

УДК 57.085.23, 57.089.67

Сравнительный анализ трехмерных полилактидных скаффолдов различной пористости, предназначенных для восстановления хрящевой ткани

Копелев П.В.^{1,2}, Нащекина Ю.А.¹, Александрова С.А.¹¹ФГБУН «Институт цитологии» РАН, Санкт-Петербург,²ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург

Comparative analysis of 3d poly(L,L-lactic) scaffolds with various porosity for cartilage tissue regeneration

Kopelev P.V.^{1,2}, Naschekina Y.A.¹, Alexandrova S.A.¹¹FSFIS "Institute of Cytology" RAS, Saint-Petersburg,²FAEI HE "Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University", Saint-Petersburg

Аннотация

Создание тканеинженерных конструкций имеет большое практическое значение в разработке новых методов терапии хряща. Отработана методика получения трехмерных полилактидных скаффолдов с порами различного диаметра. Проведен сравнительный анализ скаффолдов по признакам: количество жизнеспособных мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга в процессе культивирования; выработка клетками белков внеклеточного матрикса в процессе хондрогенной дифференцировки. Сделан выбор в пользу скаффолдов с диаметром пор 0.04 – 0.14 мм для дальнейшего использования в восстановительной терапии хрящевой ткани.

Ключевые слова: регенеративная медицина, тканевая инженерия, полилактидные скаффолды, суставной хрящ, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга, внеклеточный матрикс, хондрогенная дифференцировка, диметилметиленовый синий.

Abstract

Development of tissue-engineered constructions has a great practical importance for the creation of new experimental methods for cartilage therapy. The technique of three-dimensional polylactic scaffolds with different pore size creation was developed. Comparative analysis of following scaffold attributes was performed: the number of viable multipotent mesenchymal stromal cells of bone marrow during cultivation; production of extracellular matrix proteins during the chondrogenic differentiation. The scaffolds with a pore diameter of 0.04-0.14 mm was preferred for further cartilage tissue engineering.

Keywords: regenerative medicine, tissue engineering, polylactic scaffolds, articular cartilage, bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells, extracellular matrix, chondrogenic differentiation, dimethylmethylen blue.

Введение

В настоящее время остеоартроз является самой распространенной формой поражения суставов и причиной ухудшения качества жизни миллионов людей по всему миру. Самостоятельная регенерация хрящевой ткани затруднена вследствие отсутствия кровеносных сосудов в суставах, а также малым количеством хондроцитов в составе хрящевой ткани. Особое место среди разработок технологий по восстановлению хрящевой ткани занимают клеточные технологии, в частности, создание трехмерных конструкций из скаффолда и клеток. В качестве скаффолдов для восстановления хрящевой ткани используются

различные материалы, в том числе полилактид, который отвечает всем требованиям, предъявляемым к материалам для тканевой инженерии [1]. Ранее в нашей лаборатории были изготовлены трехмерные полилактидные скаффолды с размером пор от 0.15 до 0.3 мм в диаметре в исследованиях *in vitro* была показана их биосовместимость и нетоксичность для разных типов клеток, в частности, хондроцитов и мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) костного мозга [2, 3].

Кроме состава материала скаффолда, на функционирование клеток большое влияние может оказывать его топология поверхности и трехмерная организация. В

формировании хрящевой ткани важную роль играют межклеточные взаимодействия. Формирование плотных контактов между хондробластами, вызывающих развитие хондрогенных узелков и сфероидов, является обязательным этапом формирования хрящевой ткани [4]. Считается, что этот этап необходим для запуска экспрессии специфических белков внеклеточного матрикса (ВКМ). Поэтому важно создать условия для возможности формирования сфероидов внутри скаффолда с помощью взаимосоединяющихся пор определенного диаметра.

Цель настоящей работы состояла в создании трехмерных полилактидных скаффолдов с порами различного диаметра и проведении их сравнительного исследования по количеству жизнеспособных ММСК костного мозга кролика при росте в составе скаффолдов и выработке клетками ВКМ в ходе хондрогенной дифференцировки.

Материалы

ММСК костного мозга были получены из костного мозга новорожденного кролика породы Шиншилла (питомник «Рапполово»). Культивирование производили в ростовой среде α MEM (Lonza, Швейцария) с 10% сыворотки эмбрионов коров (СЭК) (HyClone, США) в инкубаторе с 5% CO₂ при температуре 37°C. Индукцию дифференцировки в хондрогенном направлении проводили заменой ростовой среды на индукционную - StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Life Technologies, США), с последующим культивированием в ней в течение 4 недель.

Трехмерные скаффолды для культивирования клеток изготавливали из поли(L,L)лактида (Sigma, США) с характеристической вязкостью 1.49 дл/г.

Методы

Скаффолды изготавливали методом выщелачивания [5]. Поли(L,L)лактид растворяли в хлороформе (трихлорметане) (Вектон, Россия). Далее 1.65 мл раствора с концентрацией полимера 20 мг/мл наливали в стеклянные формы диаметром 30 мм и высотой 15 мм. Затем раствор полимера покрывали до прекращения впитывания солью (NaCl), предварительно разделенной на фракции с помощью трех сит с сетками 0.04, 0.14, 0.5 мм. Оставляли сушиться на воздухе на 1 сут до полного удаления растворителя. После этого скаффолды выдерживали 1 сут в 100 мл воды SQ, затем про-

мывали проточной водой до полного вымывания кристаллов соли. После вымывания соли скаффолды высушивали в ламинарном боксе в течение 2 сут. В результате были изготовлены три варианта скаффолдов диаметром 30 мм и высотой 1.5 мм, из которых вырезали кружки диаметром 5 мм для проведения опытов. Полученные скаффолды стерилизовали в озонаторном шкафу и затем дополнительно УФ-светом в ламинарном боксе в течение 1-2 ч. Перед посевом клеток скаффолды выдерживали 30 мин в 70%-ном этаноле для смачивания, затем промывали 2 раза фосфатно-солевым буфером. Скаффолды размещали в лунках 96-луночного планшета, ММСК сажали по 75 тыс. клеток в лунку на поверхность скаффолда в 200 мкл хондрогенной среды.

Прижизненные наблюдения за культурой клеток осуществляли с помощью инвертированной световой микроскопии на микроскопе Nikon Eclipse TS100. Для визуализации клеток на непрозрачных трехмерных скаффолдах проводилась конфокальная микроскопия на микроскопе ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad, США) с предварительной окраской ядер клеток красителем DAPI FluoroShield (Vector Laboratories, США).

Для оценки количества жизнеспособных клеток использовали колориметрический метод - МТТ-тест [6]. По истечении срока культивирования производили смену ростовой среды на среду с 10% МТТ (0,5 мг/мл) и инкубировали 2 ч до формирования кристаллов формазана. Скаффолды с клетками переносили в новые 96-луночные планшеты, в каждую лунку добавляли по 300 мкл раствора диметилсульфоксида (ДМСО) и экстрагировали формазан в течение 20 мин при постоянном покачивании планшета. Раствор окрашенного ДМСО переносили в чистые лунки и определяли оптическую плотность (ОП) с помощью анализатора иммуноферментных реакций УНИПЛАН (АИФР-01) (Пикон, Россия) при длине волны 570 нм и референсной - 620 нм. Для определения количества клеток использовали калибровочную кривую, построенную по ОП известного количества клеток. По полученным данным вычисляли среднее количество жизнеспособных клеток и ошибку среднего.

Выявление характерного для хрящевой ткани ВКМ проводили колориметрическим

Таблица 1

Сопоставление фракций кристаллов соли с размером полученных пор			
Варианты ПЛ скаффолдов	1	2	3
Размер сетки сита, мм	0.5	0.14	0.04
Фракции кристаллов соли, диаметр, мм	0.5 – 1.2	0.14 – 0.5	0.04 – 0.14
Поры скаффолда, диаметр, мм	0.5 – 0.6	0.28 – 0.43	0.04 – 0.14

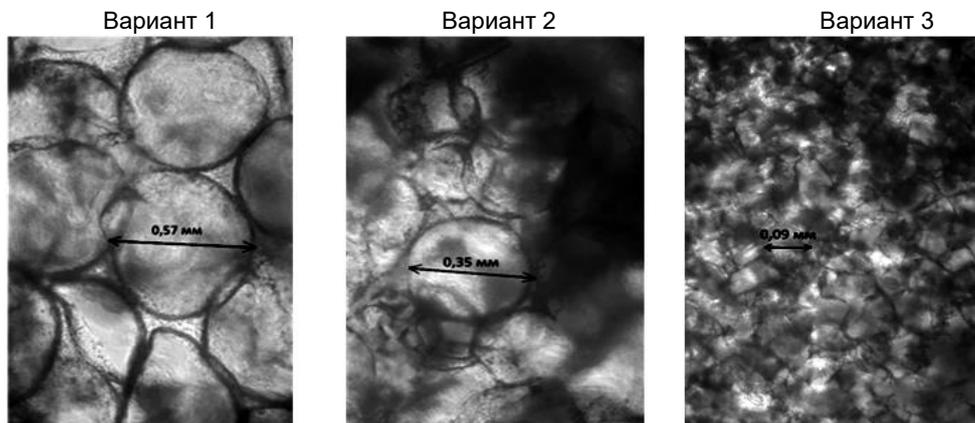


Рис.1. Трехмерные ПЛ скаффолды. Световая микроскопия, ув. $\times 100$. Над стрелкой указан диаметр поры.

методом после окрашивания диметилметиленовым синим (ДМС). ДМС представляет собой катионный краситель, который специфически связывается с сульфатированными гликозаминогликанами (хондроитин сульфат, кератин сульфат и гепарансульфат и др.) [7]. Рабочий раствор ДМС готовили по следующей методике: к 200 мл SQ воды добавляли 19 мл 0.1 М соляной кислоты, 0.474 г хлорида натрия, 0.608 г глицина и 3.2 мг порошка ДМС. Перемешивали, полученный раствор фильтровали.

ВКМ выявляли отдельно в культуральной среде и непосредственно на клетках. Затем, суммируя полученные значения, определяли общее количество ВКМ в лунках. Выявление ВКМ в среде: из лунок отбирали пробы объемом 100 мкл, добавляли к ним по 2.5 мл раствора ДМС. ОП измеряли на спектрофотометре ПЭ-5400 УФ (ЭКРОС, Россия) на длине волны 525 нм. Количество ВКМ рассчитывали с использованием калибровочной кривой, построенной по известным концентрациям хондроитин сульфата. Выявление ВКМ на клетках: ММСК на скаффолдах промывали фосфатно-солевым буфером и лизировали 1 сут при 57°C в 200 мкл буфера, содержащего 1 мг/мл протеиназы К, 1 ммоль/л йодоцетамида в 50 ммоль/л TrisрН 7.4, а также 10 мкг/мл пепстатина А, растворенного в 95%-ном этаноле. Затем отбирали 100 мкл пробы и окрашивали по методике, приведенной выше. Для расчета среднего количества и

ошибки среднего общего количества ВКМ в лунке использовали значения 4 лунок. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием программы Microsoft Office Excel 2016.

Результаты

Создание трехмерных скаффолдов с различным диаметром пор

Были изготовлены трехмерные полилактидные скаффолды с тремя разными значениями диаметра пор с целью выбрать наиболее подходящий для дифференцировки ММСК в хондрогенном направлении. Диаметр пор измеряли с помощью объект-микрометра (ОМО, ГОСТ 7513-56) и светового микроскопа Nikon Eclipse TS-100 (Рис. 1). Результаты измерений представлены в таблице 1.

Анализ распределения ММСК по ПЛ скаффолдам

Через 4 недели культивирования ММСК в хондрогенной среде, посаженных на изготовленные ПЛ скаффолды, проводили анализ формирования сфероидов и распределения клеток по внутренней поверхности скаффолдов с помощью флуоресцентной микроскопии. Можно видеть (рис. 2.), что во всех вариантах опыта ММСК сформировали сфероиды. Можно отметить разный характер сформировавшихся сфероидов.

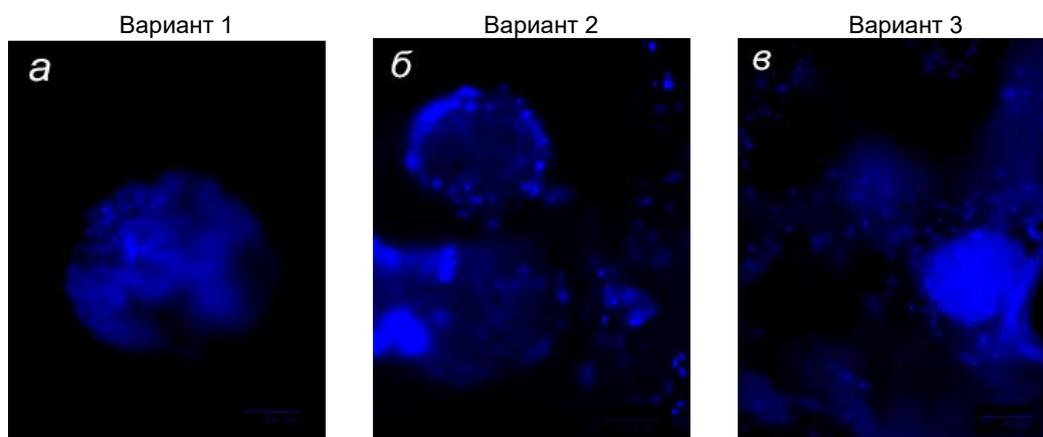


Рис. 2. Сфероиды ММСК в хондрогенной среде, 4 недели культивирования после посева на PLL скаффолды с разным размером пор. Конфокальная микроскопия, ядерный краситель DAPI.

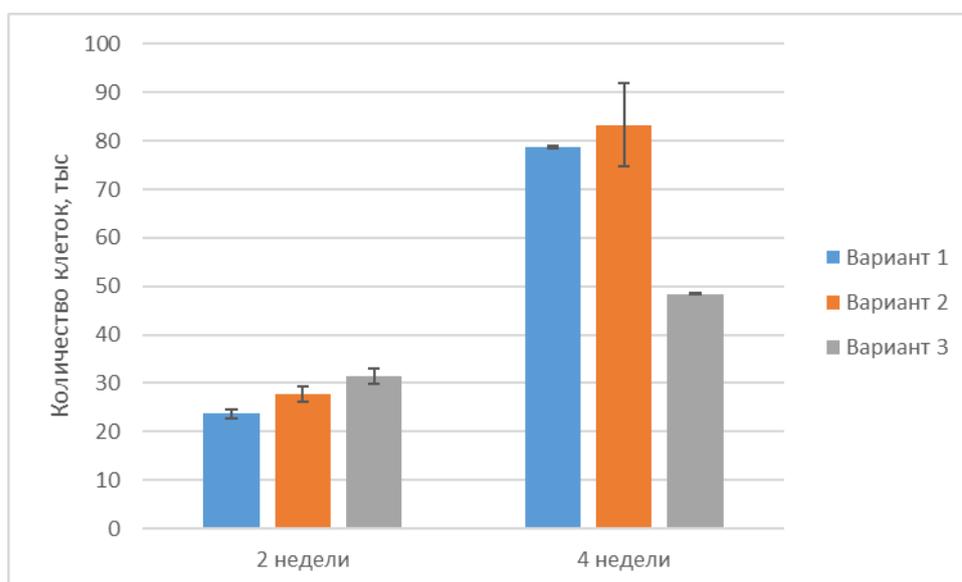


Рис. 3. Количество жизнеспособных клеток на разных сроках культивирования в составе PLL скаффолдов. МТТ-тест. Варианты скаффолдов обозначены разным цветом.

Так, при росте клеток в составе скаффолдов с самыми крупными порами, формировались крупные, рыхлые (без четкой организации) сфероиды (рис. 2а). У скаффолдов с порами среднего размера (рис. 2б) встречались сфероиды меньшего размера, более компактные. Границы сфероидов выглядели более четко. У скаффолдов с порами самого маленького размера (рис. 2в) формировались самые компактные сфероиды. Кроме роста клеток в составе сфероидов, можно было наблюдать распределе-

ние клеток по поверхности материала, выстилание внутренних и внешних поверхностей пор у всех вариантов скаффолдов.

Определение количества жизнеспособных клеток

С помощью МТТ-теста было проведено определение количества жизнеспособных клеток при культивировании их в составе PLL скаффолдов в разное время. На рис. 3 можно видеть, что после 2-недельного куль-

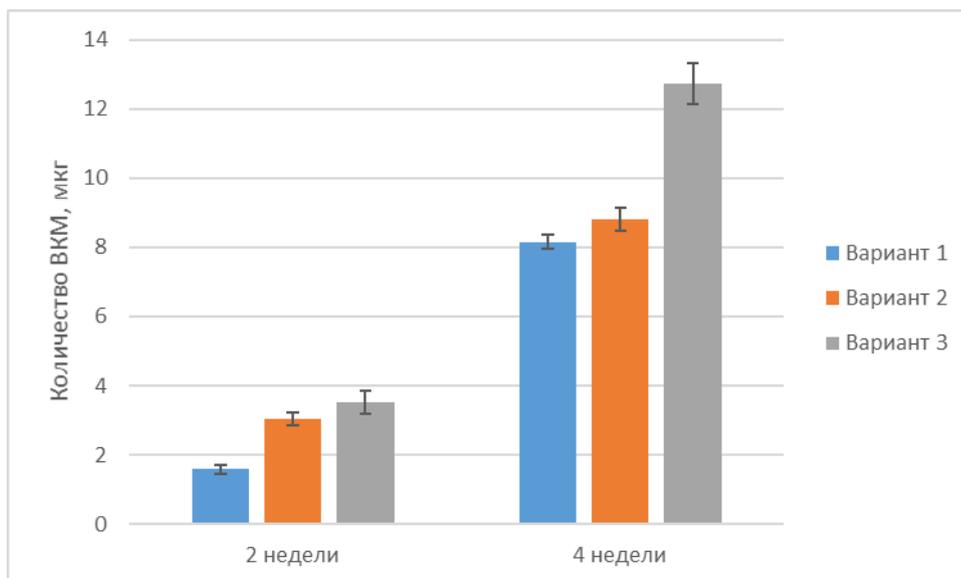


Рис. 4. Количество наработанного клетками ВКМ при культивировании на PLL скаффолдах. Варианты скаффолдов обозначены разным цветом.

тивирования во всех вариантах опыта обнаруживается примерно одинаковое количество клеток. Однако через 4 недели количество клеток возрастает, причем в первых двух вариантах – в несколько раз.

Анализ наработки внеклеточного матрикса

Выявление характерного для хрящевой ткани ВКМ было проведено колориметрическим методом через 2 и 4 недели культивирования ММСК в составе PLL скаффолдов в хондрогенной среде. Полученные данные представлены на гистограмме (Рис. 4).

Можно видеть, что уже к двум неделям культивирования наблюдаются отличия по количеству наработанного ВКМ. Больше всего его обнаружено при росте ММСК на скаффолдах со средним и маленькими размером пор (варианты 2 и 3). Через 4 недели культивирования количество белков ВКМ выросло во всех вариантах, но наибольшее количество выявлено при росте клеток на скаффолдах с диаметром пор 0.04 – 0.14 мм (вариант 3).

Обсуждение

Использование трехмерных скаффолдов позволяет максимально приблизиться к имитации микроокружения естественного хряща. Изделия из полилактида обладают сниженной адгезивностью для клеток, что способствует спонтанному объединению клеток в сфероиды. При культивировании в 3D условиях увеличивается способность ММСК собираться в сфероиды и дифференцироваться в хондрогенном направлении, при этом усиливается выработка ВКМ.

Размер пор скаффолда может оказывать влияние на качество сфероидов, их динамику функционирования в составе скаффолда. При нормальном хондрогенезе клетки собираются в группы, объединяются плотными контактами в сфероиды и вырабатывают внеклеточный матрикс в огромном количестве, являющийся основой хрящевой ткани. Поэтому важно создать условия, при котором будет наблюдаться максимальная наработка ВКМ.

В ходе настоящей работы была разработана методика создания трехмерных полилактидных скаффолдов с порами различного диаметра и проведено их сравнительное исследование по количеству жизнеспособных ММСК костного мозга кролика при росте в составе скаффолдов и выработке клетками ВКМ в ходе хондрогенной дифференцировки.

Были изготовлены трехмерные PLL скаффолды диаметром 30 мм и высотой 1.5 мм с разным размером пор: вариант 1 – 0.5 – 0.6 мм, вариант 2 – 0.28 – 0.43 мм, вариант 3 – 0.04 – 0.14 мм (в диаметре).

Анализ жизнеспособности клеток при росте в составе пор проводился с помощью флуоресцентной (конфокальной) микроскопии, которая позволяет визуализировать клетки на трехмерных образцах небольшой толщины, и с помощью МТТ-теста, который позволяет вычислить общее количество клеток без учета их распределения. Во всех вариантах опыта были отчетливо видны сформировавшиеся сфероиды из ММСК,

что свидетельствует о хондрогенной дифференцировке. Результаты анализа жизнеспособности ММСК через 2 и 4 недели культивирования в составе скаффолдов позволили сделать вывод о том, что все варианты ПЛ скаффолдов не ингибируют жизнеспособность клеток (не являются токсичными), обладают адгезивностью для ММСК и не препятствуют пролиферации клеток во время культивирования. Можно отметить, что динамика пролиферативной активности при росте ММСК в составе скаффолдов с наименьшим размером пор (вариант 3) является самой низкой. Это может быть связано с процессами, которые происходят во время дифференцировки, во время которой пролиферативная активность клеток, как правило, снижается.

Важным критерием для оценки скаффолдов является способность усиливать или ослаблять способность ММСК к дифференцировке. О степени хондрогенной дифференцировки клеток можно судить по выработке ими ВКМ. Количество ВКМ было определено с помощью колориметрического метода по выявлению сульфатированных гликозаминогликанов, которые спе-

цифически окрашиваются диметилметиленовым синим. Определяли ВКМ как в составе скаффолда (на поверхности скаффолда и клеток), так и ВКМ, который попал в среду культивирования. Было выявлено, что через 4 недели культивирования количество белков ВКМ выросло во всех вариантах, но наибольшее количество выявлено при росте клеток на скаффолдах с наименьшим размером пор - 0.04 – 0.14 мм в диаметре (вариант 3).

Сопоставляя данные, полученные разными методами, можно отметить, что наибольшее количество ВКМ наблюдается в варианте скаффолдов с самыми малыми порами, в то время как количество клеток в этом варианте меньше, чем в остальных. Такая динамика сходна с явлениями, наблюдающимися в нативном хряще, где клетки пролиферируют слабо, их основная их цель - выработка большого количества ВКМ.

Можно заключить, что вариант ПЛ скаффолда с размером пор 0.04 – 0.14 мм в диаметре является наиболее перспективным для создания трехмерного тканеинженерного эквивалента хрящевой ткани.

Список литературы

1. Hutmacher D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage // *Biomaterials*. 2000. Vol. 21, pp. 2529–2543.
2. 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.
3. 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.
4. Anderer U., Libera J. In vitro engineering of human autogenous cartilage // *J Bone Miner Res*. 2002. Vol. 17, pp. 1420–1429.

5. Hou Q., Grijpma D.W., Feijen J. Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique // *Biomaterials*. 2003. Vol. 24(11), pp. 1937-1947. doi: 10.1016/S0142-9612(02)00562-8.

6. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J Immunol Methods*. 1983. Vol. 65(1-2), pp. 55-63.

7. Coulson-Thomas V.J., Gesteira T.F. Dimethylmethylene Blue Assay (DMMB). Bio-protocol. 2014. Vol. 4(18), doi: 10.21769/BioProtoc.1236.

Поступила в редакцию 12.07.2018

Сведения об авторах:

Копелев Павел Владимирович – студент магистратуры кафедры Медицинская Физика Санкт-Петербургского политехнического университета имени Петра Великого; старший лаборант-исследователь Лаборатории Клеточных Биотехнологий Центра Клеточных Технологий Института Цитологии РАН. E-mail: raха94@bk.ru

Нащекина Юлия Александровна - кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Группы Тканевой Инженерии Центра Клеточных Технологий Института Цитологии РАН. E-mail: ulychka@mail.ru

Александрова Светлана Алексеевна - кандидат биологических наук, научный сотрудник Лаборатории Клеточных Биотехнологий Центра Клеточных Технологий Института Цитологии РАН. E-mail: alekssvet2205@gmail.com

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