

УДК 619:602:611.018.3:617.3

**Зубов Д.О.**, к.б.н. ©

ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”;

**Костогриз О.А.**, к.б.н.

ДУ “Інститут травматології та ортопедії НАМН України”;

**Солодуха О.В.**, аспірантка кафедра хірургії ім. проф. І.О. Поваженка;**Журба В. І.**, аспірантка кафедра фізіології, патофізіології та імунології тварин

## **ВИГОТОВЛЕННЯ ТРИВИМІРНОГО МАТРИКСУ НА ОСНОВІ АГАРОЗНОГО ГІДРОГЕЛЮ ДЛЯ КУЛЬТИВОВАНИХ ХОНДРОЦИТІВ**

*У статті розглядаються біотехнологічні аспекти культивування хондроцитів собаки, вивчається ефективність культивування цього клітинного типу, основні параметри кінетики клітин. Описується методика виготовлення тривимірного клітинного носія – 2%-го агарозного гелю, засіяного культивованими хондроцитами для цілей клітинної терапії дефектів суглобового хряща у досліді.*

**Ключові слова:** собаки, хондроцити, тривимірний гідрогель

**Вступ.** У наш час у ветеринарній та гуманній медицині ведеться активний пошук оптимальних методів лікування травматологічних и дегенеративних пошкоджень гіалінового хряща колінного суглоба. Відомо, що хрящова тканина має знижену здатність до регенерації. В ній відсутні кровоносні та лімфатичні судини, нерви, а живлення здійснюється дифузно за рахунок синовіальної рідини. Тому тільки при периферичних пошкодженнях в ділянках, прилеглих до синовіальної оболонки, спостерігають процес гістотипового відновлення гіалінової хрящової тканини. При глибоких пошкодженнях, сполучених із кістково-мозковим каналом, забезпечується міграція в ділянку дефекта ММСК (мультипатентні мезанхімальні стромальні клітини) з кісткового мозку, які можуть служити клітковим джерелом для регенерації. Але найчастіше зруйнований гіаліновий хрящ якщо і відновлюється, то з утворенням фіброзної (волокнистої) хрящової тканини, яка істотно відрізняється архітектонікою, біохімічним складом матрикса та механічними властивостями.

Новітніми підходами у лікуванні набутих дефектів хряща є імплантація інертних замінників, обробка лікарськими препаратами чи компонентами матрикса з метою місцевої стимуляції тканинної регенерації, аутологічна пересадка клітин чи тканин, чи *in vitro* виробництво тканини або тканинних еквівалентів для імплантації [5].

Першою клітинною технологією, спрямованою на відновлення ушкоджень суглобового хряща став метод аутологічної трансплантації хондроцитів (АТХ), що був розроблений в 1994 р. М. Brittberg [11]. Спочатку ця техніка являла

собою імплантацію суспензії культивованих аутологічних хондроцитів під періостальну заplatку. На сьогодні ця методика набула подальшого розвитку з генерацією біотехнологічних продуктів другого покоління, що представлені тривимірними конструкціями на основі клітин та компонентів матриксу.

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

1. Джерела клітин: які саме клітини є найбільш ефективними в аспекті хондрогенезу *in situ* і реституції хрящових дефектів тканиною, близької 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 оперативне 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, котрі певний період субкультивування знаходяться в анаболічному стані до настання феномену дедиференціювання хондроцитів у культурі [6], та котрі 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 із клітинами може бути інтегрований до раньового ложа по всій поверхні дефекту. Також необхідно визначитися з тим, що доцільніше пересаджувати: носій із клітинами із заздалегідь 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 еквіваленту на основі агарозного гідрогелю для подальшого закриття поверхневих та повношарових дефектів суглобового хряща в експерименті в собаки. На даному етапі в якості джерела клітин для культивування та подальшої терапії нами обрані хондроцити вушної раковини. В запропонованій статті висвітлено деякі біотехнологічні аспекти

культивування даного типу клітин та виготовлення тривимірного носія для них на основі біосумісного, термореверсивного та хондрокондуктивного агарозного гідрогеля, котрий наразі широко використовується в сучасних дослідженнях з вивчення біології хрящової тканини [4].

#### **Матеріали та методи.**

##### *Культури хондроцитів*

Ізолювання хондроцитів (ХЦ) 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 ІА (Sigma, США). Отримані клітинні суспензії висівали в культуральні флакони (Corning, США) площею  $25 \text{ cm}^2$  з щільністю посіву  $4 \times 10^4/\text{cm}^2$ .

Культивування ХЦ 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), в CO<sub>2</sub>-інкубаторі (Joan, Франція) при 37°C і 5% атмосфері CO<sub>2</sub> та насичуючій вологості. Зміна середовища проводилася кожну 3-4 добу культивування.

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

##### *КУО-аналіз (колонієутворюючі одиниці)*

Процес колонієутворення досліджуваного типу клітин вивчали шляхом посіву 100 клітин на чашку Петрі (Ø100 мм, Costar, США) в ростовому 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<sub>2</sub>-інкубаторі (Joan, Франція) при 37°C і 5% атмосфері CO<sub>2</sub> та насичуючій вологості протягом 14 діб [3, 10]. Надалі колонії фарбували кристалічним фіолетовим та підраховували. Ефективність посіву (PE, plate efficiency, %) визначали за формулою:

$$PE, \% = n_{\text{колоній}} / n_{\text{клітин}} \times 100 \quad (1),$$

де  $n_{\text{колоній}}$  – кількість сформованих колоній;  $n_{\text{клітин}}$  – кількість посіяних клітин.

##### *Кінетика росту клітинних популяцій культивованих хондроцитів*

Число клітинних подвоєнь в 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]:

$$n = C \lg (X_k / X_0) \quad (2),$$

$$t = T / C \lg (X_k / X_0) \quad (3),$$

де  $C$  – константа переведення логарифму в десятичний логарифм для клітин, що культивуються;  $X_0$  – число посіяних клітин;  $X_k$  – число нарощених клітин;  $T$  – тривалість логарифмічної фази росту культури клітин.

*Виготовлення агарозного гідрогелю з культивованими клітинами*

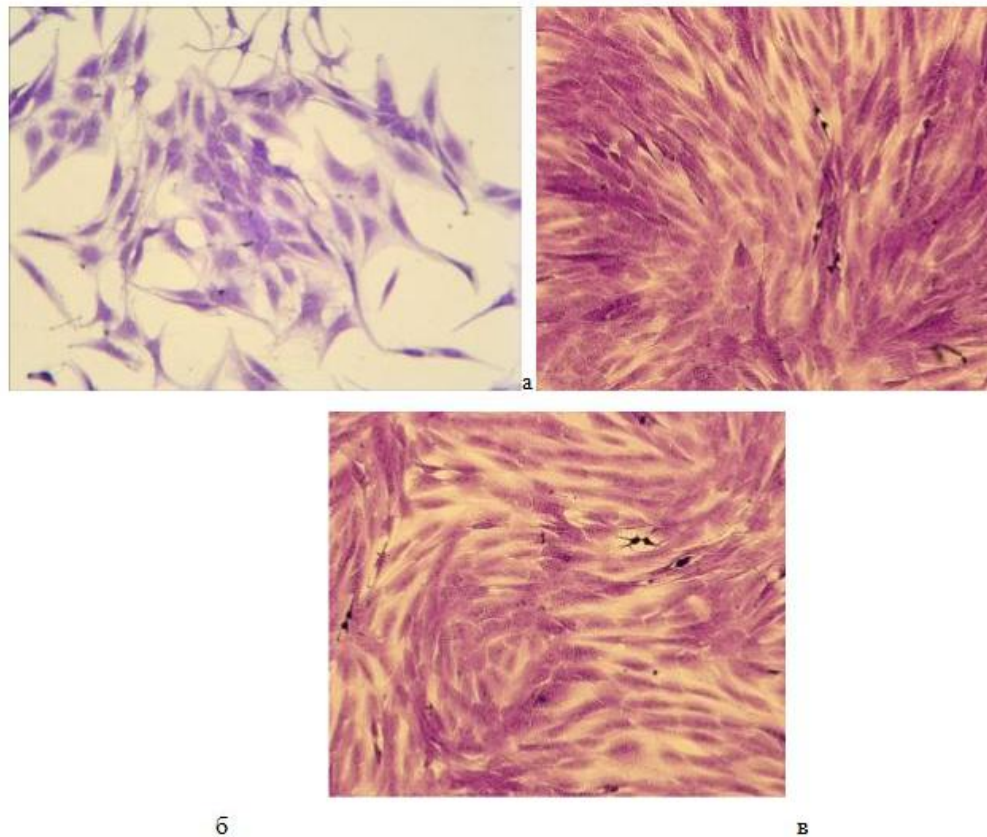
Для приготування 2% агарозного гідрогелю з культивованими хондроцитами використовували агарозу з показниками міцності для 1% гелю  $\geq 1200$  г/см<sup>2</sup> та точкою гелеутворення  $36 \pm 1,5^\circ\text{C}$  (Sigma, США) та поживне середовище DMEM-HG (з 4,5 г/л глюкози, PAA, Німеччина). Полімеризований агарозний гідрогель виготовляли в ямках 24-ямкової плашки (Corning, США) з концентрацією  $10^7$  клітин/мл/лунку [1]. Ізоляцію хондроцитів з гелю проводили 0,02% розчином ЕДТА (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 в 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 фарбували кристалічним фіолетовим та мікроскопувалися при 100-разовому збільшенні.

*Методи статистичної обробки 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. Апробовано та оптимізовано методику ізоляції клітин – хондроцитів з хряща вушної раковини собаки за допомогою ферментативного методу. Ізоляція колагеназою IA виявилася ефективною при концентрації 0,2% та часу ферментації 60 хв. Одержані культури ХЦ 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 ростового середовища, що містило DMEM/F12 та 10% ембріональної телячої сироватки. Максимальний коефіцієнт пасирування, за умови 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 епітелоїдних клітин з повільною проліферацією, котрі формували клітинні кластери (рис. 1 а). Неконфлуентні культури цього клітинного типу склалися з невеликої кількості клітинних кластерів-колоній, витягнутих в довжину, або трьох-багатогранних, що містили різну кількість клітин (до 30), деякі кластери зливалися. Таку притаманну культивованим хондроцитам морфологію клітини зберігали протягом п'ятих пасажів (рис. 1 б, в) та не змінювали на фібробластоїдну – ознака, характерна для хондроцитів в дедиференційованому стані.



**Рисунок 1** – Культура хондроцитів з хряща вушної раковини собаки: а – первинна неконфлуентна; б – конфлуентна, перший пасаж; в - конфлуентна, п'ятий пасаж; зб.  $\times 100$ ; фарб. кристалічним фіолетовим.

*КУО-аналіз.* Формування колоній на чашках Петрі при низьких посівних концентраціях клітин (напр., 100 клітин/чашку Петрі), або, іншими словами, визначення ефективності посіву (РЕ, %), 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 використано для відображення ефективності культивування обраного типу клітин [3].

**Результати дослідження.** Нами було досліджено колонієутворюючий потенціал ХЦ на 2-му пасажі методом КУО-аналізу згідно з протоколом D. Prosser для стромальних клітин [10]: так, на 100 клітин у середньому за 14 діб утворювалося  $49,4 \pm 3,5$  колоній,  $n=5$ , а ефективність посіву хондроцитів складала близько 49% (табл. 1).

Таблиця 1

**Кількість утворених колоній та ефективність посіву хондроцитів на 100 клітин на 14-ту добу культивування, 2-й пасаж**

	ХЦ, число колоній
1	59,0
2	40,0
3	49,0
4	44,0
5	55,0
M	49,4
±m	3,5
PE, %	49
n	5

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

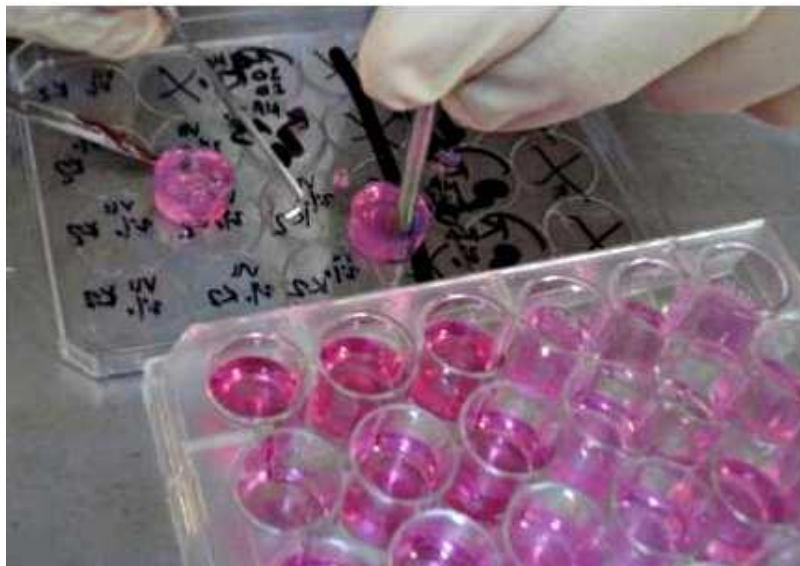
Як можна бачити з розрахованих даних у табл. 2, число клітинних подвоєнь, або кількість випадків реплікації (n), в популяціях ХЦ протягом чотирьох пасажів складало в середньому 3,2. Час подвоєння клітинної популяції ХЦ – це час, протягом котрого відбувається подвоєння чисельності або маси популяції (t), складав в середньому 54 год.

Таблиця 2

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

	$X_0, \times 10^5$	$X_k, \times 10^5$	T, год.	n	t, год.
ХЦ, 25 см <sup>2</sup> n=4	0,92	8,6	*174 ± 15,1	3,2	54,0

*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 лунках 24-лункової плашки до полімеризації. В результаті одержували полімеризований за кімнатної температури 2% агарозний гідрогель з концентрацією  $10^7$  клітин/мл/лунку (рис. 2). Полімеризований гель з клітинами в лунках заливали по 1 мл поживного середовища DMEM-HG та культивували в CO<sub>2</sub>-інкубаторі за 37°C протягом 14-ти 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, котра складала 93,7%.



**Рисунок 2 – Агарозний гідрогель з культивованими хондроцитами ( $10^7$  клітин/мл/лунку).**

#### **Висновки.**

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

2. 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).

3. Притаманну культивованим хондроцитам морфологію клітини зберігали протягом п'ятих пасажів та не змінювали на фібробластоїдну, котра є ознакою культивованих хондроцитів у недиференційованому стані.

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

5. При вивченні показників кінетики росту клітинних популяцій хондроцитів було виявлено, що число клітинних подвоєнь протягом чотирьох пасажів складало в середньому 3,2, а час подвоєння клітинної популяції хондроцитів складав в середньому 54 години.

6. 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 склала 93,7%.

#### **Література**

1. Наш перший досвід хірургічного лікування посттравматичного дефекту суглобового хряща колінного суглоба аутологічними хондроцитами / М. Л. Анкін, О. А. Костоґриз, В. К. Гринь [та ін.] // Літопис травматології та ортопедії. – 2008. – № 1–2. – С. 136–138.

2. Пат. 70589 А Україна, МПК 7 А61В 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., Попандопуло А. Г., Корчак О. М. [та ін.]; заявник та патентоутримувач ІНВХ ім. В. К. Гусака АМНУ. – № 20031211484 ; заявл. 12.12.03 ; опубл. 15.10.04, Бюл. № 10.

3. Фрешни Р. Я. Культура животных клеток : 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 / S. Marlovits, M. Hombauer, M. Truppe [et al.] // J. Bone Joint Surg. Br. – 2004. – Vol. 86, № 2. – P. 286-295.

7. 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 / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller [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 / M. C. Stewart, K. M. Saunders, N. Burton-Wurster [et al.] // J. Bone Miner. Res. – 2000. – Vol. 15, № 1. – P. 166-174.

10. Prockop D. J. Mesenchymal stem cells : methods and protocols / D. J. Prockop, D. G. Phinney, B. A. Bunnell. – Totowa, NJ : Humana Press, 2008. – 192 p.

11. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation / M. Brittberg, A. Lindahl, A. Nilsson [et al.] // N. Engl. J. Med. – 1994. – Vol. 331, № 14. – P. 889-895.

### Summary

*In the original 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-scaffold, 2% agarose hydrogel seeded with cultured chondrocytes, is described for the purpose of cell therapy of articular cartilage defects in the experiment.*

Рецензент – к.вет.н., професор Калініна О.С.