на полилактиде

образцов, представляющих собой полилактидную пленку с нанесенным ХС, было обнаружено, что сразу после помещения образцов в ФСБ выявлялось всего 12 % ХС. Однако через 15 мин – уже 60 %, такое количество сохранялось и через 1 ч.

При измерении выхода ХС с образцов в полную культуральную среду было выявлено, что сразу после погружения образцов обнаруживалось 22,7 % ХС в среде, через 1 ч – 31,7%, через 2 сут – 43%. После полной смены среды – 26,2% и через 2 сут – 27, 5% (рис. 2.).

Т.к. в составе тканеинженерной конструкции обязательным компонентом являются клетки, прикрепившиеся к поверхности скаффолда, представлялось необходимым проверить, будет ли их присутствие оказывать влияние на выход ХС в среду. ММСК были посажены на аналогичные образцы в таком количестве, чтобы полностью покрыть поверхность (сформированный монослой). Измерения проводили в аналогичные промежутки времени. Было выявлено, что сразу после погружения образцов (с полилиактидом и без) в среде обнаруживалось порядка 16-17 % ХС. Через 1 ч в образцах с полилактидом – 18 % ХС, а без полилактидных пленок – 25%. Через 2 сут - порядка 30 %, а через 2 сут после смены среды – 19 и 18%, соответственно (рис. 2).

Следует отметить, что не было выявлено значений ОП в контроле при измерении содержания ХС в культуральной среде (с клетками и без них).

Заключение

Нам удалось разработать простую методику модификации полилактидных пленок хондроитинсульфатом (ХС). Для доказательства присутствия ХС на модифицированных пленках был предложен следующий метод: образцы с нанесенным ХС помещали в растворы и через разные промежутки времени оценивали его количество в растворах спектрофотометрически (после окрашивания диметилметиленовым синим). Соответственно, не выявленный в растворах ХС считался ассоциированным с полилактидной подложкой.

На первом этапе была исследована динамика выхода ХС, нанесенного на полилактидные пленки, в воду, ФСБ и культуральную среду. Так, в воде большая часть ХС (60 %) переходила в раствор в течение одного часа, к трем часам – 90%, а через сутки - все 100%. Выяснилось, что после инкубации пленок в ФСБ, большая часть ХС (60 %) также переходила в раствор в течение одного часа. В то же время после инкубации в культуральной среде, в раствор за это время выходило не более 32 % ХС и примерно такое же количество обнаружилось через 2 сут инкубации, а также после смены среды.

Кроме того, была исследована динамика поведения ХС на пленках в присутствии клеток, так как они являются неотъемлемым компонентом тканеинженерных конструкций. При культивировании ММСК на полилактидных пленках ХС обнаруживался в культуральной среде в меньшем количестве по сравнению с вариантами опыта без клеток (через 1 ч – 18 % ХС, через 2 сут - порядка 30 %, а через 2 сут после смены среды – 19 %). Таким образом, можно сделать вывод, что большая часть хондроитинсульфата сохраняется до 4 суток культивирования клеток на модифицированных ХС полилактидных пленках.

Список литературы

1. 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. Т.56, № 4. С. 283–290.

2. Копелев П.В, Нащекина Ю.А, Александрова С.А. Оценка жизнеспособности хондроцитов кролика при культивировании на полилактидных скаффолдах, предназначенных для тканевой инженерии хрящевой ткани// Бюллетень инновационных технологий. 2017. Т.1, № 2. С. 31-35.

3. Baldwin A.D, Kiick K.L. Polysaccharide-Modified Synthetic Polymeric Biomaterials// Biopolymers. 2010. V.94, № 1. P. 128–140. 10.1002/bip.21334

4. Jackson R.I, Busch S.J, Cardin A.D. Glycosaminoglycans: Molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes// Physiol Rev. 1991. V.71, № 2. P. 481–539.

5. Chang K.Y, Hung L.H, Chu I.M, Ko C.S, Lee Y.D. The application of type II collagen and chondroitin sulfate grafted PCL porous scaffold in cartilage tissue engineering// J Biomed Mater Res A. 2010. V.92, № 2. P. 712-723. 10.1002/jbm.a.32198.

6. Lee C.T, Huang C.P, Lee Y.D. Biomimetic Porous Scaffolds Made from Poly(l-lactide)-g-chondroitin Sulfate Blend with Poly(l-lactide) for Cartilage

Tissue Engineering// Biomacromolecules. 2006. V.7, № 7. P. 2200–2209. 10.1021/bm060451x

7. Farndale R.W, Buttle D.J, Barrett A.J. Improved quantitaion and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue// Biochim. Biophys. Acta. 1986. V.883, № 2. P. 173-177..

Поступила в редакцию 18.10.2017

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

Сведения об авторах:

Копелев Павел Владимирович – магистрант кафедры медицинской физики ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», старший лаборант-исследователь ФГБУН «Институт цитологии» РАН, Санкт-Петербург , e-mail: paxa94@bk.ru

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

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

Блинова Миральда Ивановна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы клеточных биотехнологий ФГБУН «Институт цитологии» РАН, Санкт-Петербург , e-mail: mira.blinova@mail.ru