

СТВОРЕННЯ ТРИВИМІРНОГО ЕКВІВАЛЕНТА ХРЯЩА *IN VITRO*: КІНЕТИКА РОСТУ ХОНДРОЦИТІВ ТА АГАРОЗНИЙ ГІДРОГЕЛЬ ЯК НОСІЙ

С. С. Страфун¹, Д. О. Зубов², О. А. Костогряз¹, Р. Г. Васильєв²

¹ДУ "Інститут травматології та ортопедії АМН України", м. Київ

²ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України", м. Київ

THREE-DIMENSIONAL CARTILAGE TISSUE ENGINEERING IN VITRO: KINETICS OF CHONDROCYTE GROWTH AND AGAROSE HYDROGEL-BASED SCAFFOLD

S. S. Strafun, D. O. Zubov, O. A. Kostobryz, R. H. Vasiliev

In the paper the biotechnology aspects of dog chondrocyte cell culture are considered, the effectiveness of cultured cell type as well as the basic parameters of cell growth kinetics are studied. The manufacturing method of 3D cell scaffold in form of 2% agarose hydrogel seeded with cultured chondrocytes for the purpose of cell therapy of articular cartilage defects in the experiment is described.

Key words: articular cartilage, chondrocyte culture, agarose gel.

СОЗДАНИЕ ТРЕХМЕРНОГО ЭКВИВАЛЕНТА ХРЯЩА *IN VITRO*: КИНЕТИКА РОСТА ХОНДРОЦИТОВ И АГАРОЗНЫЙ ГИДРОГЕЛЬ КАК НОСИТЕЛЬ

С. С. Страфун, Д. А. Зубов, О. А. Костогряз, Р. Г. Васильев

В статье рассматриваются биотехнологические аспекты культивирования хондроцитов собаки, изучается эффективность культивирования данного клеточного типа, основные параметры кинетики роста. Описывается методика изготовления трехмерного клеточного носителя — 2% агарозного геля, засеянного культивированными хондроцитами в целях клеточной терапии дефектов суставного хряща в эксперименте.

Ключевые слова: суставной хрящ, культивирование хондроцитов, агарозный гель.

Вступ

Відомо, що *ушкоджений суглобовий хрящ* володіє низькою здатністю до репаративної регенерації, у зв'язку з чим *проблема відновлення його дефектів* стає досить актуальною, тому до цієї клінічної патології залучаються нові технології лікування, зокрема методами клітинної терапії та тканинної інженерії.

Першою клітинною технологією, спрямованою на відновлення ушкоджень суглобового хряща, став метод аутологічної трансплантації хондроцитів, що був розроблений у 1994 р. М. Brittberg [11]. Спочатку ця техніка являла собою імплантацію суспензії культивованих аутологічних хондроцитів під періостальну заплатку. На сьогодні ця методика набула подальшого розвитку з генерацією біотехнологічних продуктів другого покоління, що представлені тривимірними конструкціями на основі клітин та компонентів матриксу. На сьогодні цією біотехнологічною послугою для лікування травматичних ушкоджень суглобового хряща скористалося понад 50 тис. чоловік по всьому світу, переважно з гарними клінічними результатами [5].

Тим не менш, **основними проблемними питаннями**, що виникають при розробці успішних технологій створення хрящового еквівалента *ex vivo*, на нашу думку, є такі.

1. Джерела клітин: які саме клітини є найбільш ефективними в аспекті хондрогенезу *in situ* і реституції

хрящових дефектів тканиною, близькою до нативного хряща? У якості таких клітин наразі використовують хондроцити (не тільки одержані з суглобового гіалінового, але й з еластичного хряща різної локалізації), а також мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК) кісткового мозку та жирової тканини. При виборі варіанта клітин для трансплантації в хрящовий дефект, безсумнівно, потрібно керуватися доступністю клітинного матеріалу в кожному клінічному випадку. Наприклад, якщо мова йде про хірургічне втручання на колінному суглобі, то слід забрати паралельно із втручанням біоптат хрящової тканини з оточуючої до дефекту або ж неушкодженої ненавантажуваної зони суглобової поверхні для одержання культури хондроцитів. Вочевидь, що оптимальними клітинами для заміщення хрящових дефектів є культивовані хондроцити, отримані з самої хрящової тканини, які певний період субкультивування знаходяться в анаболічному стані до настання феномену дедиференціювання хондроцитів у культурі [6] та які в нормі скоріше реалізують *in vivo* свої гістогенетичні потенції до хондрогенезу.

2. Які клітини доцільно пересаджувати в хрящовий дефект? Некомітовані ММСК (з припущенням про те, що тканинне мікрооточення в ділянці трансплантації спрямує пересаджені клітини до хондрогенезу), або комітовані клітини, що отримали сигнал до диференціювання в хондроцити в культурі або в процесі виготовлення носія, що містить, крім клітин, відомі фактори хондрогенезу.

3. Проблема інтеграції трансплантата з поверхнею дефекту хряща, тобто яким чином тривимірний носій з клітинами може бути інтегрований до раннього ложа по всій поверхні дефекту. Також необхідно визначитися з тим, що доцільніше пересаджувати: носій з клітинами зі задалегідь змодельованою формою дефекту (виготовлення носія за шаблоном або формою дефекту безпосередньо в ході операції), або ж найбільш ефективною виявиться самоорганізація трансплантата безпосередньо в дефекті при з'єднанні компонентів носія і клітин — це так звані хондроіндуктивні “*smart scaffolds*”.

У зв'язку зі згаданими аспектами, нами відпрацьована технологія експансії хондроцитів та створення хрящового еквівалента на основі агарозного гідрогелю для подальшого закриття поверхневих та повношарових дефектів суглобового хряща в експерименті в собаки. На цьому етапі як джерело клітин для культивування та подальшої терапії нами обрані хондроцити вушної раковини. У запропонованій статті висвітлено деякі біотехнологічні аспекти культивування цього типу клітин та виготовлення тривимірного носія для них на основі біосумісного, термореверсивного та хондрокондуктивного агарозного гідрогелю, який наразі широко використовується в сучасних дослідженнях з вивчення біології хрящової тканини [4].

Матеріали і методи

Культура хондроцитів

Ізолювання хондроцитів з хряща вушної раковини собаки ($n = 4$, $M_m = 3,0$ г) проводили за загально прийнятими методиками [2, 7, 9, 10]. Тобто, для ферментативного дезагрегування тканинного біоптату використовували 0,2% розчин колагенази IA (Sigma, США). Отримані клітинні суспензії висівали в культуральні флакони (Corning, США) площею 25 см^2 зі щільністю посіву $4 \times 10^4 / \text{см}^2$.

Культивування хондроцитів проводили в суміші поживного середовища DMEM/F12, 1:1 (Sigma, США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (Sigma, США), 2 мМ L-глутаміну (Sigma, США) та по 100 МО/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину (Sigma, США), у CO_2 -інкубаторі (Joan, Франція) при 37°C і 5% атмосфері CO_2 та насичуючій вологості. Зміна середовища проводилася кожну 3–4 добу культивування.

Пасирування, або субкультивування, проводилося з використанням суміші розчинів 0,05% трипсину, 0,02% EDTA (Біотестмед, Україна) у PBS, pH 7,4 (Sigma, США). Максимальний коефіцієнт пасирування — 1:6.

КУО-аналіз (колонієутворюючі одиниці)

Процес колонієутворення досліджуваного типу клітин вивчали шляхом посіву 100 клітин на чашку Петрі ($\varnothing 100$ мм, Costar, США) у поживному середовищі, що містило DMEM/F12, 1:1 (Sigma, США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (Sigma, США), 2 мМ L-глутаміну (Sigma, США) та по 100 МО/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину (Sigma, США). Культивували в CO_2 -інкубаторі (Joan, Франція) при 37°C і 5% атмосфері CO_2 та насичуючій вологості протягом 14 діб

[3, 10]. Надалі колонії фарбували кристалічним фіолетовим та підраховували. Ефективність посіву (*PE, plate efficiency, %*) визначали за формулою:

$$PE, \% = n_{\text{кол.}} / n_{\text{клит.}} \times 100, \quad (1)$$

де $n_{\text{кол.}}$ — кількість сформованих колоній; $n_{\text{клит.}}$ — кількість посіяних клітин.

Кінетика росту клітинних популяцій культивованих хондроцитів

Число клітинних подвоень у популяції (n) та час подвоєння клітинної популяції (t) за умов, що остання знаходиться у фазі логарифмічного росту в межах стандартної кривої росту клітинної популяції, визначали за загально прийнятими формулами [3]:

$$\begin{aligned} n &= C \lg (X_k / X_0) & (2) \\ t &= T / C \lg (X_k / X_0), & (3) \end{aligned}$$

де C — константа переведення логарифму в десятковий логарифм для клітин, що культивуються; X_0 — число посіяних клітин; X_k — число нарощених клітин; T — тривалість фази логарифмічного росту культури клітин.

Виготовлення агарозного гідрогелю з культивованими клітинами

Для приготування 2% агарозного гідрогелю з культивованими хондроцитами використовували агарозу з показниками міцності для 1% гелю ≥ 1200 г/см² та точкою гелеутворення $36 \pm 1,5^\circ\text{C}$ (Sigma, США) та поживне середовище DMEM-HG (з 4,5 г/л глюкози, PAA, Німеччина). Полімеризований агарозний гідрогель виготовляли в лунках 24-лункової плашки (Corning, США) з концентрацією 107 клітин/мл/лунку [1]. Ізоляцію хондроцитів з гелю проводили 0,02% розчином EDTA (хелатуюча речовина) та перевіряли на життєздатність методом фарбування 0,4% розчином трипанового синього.

Візуалізація клітин та культур з використанням методів інвертованої мікроскопії

Візуалізацію (методами інвертованої мікроскопії у світлі, що проходить, і фазово-контрастної мікроскопії) і фотодокументування культур клітин проводили за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40C (Zeiss, Німеччина), програми з обробки зображення AxioVision Rel. 4.8 (Zeiss, Німеччина) і камери PowerShot G10 (Canon, США). Клітинні препарати і культури попередньо фарбувалися кристалічним фіолетовим та мікроскопувалися при 100-разовому збільшенні.

Статистична обробка результатів

Кількісні характеристики випадкових величин представлені у вигляді середніх значень (M) та стандартних помилок середніх значень ($\pm m$). Значимість розбіжностей показників оцінювалася за t -критерієм Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Культура хондроцитів

Апробовано та оптимізовано методику ізоляції клітин — хондроцитів з хряща вушної раковини собаки

Таблиця

Параметри кінетики росту клітинних популяцій хондроцитів (фаза логарифмічного росту) протягом 4-х пасажів

Площа культурального флакону	X_0 , $\times 10^5$	X_n , $\times 10^5$	T, год	n	t, год
Хондроцити, 25 см ²	0,92	8,6	174±15,1*	3,2	54,0

* p<0,05.

за допомогою ферментативного методу. Ізоляція колагеназою IA виявилася ефективною при концентрації 0,2% та часу ферментації 60 хв. Одержані культури хондроцитів субкультивували до п'ятого пасажу, що було достатньо для одержання терапевтично значимої кількості клітин ($0,5-1 \times 10^8$ протягом 3–4-х пасажів), та були збережені в рідкому азоті. Культивування проводилося за стандартних умов із застосуванням поживного середовища, що містило DMEM/F12 та 10% ембріональної телячої сироватки. Максимальний коефіцієнт пасирування, за умов одержання активно проліферуючих культур, становив 1:6.

У середньому, з 3,0 г хряща виділялося $4,6 \times 10^6$ хондроцитів. Первинно виділені клітини після адгезії до культурального флакону починали проліферувати з 2-ї доби. Морфологічно хондроцити в первинній культурі мали вигляд розшарованих округлих епітеліодних клітин з повільною проліферацією, які формували клітинні кластери (рис. 1а). Несконфлюентні культури цього клітинного типу склалися з невеликої кількості клітинних кластерів-колоній, витягнутих у довжину, або три- і багатограних, що містили різну кількість клітин (до 30), деякі кластери зливалися. Таку притаманну культивованим хондроцитам морфологію клітини зберігали протягом п'ятих пасажів (рис. 1б, в) і не змінювали на фібробластодну — ознака, характерна для хондроцитів у дедиференційованому стані.

КУО-аналіз

Формування колоній на чашках Петрі при низьких посівних концентраціях клітин (наприклад, 100 клітин на чашку Петрі), або, іншими словами, визначення *ефективності посіву* (PE, %) є переважним методом аналізу проліферації клітин у культурі та їхнього виживання. Такий підхід демонструє різницю в швидкості росту в межах популяції та виявляє різницю в зміні швидкості росту (розмір колонії) та виживання клітин (число колоній). При посіві клітинної суспензії по чашках Петрі в низькій концентрації клітини зростають як дискретні колонії. Число цих колоній може бути використаним для відображення ефективності культивування обраного типу клітин [3].

Нами було досліджено колонієутворюючий потенціал хондроцитів на другому пасажі методом КУО-аналізу згідно з протоколом D. Proctor для стромальних клітин [10]: так, на 100 клітин у середньому за 14 діб утворювалося $49,4 \pm 3,5$ колоній. Усього було 5 пасажів: на першому пасажі утворювалося 59 колоній, на другому — 40, на третьому — 49, на четвертому — 44, на п'ятому — 55 колоній; ефективність посіву хондроцитів становила 49%.

Кінетика росту культивованих хондроцитів

Найважливішими параметрами оцінки ефективності нарощування клітин *in vitro* є такі параметри кінетики росту, як *число клітинних подвоєнь* у популяції та *час подвоєння клітинної популяції* за умов, що остання знаходиться у фазі логарифмічного росту в межах стандартної кривої росту клітинної популяції. Під терміном "ріст клітин" мається на увазі збільшення числа клітин [3].

Як можна бачити з розрахованих даних у таблиці, число клітинних подвоєнь, або кількість випадків

реплікації (n), у популяціях хондроцитів протягом чотирьох пасажів становило в середньому 3,2. Час подвоєння клітинної популяції хондроцитів — це час, протягом якого відбувається подвоєння чисельності або маси популяції (t), становив у середньому 54 год.

Виготовлення агарозного гідрогелю як тривимірного носія для культивованих хондроцитів

Приготований в асептичних умовах 4% рідкий розчин агарози з температурою 37°C у поживному середовищі DMEM-HG швидко та ретельно змішували 1:1 з суспензією культивованих хондроцитів 2-го пасажу та розливали по лункам 24-лункової плашки до полімеризації. У результаті одержували полімеризований за кімнатної температури 2% агарозний гідрогель з концентрацією 10^7 клітин/мл/лунку (рис. 2). Полімеризований гелі з клітинами в лунках заливали по 1 мл поживного середовища DMEM-HG та культивували в CO₂-інкубаторі за 37°C протягом 14 діб з повною зміною ростового середовища 2 рази на тиждень. Надалі клітини ізолювали з агарозного гелю за допомогою 0,02% розчину ЕДТА (розчину Версену) та оцінювали їхню життєздатність методом фарбування трипановим синім, яка становила 93,7%.

Висновки

Відпрацьовано методику ферментативної ізоляції хондроцитів хряща вушної раковини собаки за допомогою 0,2% розчину колагенази I типу, що дозволило, в середньому, з 1 г тканини одержати $1,5 \times 10^6$ клітин.

Показано можливість культивування хондроцитів протягом п'ятих пасажів, що було достатньо для одержання терапевтично значимої кількості клітин ($0,5-1 \times 10^8$ протягом 3–4-х пасажів).

Притаманну культивованим хондроцитам морфологію клітини зберігали протягом п'ятих пасажів та не змінювали на фібробластодну, яка є ознакою культивованих хондроцитів у дедиференційованому стані.

Ефективність посіву хондроцитів на другому пасажі, виявлена в ході КУО-аналізу, становила 49%.

При вивченні показників кінетики росту клітинних популяцій хондроцитів було виявлено, що число клітинних подвоєнь протягом чотирьох пасажів становило в середньому 3,2, а час подвоєння клітинної популяції хондроцитів становив у середньому 54 год.

Відпрацьовано методику виготовлення тривимірного носія для культивованих хондроцитів на основі 2% агарозного гідрогелю, що містить 10^7 клітин/мл. Життєздатність клітин після культивування в гелі протягом 14-ти діб становила 93,7%.

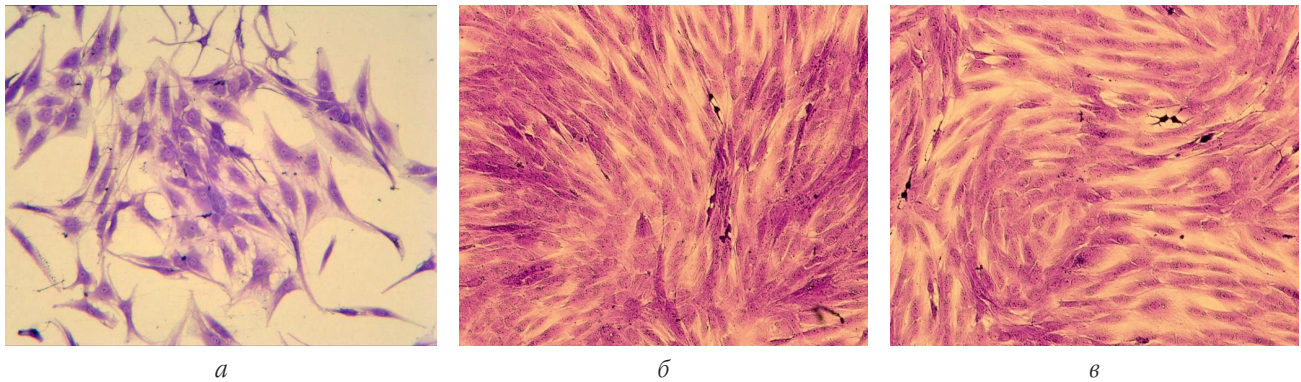


Рис. 1. Культура хондроцитів з хряща вушної раковини собаки: *a* — первинна неконфлюентна; *б* — конфлюентна, перший пасаж; *в* — конфлюентна, п'ятий пасаж; фарбування кристалічним фіолетовим; $\times 100$

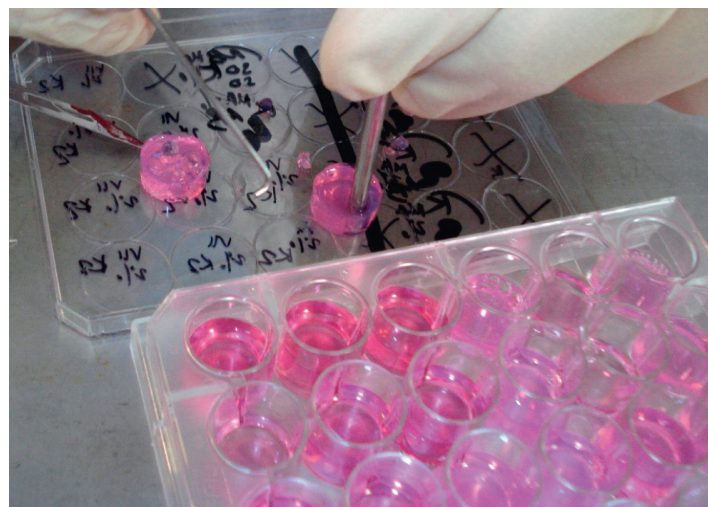


Рис. 2. Агарозний гідрогель з культивованими хондроцитами (10^7 клітин/мл/лунку)

Література

1. Наш перший досвід хірургічного лікування посттравматичного дефекту суглобового хряща колінного суглоба аутологічними хондроцитами / М.Л. Анкін, О.А. Костогриз, В.К. Гринь [та ін.] // Літопис травматол. та ортопед. — 2008. — № 1–2. — С. 136–138.
2. Пат. 70 589 А Україна, МПК7 А 61 В 17/322. Спосіб лікування дефектів і дегенеративних захворювань хряща із застосуванням тривимірного 3-D еквівалента хряща, змодельованого на основі *in vitro* культивованих хондроцитів, що містяться у підкладках натурального або синтетичного походження / Зубов Д. О., Попандотуло А.Г., Корчак О.М. [та ін.]; заявник та патентотримувач ІНВХ ім. В.К. Гусака АМНУ. — № 20 031 211 484; заявл. 12.12.03; опубл. 15.10.04, Бюл. № 10.
3. Фрешни Р.Я. Культура животної клітки : практическое руководство / Р.Я. Фрешни; пер. 5-го англ. изд. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. — 691 с.
4. Benya P.D. Dedifferentiated chondrocytes re-express the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels / P.D. Benya, J.D. Shaffer // Cell. — 1982. — Vol. 30. — P. 215–224.
5. Brittberg M. Cartilage surgery : an operative manual / M. Brittberg, W. Gersoff. — Elsevier Saunders, 2011. — 320 p.
6. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes / Marlovits S., Hombauer M., Truppe M. [et al.] // J. Bone Jt Surg. Br. — 2004. — Vol. 86, № 2. — P. 286–295.
7. Gareth E. Jones. Human cell culture protocols / Gareth E. Jones. — Totowa, New Jersey : Humana Press, 1996. — 545 p.
8. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / Dominici M., Blanc K. Le, Mueller I. [et al.] // Cytotherapy. — 2006. — Vol. 8, № 4. — P. 315–317.
9. Phenotypic stability of articular chondrocytes *in vitro* : the effects of culture models, bone morphogenetic protein 2, and serum supplementation / Stewart M. C., Saunders K. M., Burton-Wurster N. [et al.] // J. Bone Miner. Res. — 2000. — Vol. 15, № 1. — P. 166–174.
10. Prockop D.J. Mesenchymal stem cells : methods and protocols / Prockop D.J., Pbinney D. G., Bunnell B. A. — Totowa, NJ : Humana Press, 2008. — 192 p.
11. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation / Brittberg M., Lindahl A., Nilsson A. [et al.] // N. Engl. J. Med. — 1994. — Vol. 331, № 14. — P. 889–895.