

УДК 576.524: 576.08: 611.71: 616.71-001.58: 616.71-003.85: 616.71-003.93

DOI 10.17802/2306-1278-2018-7-2-102-111

ЗАСЕЛЕНИЕ ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА КЛЕТКАМИ ХОНДРОГЕННОГО РЯДА

Е.И. Щелкунова¹ ✉, А.А. Воропаева¹, А.В. Корель¹, Д.А. Майер², В.Т. Подорожная¹,
И.А. Кирилова¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л.Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Фрунзе, 17, Новосибирск, Российская Федерация, 630091; ²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Красный проспект, 52, Новосибирск, Российская Федерация, 630091

Основные положения

- Определен дозозависимый эффект воздействия экстракта деминерализованного костного матрикса (ДКМ) на клетки в лаг- и лог- фазе.
- Подобраны условия очистки ДКМ от агрессивных агентов, токсичных для клеток.
- Определены способы повышения эффективности заселения ДКМ клетками.

Цель

Поиск эффективных способов обработки деминерализованной костной ткани после консервации для эффективного заселения хондроцитами.

Материалы и методы

В качестве материала исследования использовали деминерализованный костный матрикс размером 1 x 1 x 1 см³. Для удаления цитотоксических веществ из матриц разработан способ очистки, заключающийся в поэтапном замачивании образца в H₂O, растворе 0,1 N NaOH, растворе 1 n NaOH, H₂O и DPBS до нейтрального pH. Для улучшения клеточной адгезии на матрицах, на последние перед заселением воздействовали ультразвуком. На образец, прошедший химическую очистку 3 раза, воздействовали ультразвуком в течение 1 минуты и W = 5. После каждого воздействия, воду в емкости меняли. После этого воду в емкости сменили на DPBS и обрабатывали ультразвуком в течение 1 минуты и W = 5. После окончания процедур образец находился в нейтральной среде (pH 7,0). Обработанные таким способом матрицы заселяли клетками. В качестве источника клеток для заселения, была выбрана ткань гиалинового хряща мини-поросенка. Хондроциты выделяли стандартным способом с применением коллагеназы II типа и культивировали в течение 20 суток в культуральных флаконах. Матрицы заселяли хондроцитами 1 пассажа. Для повышения эффективности заселения костного матрикса клетками был апробирован способ предварительной обработки деминерализованной костной ткани 1% раствором желатина. Для определения пригодности матрикса к заселению его хондроцитами использовали микротитрационный тест влияния экстракта, получаемого в ходе ультразвуковой обработки матрицы, на жизнеспособность клеток. Тест проводили на лаг- и лог-фазах роста клеток. Воздействие экстракта на клетки длилось 3 суток.

Результаты

Показано, что обработка хондроцитов экстрактом на этапе лаг-фазы роста культуры оказывает прямой дозозависимый цитотоксический эффект, в отличие от эффекта обработки хондроцитов в фазе логарифмического роста культуры. Показано, что низкая эффективность заселения деминерализованного костного матрикса связана не только с жесткими условиями изготовления ДКМ, но и от условий последующей подготовки матрицы, фазы роста заселяемой клеточной культуры. С увеличением глубины миграции клеток вглубь матрицы нарушается микроциркуляция, что ведет к недостаточному обеспечению клеток в тканеинженерной конструкции питанием и замедлению метаболических процессов.

Заключение

Эффективность равномерного заселения деминерализованного костного матрикса клетками связана не только с условиями обработки матрикса, выра-

Для корреспонденции: Щелкунова Елена Игоревна, e-mail: elena-shelkunova@mail.ru, адрес: 630091, Россия, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17

Corresponding author: Shchelkunova Elena, e-mail: elena-shelkunova@mail.ru, address: Russian Federation, 630091, Novosibirsk, 17, Frunze St.

женным цитотоксическим эффектом, но и с его архитектурой. Проблема замедления метаболизма клеток в тканеинженерной конструкции решается путем комбинированного метода очистки ДКМ химическим и ультразвуковым способом. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости применения механических и электрических стимулов для нормального функционирования клеток костной и хрящевой ткани внутри матрицы.

Ключевые слова Деминерализованный костный матрикс • Клетки • Хондроциты • Заселение

Поступила в редакцию: 06.06.17; поступила после доработки: 06.09.17; принята к печати: 06.09.17

SEEDING OF THE DEMINERALIZED BONE MATRIX WITH CHONDROGENIC CELLS

E.I. Shchelkunova¹✉, A.A. Voropaeva¹, A.V. Korel¹, D.A. Mayer², V.T. Podorognaya¹, I.A. Kirilova¹

¹Federal State Budgetary Institution «Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. Ya.L. Tsvyayn» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 17, Frunze St., Novosibirsk, Russian Federation, 630091; ²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Novosibirsk State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 52, Krasny Prospekt, Novosibirsk, Russian Federation, 630091

Highlights

- The dose-dependent effects of the extract-treated demineralized bone matrix (DBM) on the cells growth during the lag- and log-phase have been found.
- Purification methods of DBM from aggressive agents that are toxic to cells have been developed.
- Methods improving cell seeding efficiency of DBM have been proposed.

Aim

To determine optimal approaches of demineralized bone tissue processing after preservation to ensure efficient seeding of chondrocytes.

Methods

Demineralized bone matrix specimens sized 1 x 1 x 1 cm³ were used in the experiment. A purification method ensuring the removal of cytotoxic substances from the matrices has been developed. It consists of a multi-stage soaking of the specimens in H₂O, 0.1N NaOH, 1N NaOH, H₂O and DPBS until a neutral pH is reached. After chemical purification (a 3-stage process), all the specimens were subjected to sonication for 1 minute at 5W to improve cell adhesion. The water was changed after each exposure. Then, the water was replaced to DPBS and the specimens were sonicated for 1 minute at 5W. After it, the sample was placed in a neutral medium (pH 7.0). The matrices undergoing sonicated procession were seeded with cells. Hyaline cartilage of minipigs was used as a source of the cells. Chondrocytes were isolated using collagenase II digestion and cultured for 20 days in the culture flasks. Passage 1 chondrocytes were seeded on the matrices. DBM were pretreated with a 1% gelatin solution to improve the efficiency of cell seeding. The microtitration viability test estimating the impact of the extract obtained during sonation cycles on cell viability was performed to determine whether these matrices may be seeded with chondrocytes. The test was performed on the lag- and log-phase cells. The effect of the extract on the cells lasted around 3 days.

Results

Extract-treated chondrocytes during the lag-phase showed a direct dose-dependent cytotoxic effect, compared to extract-treated chondrocytes during the log-phase. Low efficiency of DBM was associated with both, the stringent requirements for the manufacturing process of DBM and the subsequent matrices processing, including the cell growth phases. The increased cell migration depth into the matrices resulted in the disturbances of the microcirculation, leading to the insufficient cell feeding and slowed down metabolic processes.

Conclusion

The efficiency of DBM cell seeding depends on the matrix processing, its cytotoxic effect and architectonics. The problem of slowing down the metabolism of cells in DBM may be solved by the application of the combined purification technique,

i.e. chemical and ultrasonic purification methods. The obtained results prove the necessity of using mechanical and electrical stimuli for the normal functioning of bone and cartilage tissue cells within the matrix.

Keywords

Demineralized bone matrix • Cells • Chondrocytes • Seeding

Список сокращений

ДКМ – деминерализованный костный матрикс	FBS – Fetal bovin serum (эбриональная бычья сыворотка)
МТТ- – микротитрационный тест	PBS – Phosphate buffered saline (натрий-фосфатный буфер)

Введение

Тканевая инженерия в настоящее время является одной из самых многообещающих стратегий восстановления поврежденных органов и тканей [1] и входит в число главных междисциплинарных областей [2, 3]. Для ее реализации необходимы, по крайней мере, два основных компонента: клетки и специализированный носитель клеток (матрикс, scaffold), обеспечивающий условия для нормального протекания процессов гисто- и морфогенеза [1, 4, 5]. Иммобилизация клеток на поверхности матрикса обеспечивает механическую прочность конструкции, имитирует межклеточное вещество костной ткани, взаимодействующее с клетками *in vivo* и обеспечивающее реализацию их функций [2, 6]. Биоматериал матрикса, с одной стороны, выполняет функцию носителя клеток, а с другой - влияет на необходимую дифференцировку хондроцитов. Кроме того, использование матрикса, заселённого клетками, существенным образом упрощает оперативное вмешательство, когда клеточно-матриксный комплекс прямо вносится в дефект хряща без дополнительной фиксации [7]. Оптимальная адгезия культивированных клеток к поверхности носителя – важнейшее условие реализации биологического действия тканеинженерной конструкции [4]. Для успешного исхода данной процедуры матрица должна быть биосовместима с тканью реципиента, структурно и механически стабильна, обеспечить условия для пролиферации и экспансии клеток в объёме матрицы. Кроме того, конструкция должна содержать соответствующие биоактивные вещества, влияющие на дифференцировку клеток [7].

В настоящее время в качестве матриц-носителей для хондроцитов применяются мембраны из гиалуроновой кислоты, коллагена и полимеров (PLA, PGA, PLLA, PLDLA) [7 - 9], матрицы биологического и синтетического происхождения (агароза, альгинат, метилцеллюлоза, коллаген, гиалуронат, фибрин, углеродистое волокно, гидроксиапатит, пористая полимолочная кислота, дексон, викрил, PDS, политетрафлуорэтилен, полиэстер и другие синтетические полимеры) [1, 7]. Матрицы обеспечивают начальную структуру, могут временно стабили-

лизировать хондроциты в дефекте и направлять их пространственное распределение в пределах ткани, а также обеспечивать синтез коллагена и протеогликанов [7]. Известны примеры культивирования хондроцитов на трехмерных матрицах. Среди четырех распространенных матриц наибольшая дифференцировка хондроцитов была на CaReS®, далее следовали Novocard®3D, Hyalograft®Си MACI®. Данные матрицы были апробированы в клинических испытаниях по лечению дефектов суставного хряща [10].

Относительно применения хондроцитов в тканеинженерных конструкциях (ТИК) костной ткани, примеров значительно меньше. В литературе описано множество примеров заселения матриц из материалов природного и синтетического происхождения мезенхимальными стволовыми клетками (МСК).

Исторически, первым подходом к функционализации матриц из декальцинированной и депротенизированной костной ткани было заселение их клетками (ММСК, хондроцитами, фибробластами) с формированием тканеинженерных конструкций [11]. На сегодняшний день данный подход является одним из наиболее разработанных направлений в тканевой инженерии костной ткани. Однако, одной из главных проблем культивирования клеток на матриксах и подложках различной природы является низкая эффективность заселения носителей клетками и их неравномерное распределение по структуре [12]. Оптимальная адгезия клеток к поверхности носителя – важнейшее условие реализации биологического действия ТИК [4, 13]. Адекватное совмещение клеток и матрикса должно рассматриваться как ключевой момент в создании тканеинженерной конструкции [4]. Именно поэтому адгезия клеток, заселяющих матрикс, является важным критерием, определяющим успешность этапа исследований *in vitro*.

Перспективным направлением в развитии восстановительной хирургии костной и хрящевой тканей следует считать получение экспериментального обоснования возможности использования различных замещающих материалов для последующего

клинического применения. Для этого необходимо проведение исследований в условиях *in vitro* по изучению взаимодействия между клетками и материалом, чтобы выявить: токсичность материалов, воздействие на морфологию и основные характеристики жизнеспособности клеток (способность к адгезии, пролиферации, сохранению свойств, присущих клеткам ткани, куда будет помещен имплантат) [4]. Высокие требования, предъявляемые к материалам, проходящим доклиническую апробацию, определяют необходимость использования агрессивных методов их обработки. Зачастую, материал, теоретически оптимальный для размещения клеток и поддержания их в функционально активном состоянии (ДКМ), в процессе обработки теряет ряд своих положительных свойств, и в том числе адгезионные [13].

Целью настоящего исследования являлся поиск эффективных способов обработки деминерализованной костной ткани после консервации для эффективного заселения хондроцитами.

Материалы и методы

В качестве материала исследования были выбраны матрицы деминерализованной костной ткани или деминерализованный костный матрикс (ДКМ), размером 1 x 1 x 1 см³, предоставленные лабораторией заготовки и консервации тканей ФГБУ «НИИ-ИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России.

Так как в процессе деминерализации костная ткань подвергается химической обработке и может содержать следовое количество кислот, негативно влияющих на культивируемые клетки, то такие матрицы требуют предварительной подготовки перед заселением их клетками.

Для достижения высокой биосовместимости и эффективного заселения матриц был поставлен ряд экспериментов по обработке ДКМ. Предложено 2 способа обработки ДКМ для удаления цитотоксических веществ из матриц – химический и химический с применением ультразвука. С целью сохранения стерильности образцов все манипуляции по очистке выполнены стерильными растворами в условиях ламинарного шкафа. При подготовке ДКМ к заселению клетками применяли химические методы обработки. Образец замачивали в воде (рН 7,03) на 24 часа. Затем образец отжали (рН воды изменился до 6,68). Образец ДКМ обрабатывали водой с добавлением 0,1 N NaOH – на магнитной мешалке в течение 24 часов. Образец повторно отжимали и промывали 10 объемами воды с помощью шприца. Затем образец отжимали и обрабатывали водой с добавлением 1 n NaOH – на магнитной мешалке в течение 16 часов. После обработки образец становится хрупким и мягким, рН раствора 9,3. Далее производили серию последовательных манипуляций по промывке образца с целью снижения рН

раствора. Образец промывали водой и DPBS (Биолот, Россия) по 16 часов в каждом растворе до рН 7,4. Образец, готовый к заселению клетками, хранили в стерильных пробирках, содержащих RPMI 1640 с добавлением 50% FBS («Gibco», США), 42,19 ед/мл пенициллина, 0,042 мг/мл стрептомицина («Биолот», Россия), 0,053 мг/л амфотерицина В («Biowest», Франция).

Второй способ включал комплекс методов, направленных на улучшение клеточной адгезии на матрицах во время культивирования. Прошедший химическую очистку образец, рН окружающей жидкости которого 7,4, помещали в стерильную воду. На образец 3 раза воздействовали ультразвуком в течение 1 минуты и W = 5. После каждого воздействия воду в емкости меняли. После первого воздействия рН среды 8,15. После третьего воздействия - рН 7,9. После этого воду в емкости сменили на DPBS (Биолот, Россия) и обрабатывали ультразвуком в течение 1 минуты и W = 5. После окончания процедур образец находился в нейтральной среде (рН 7,0). Образцы хранили в среде RPMI 1640 после обработки ультразвуком. Обработанные таким способом матрицы заселяли клетками.

В качестве источника клеток для заселения ДКМ была выбрана ткань гиалинового хряща мини-поросенка (экспериментальные животные выведены в хозяйстве ИЦиГ СО РАН). Хрящевую ткань забирали в условиях операционной. Гиалиновый хрящ 15 минут отмывали в растворе Хэнкса с 0,1% канамицином, измельчали в чашке Петри с минимальным объемом среды RPMI 1640 («Биолот», Россия) до размеров 1 - 2 мм², помещали в раствор 1,5% коллагеназы II типа («Gibco», США) и инкубировали при температуре 37°C в течение 5 - 8 часов на шейкере. Суспензию клеток пропускали через нейлоновый фильтр и центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Хондроциты культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 15% фетальной сыворотки плодов коров (FBS) («Gibco», США), 42,19 Ед/мл пенициллина, 0,042 мг/мл стрептомицина («Биолот», Россия), 0,053 мг/л амфотерицина В («Biowest», Франция) в культуральных флаконах («TRP», Швейцария) в стандартных условиях CO₂-инкубатора: 37°C и 5% CO₂. Пассирование клеток производили с помощью 0,25% раствора трипсина («Биолот», Россия). Первичная культура хондроцитов гиалинового хряща мини-поросенка является адгезионной и пролиферирующей культурой.

В экспериментах определяли наиболее эффективный способ заселения матриц ДКМ клетками: 1 – предварительно пропитанную питательной средой матрицу, размером 1 x 1 x 1 см³, помещали на клеточный монослой в лунку 6-луночного планшета («TRP», Швейцария); 2 – матрицы размером 1 x 1 x 1 см³, помещенные на дно лунки 6-луночного

планшета («ГРР», Швейцария), заливали суспензией хондроцитов в концентрации $1,5 \times 10^6$ в объеме 50 мкл и оставляли на 4 часа. Затем матрицу с клетками заливали культуральной средой; Эксперимент проведен в 3-х повторениях. В контрольной серии суспензию хондроцитов в той же концентрации помещали на культуральный пластик 6-луночного планшета («ГРР», Швейцария).

Возможность повышения эффективности заселения матриц размером $1 \times 1 \times 1 \text{ см}^3$, изучали путем покрытия ДКМ 0,1% раствором желатина. Матрицы заселяли суспензией хондроцитов в объеме 50 мкл и оставляли на 4 часа, после этого матрицу с клетками заливали культуральной средой. Эксперимент проведен в 3-х повторениях.

Производили прижизненное наблюдение в течение 5 суток. Матрицы, заселенные клетками, фиксировали 4% раствором формалина и окрашивали DAPI. Оценку интенсивности заселения и равномерного распределения хондрогенных клеток на поверхности и в глубине матриц оценивали с помощью микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения ZEN 2012 (blue edition).

Для определения количества жизнеспособных клеток использовали микротитрационный тест (МТТ-тест). Колориметрический метод с использованием МТТ (бромид3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) основан на способности митохондриальных ферментов живых клеток восстанавливать желтый МТТ-субстрат до темно-синего формазана. Число жизнеспособных клеток прямо пропорционально количеству восстановленного формазана, которое можно определить спектрофотометрически после растворения в органическом растворителе [9].

Экстракт для микротитрационного теста был выделен следующим способом: ДКМ поместили в среду RPMI-1640 («Биолот», Россия) в соотношении объемов 1 : 50 (матрица / раствор), обработали ультразвуком 5 раз по 1 минуте без охлаждения с перерывами между воздействиями 1 минута. В полученный раствор (экстракт) добавляли 15% FBS («Gibco», США), 42,19 ед/мл пенициллина, 0,042 мг/мл стрептомицина («Биолот», Россия), 0,053 мг/л амфотерицина В («Biowest», Франция). Для микротитрационного теста использовали культуру хондроцитов колена мини-поросенка на 3-и и 11-е сутки (лаг- и лог-фазы роста культуры соответственно). Фазы роста определяли самостоятельно путем ежедневного подсчета клеток в динамике культивирования. Клетки культивировали с экстрактом в течение 3-х суток в следующих дозах 0,8%; 1,6%; 3,1%; 6,3%; 12,5%; 25%; 50% (v/v). Рост культуры в присутствии экстракта оценивали после обработки культуры трипсином с подсчетом клеток в гемоцитометре.

Результаты

Матрицы, очищенные химическим способом, имели выраженное цитотоксическое влияние на заселяемые клетки. Поэтому в эксперименте были использованы матрицы ДКМ, очищенные комбинированным способом - с применением ультразвука.

Через 4 часа после заселения матриц клетками 1 способом, при визуальном наблюдении отмечено, что клетки монослоя сохраняют свою форму и целостность, но адгезивной активности в отношении матрицы не выявлено. При заселении 2 способом отмечено, что через 4 часа клетки сохраняют округлую форму, и скапливаются в «слепых» лакунах матриц. За пределами матриц так же наблюдали высокую плотность клеток.

Через 1 сутки после заселения 1 способом клеток, населяющих матрицу, не обнаружили. При визуальной оценке заселения 2 способом наблюдали округлые клетки в «слепых» лакунах матрицы (Рис. 1а). Большая часть клеток расположена за пределами матрицы (Рис. 1б). В контрольной серии наблюдали монослой клеток на разной стадии адгезии (Рис. 1в).

Через сутки эксперимента отмечена высокая степень насыщения тела матрицы хондрогенными клетками, заселенной 2-м способом, но слабая их адгезия в лакунах в сравнении с контрольной серией. Так как заселение ДКМ клетками 1 способом не дало эффективного результата, дальнейшие наблюдения и модификации выполняли по протоколу 2-го способа заселения.

На 3 сутки эксперимента по заселению ДКМ после промывки PBS («Gibco», США) и смены питательной среды визуально отметили снижение количества клеток. Клетки из суспензии, заселенные 2 способом, заполняют все тело матрицы, оседают в слепых лакунах и проходят сквозь матрицу через сквозные лакуны (Рис. 2а). При этом адгезия клеток к поверхности ДКМ слабая. В контрольной серии на 3-и сутки эксперимента клетки в поле зрения лежат одиночно (Рис. 2б).

При дальнейшем исследовании ДКМ, заселенных хондроцитами, клетки распределены на поверхности культурального пластика, и их численность с течением времени снижается.

Для повышения эффективности заселения костного матрикса клетками был апробирован способ предварительной обработки ДКМ 1% раствором желатина. Обработанную матрицу заселяли клетками способом 2. Культивировали в течение 5 суток. Образец отмывали от не прикрепившихся клеток и окрашивали DAPI. Наблюдали свечение клеточных ядер и адгезию по краю стенки лакуны матрицы (Рис. 3). При окрашивании DAPI матрицы, не покрытой желатином и заселенной клетками, не выявили свечения ядер в области лакуны.

Через 5 суток отметили, высвобождение клеток

из матрицы и переход их в состояние суспензии. Слабая адгезия клеток к поверхности ДКМ, снижение численности популяции клеток в эксперимен-

тальной серии и переход хондроцитов в суспензию свидетельствует о влиянии ДКМ на жизнеспособность клеток. Для выяснения причин этого явления

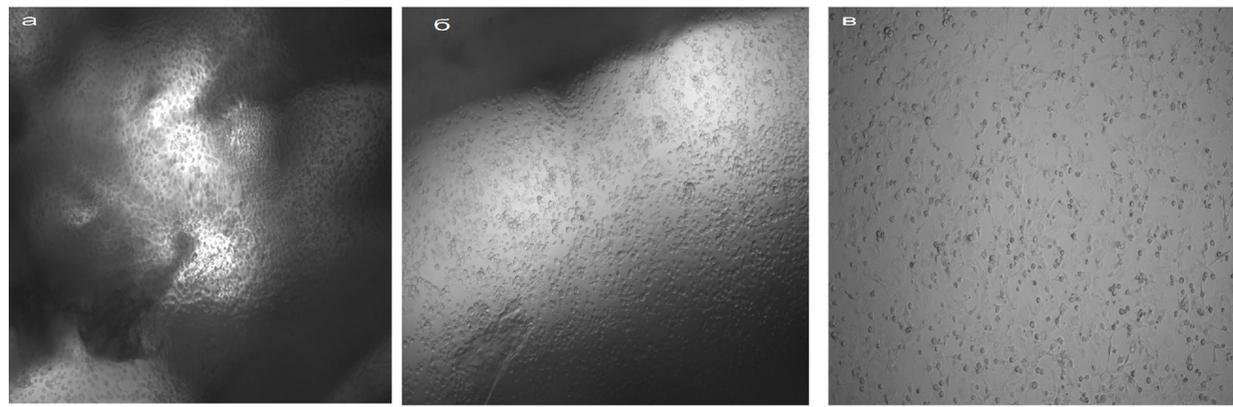


Рисунок 1. Эффективность заселения ДКМ клетками хондрогенного ряда на 1 сутки эксперимента.

Figure 1. Efficacy of DBM cell seeding with chondrogenic cells on day 1 of the experiment.

Примечания: а – слепая лагуна матрицы, заполненная округлыми клетками; б – адгезия клеток к поверхности культурального пластика вблизи матрицы; в – контрольная серия. Высокая степень адгезии хондроцитов к поверхности культуральной посуды.

Note: а – blinded lacunae of the matrix, filled with round cells; б – cell adhesion to the culture plastic surface near the matrix; в – control series. High chondrocyte adhesion to the culture plastic surface.

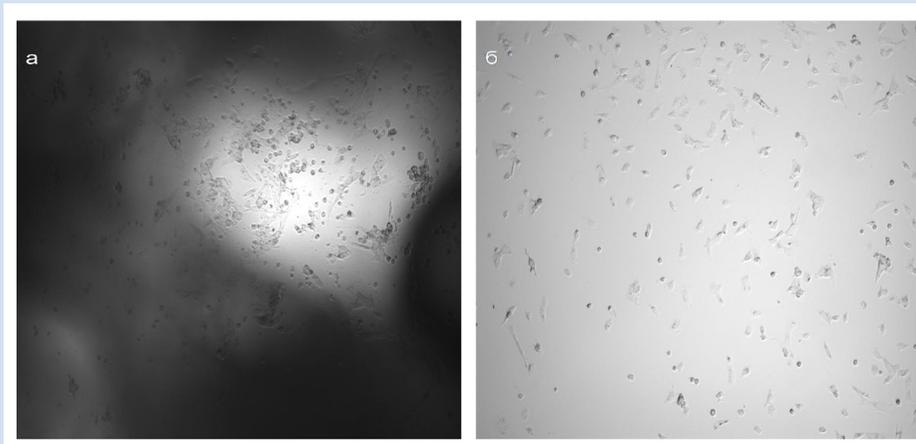


Рисунок 2. Эффективность заселения ДКМ клетками хондрогенного ряда на 2 сутки эксперимента.

Figure 2. Efficacy of DCM cell seeding with chondrogenic cells on day 2 of the experiment.

Примечания: а – сквозная лагуна матрицы, заполненная округлыми клетками; б – контрольная серия.

Note: а – matrix lacunae, filled with round cells; б - control series.

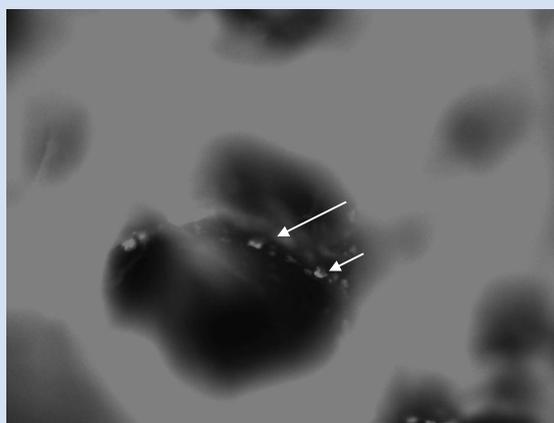


Рисунок 3. Эффективность заселения ДКМ, обработанного ультразвуком и покрытого 1% раствором желатина, клетками хондрогенного ряда на 5 сутки, окрашено DAPI.

Figure 3. Efficiency of DBM seeding with chondrogenic cells on day 5 after sonication and treatment with the 1% gelatin solution.

провели микротитрационный тест экстракта, получаемого в ходе ультразвуковой обработки матрицы в растворе среды RPMI объемом, равным 50 объемам матрицы. Тест проводили на лаг- и лог-фазах роста клеток. Воздействие экстракта на клетки длилось 3 суток (Рис. 4).

Показано, что обработка хондроцитов экстрактом в лаг-фазе роста культуры оказывает на клетки прямой дозозависимый цитотоксический эффект. Максимальное количество жизнеспособных клеток после 3-х суток культивирования в присутствии экстракта наблюдали в контроле, а минимальное количество - при содержании 50% экстракта в культуральной среде. Жизнеспособность клеток увеличивается по мере снижения концентрации экстракта в культуральной среде.

Обсуждение

Результаты исследования показали, что более эффективным способом очистки матриц ДКМ является комбинированный способ с последующим применением химической и ультразвуковой обработки. Применение ультразвука при очистке матриц от следовых концентраций химических веществ повышает эффективность заселения клетками и время их жизнеспособности в теле матрицы. Поэтому из двух апробированных в данном исследовании способов обработки матриц, химического и комбинированного, последний способ был использован для подготовки матриц перед заселением.

При заселении матриц двумя способами показано, что деминерализованный костный матрикс (ДКМ) не обладает достаточными адгезионными свойствами для культивируемых клеток – обра-

ботка агрессивными веществами в ходе технологической подготовки образцов, необходимая для избавления от клеточного материала, приводит к потере ДКМ ряда своих положительных свойств, в том числе и адгезивных [4]. Можно предположить, что агрессивные агенты, используемые при обработке костной ткани и технологическом производстве ДКМ, сохраняются в глубинных зонах ДКМ и удалить их химическим и механическим путем невозможно. При длительном культивировании хондроцитов в присутствии ДКМ, повышается концентрация агрессивных веществ в культуральной среде, что отрицательно влияет на жизнеспособность клеток.

Для подтверждения этого явления провели микротитрационный тест экстракта, получаемого в ходе ультразвуковой обработки матрицы.

Жизнеспособность клеток увеличивается по мере снижения концентрации экстракта в культуральной среде. При обработке клеток экстрактом в фазе логарифмического роста культуры цитотоксический эффект не наблюдали. Максимальное количество жизнеспособных клеток после 3 суток культивирования наблюдали при концентрации экстракта 12,5%, а минимальное - при концентрации 25%. Таким образом, присутствие в среде культивирования экстракта с концентрацией от 12,5 до 6,25% цитотоксический эффект не обнаружен. Возможно, это связано с модификацией белков или содержанием в экстракте факторов роста, которые положительно повлияют на пролиферативную активность клеток в фазе логарифмического роста. Для подтверждения этого предположения требуются дальнейшие биохимические исследования.

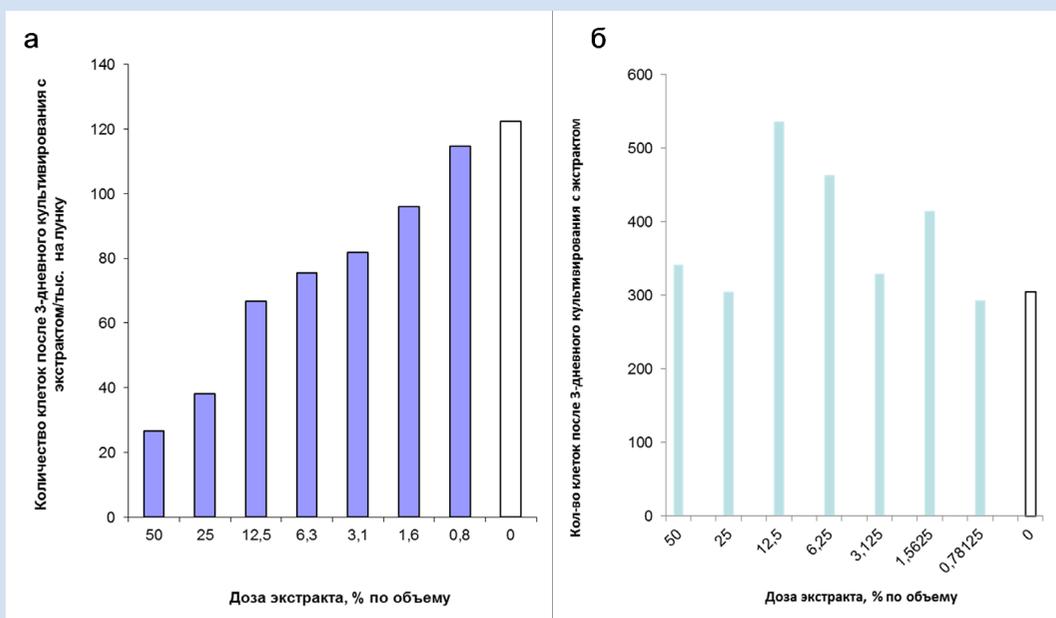


Рисунок 4. Влияние экстракта ДКМ на хондроциты в течение 3-х суток.

Figure 4. Impact of the extract-treated DBM on chondrocytes within 3 days.

Примечания: а – воздействие на клетки в лаг-фазе роста культуры; б – воздействие на клетки в лог-фазе роста культуры (n=2).

Note: a - the impact on the cell growth during the lag-phase; b - the impact on the cell growth during the log-phase (n = 2).

Возможно, эффективность равномерного заселения клеточными элементами деминерализованного костного матрикса связана не только с условиями обработки матрикса, но и с его архитектурой. Клеткам сложно прикрепиться к поверхности, расположенной под углом, поэтому они концентрируются в «слепых» лакунах и на их стенках. С увеличением глубины миграции клеток внутри матрицы нарушается микроциркуляция, что ведет к недостаточному обеспечению клеток питанием, низкой скорости передачи гуморальных сигналов и ответа клеток на них, отвода метаболитов, производимых клетками, т.е. к замедлению метаболизма клеток в тканеинженерной конструкции. Последние исследования в этой области свидетельствуют о необходимости механических и электрических стимулов для нормального функционирования клеток костной и хрящевой ткани. Однако при конструировании матриц и имплантатов это пока учитывается недостаточно.

Выводы

1. Более эффективным способом очистки матриц ДКМ является комбинированный способ с последующим применением химической и ультразвуковой обработки.
2. Применение ультразвука повышает эффективность заселения матриц клетками и время их жизнеспособности в теле матрицы.
3. Апробировано 3 способа заселения ДКМ клетками хондрогенного ряда. Способ 1 (помещение матрицы на поверхность монослоя) оказался не эффективным. Матрица не контактирует плотно с монослоем и поверхностью культуральной посуды. Способ 2 (заселение ДКМ клеточной суспензией)

Информация об авторах

Щелкунова Елена Игоревна, научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация

Воропаева Анастасия Александровна, кандидат биологических наук, научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация

Корель Анастасия Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторно-экспериментальным отделом Федерального государственного бюджетного учреждения «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация

Майер Денис Александрович, студент Федерального го-

оказался более эффективным. Суспензия клеток заполняет все тело матрицы, оседает в слепых лакунах и проходит сквозь матрицу через сквозные лакуны. При этом, адгезия клеток к поверхности матрицы слабая. Способ 3 (заселения измельченной ДКМ клеточной суспензией), так же оказался малоэффективным.

4. Покрытие ДКМ 1% раствором желатина повышает эффективность адгезии клеток к поверхности матрицы.

5. Заселение клетками матрицы следует производить в лог-фазе, поскольку в течение лог-фазы цитотоксической эффект состава матрикса может не влиять на их жизнеспособность и адгезивные свойства.

Конфликт интересов

Е.И. Щелкунова заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.А. Воропаева заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.В. Корель заявляет об отсутствии конфликта интересов. Д.А. Майер заявляет об отсутствии конфликта интересов. В.Т. Подорожная заявляет об отсутствии конфликта интересов. И.А. Кирилова заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Исследование проводилось при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-29-04875) с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования «Регенеративная медицина и клеточные технологии», организованном на базе АО «Инновационный медико-технологический центр (Медицинский технопарк)».

Information about authors

Shelkunova Elena I., researcher at the Federal State Budgetary Institution “Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Ortopedics n.a. Ya.L. Tsivyan” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation

Voropaeva Anastasia A., PhD, researcher at the Federal State Budgetary Institution “Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Ortopedics n.a. Ya.L. Tsivyan” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation

Korel Anastasia A., PhD, senior researcher, Head of the Laboratory and Experimental Department at the Federal State Budgetary Institution “Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Ortopedics n.a. Ya.L. Tsivyan” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation

Mayer Denis A., student at the Federal State Budgetary

государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация

Подорожная Валентина Тимофеевна, к.м.н., старший научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л.Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация

Кирилова Ирина Анатольевна, д.м.н., главный научный сотрудник, директор Федерального государственного бюджетного учреждения «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л.Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация

Educational Institution of Higher Professional Education “Novosibirsk State Medical University” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation

Podorozhnaya Valentina T., PhD, senior researcher at the Federal State Budgetary Institution “Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. Ya.L. Tsviyann” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation

Kirilova Irina A., PhD, senior researcher, Director of the Federal State Budgetary Institution “Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. Ya.L. Tsviyann” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation

Вклад авторов в статью

ЩЕИ – выделение хондроцитов, ведение культуры клеток, обработка ДКМ, заселение ДКМ, работа с источниками, написание текста статьи

ВЛА – ведение культуры клеток, подбор условий обработки ДКМ, обработка ДКМ, подготовка текста статьи

КАВ – выделение хондроцитов, написание статьи

МДА – выделение экстракта, МТТ – тест, написание статьи

ПВТ – изготовление ДКМ, написание статьи

КИА – изготовление ДКМ, написание статьи

Authors contribution

ShEI – chondrocyte isolation, cell culturing, DBM treatment, DBM seeding, medical literature analysis, manuscript writing

VAA – cell culturing, selection of conditions for DBM treatment, DBM treatment, manuscript writing

KAV – chondrocyte isolation, manuscript writing

MDA – extract isolation, MVT, manuscript writing

PVT – DBM manufacturing, manuscript writing

KIA – DBM manufacturing, manuscript writing

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Большасов Е.Н., Антонова Л.В., Матвеева В.Г. и др. Изменение поверхностных свойств и биосовместимости матриц из поликапролактона, модифицированных плазмой высокочастотного магнетронного разряда. Биомедицинская химия 2016; 62 (1): 56-63 doi: 10.18097/PBMC20166201056
2. Кузнецова Д.С., Тимашев П.С., Баграташвили В.Н., Загайнова Е.В. Костные имплантаты на основе скаффолдов и клеточных систем в тканевой инженерии (обзор). Современные технологии в медицине. 2014; 6 (4): 201 – 212.
3. Chan V.P., Leong K.W scaffolding tissue engineering: general approaches and tissue- specific considerations. Eur Spine J. 2008; 17 (Suppl 4): 467 – 479:
4. Александрова С.А., Нащекина Ю.А., Цупкина Н.В. Методологические подходы создания тканеинженерных конструкций для восстановления дефектов костной и хрящевой тканей (опыт Института Цитологии РАН). Клеточные культуры. 2016; 32: 95-104.
5. Kirilova I.A., Sharkeev Yu.P., Nikolaev S.V. Physicomechanical properties of the extracellular matrix of a demineralized bone. AIP Conference Proceedings. 2016; 1760 (1): 020027. doi https://doi.org/10.1063/1.4960246
6. Вахрушев И.В., Антонов Е.Н., Попова А.В. и др. Разработка такнеинженерных имплантов для регенерации костной ткани на основе полилактогликолидных скаффолдов нового поколения и мультипотентных мезенхимальных клеток пульпы молочного зуба (SHED – клетки). Клеточные технологии в биологии и медицине. 2012; 1: 29-33.
7. Торгомян А.Л., Гамбарян А.К., Асратян А.А., Худавердян Д.Н. Современные методы восстановления суставного гиалинового хряща при остеоартрите. Медицинская наука Армении НАН РА. 2014; LIV(1): 23- 37.
8. Behrens P., Ehlers E.M., Kochermann K.U., Rohvedel J., Russlies M., Plotz W. New therapy procedure for localized cartilage defects. Encouraging results with autologous chondrocyte implantation. MMW Fortschr. Med., 1999, 141: 49-51.
9. 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 (БИТ). 2017; 1 (2): 31-35.
10. Советников Н.Н., Кальсин В.А., Конопляников М.А., Муханов В.В. Клеточные технологии и тканевая инженерия в лечении дефектов суставной поверхности. Клиническая практика. 2013; 1: 52-66.
11. Сергеева Н.С., Комлев В.С., Баринов С.М. и др. Эволюция взглядов на материалы, предназначенные для замещения костно-хрящевых дефектов. Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы VIII Московского Международного Конгресса. ЗАО «Экспобиохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева. 2015.
12. Pallante A.L., Chen A.C., Ball S.T. et al. The in vivo performance of osteochondral allografts in the goat is diminished with extended storage and decreased cartilage cellularity. Am. J. Sports Med. 2012; 40 (8): 1814-23 doi: 10.1177/0363546512449321
13. Деев Р.В., Цупкина Н.В., Бозо И.Я. и др. Тканеинженерный эквивалент кости: методологические основы создания и биологические свойства. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011; 6 (16): 62-67.

REFERENCES

1. Bolbasov E.N., Antonova L.V., Matveeva V.G. Effect of radio frequency discharge plasma on surface properties and biocompatibility of polycaprolactone matrices. *Biomedical chemistry*. 2016; 62 (1): 56-63. doi: 10.18097/PBMC20166201056 (in Russian).
2. Kuznetsova D.S., Timashev P.S., Bagratashvili V.N., Zagaynova E.V. Scaffold- and Cell System-Based Bone Grafts in Tissue Engineering (Review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2014; 6(4): 201–212. (in Russian)
3. Chan B.P., Leong K.W. scaffolding tissue engineering: general approaches and tissue- specific considerations. *Eur Spine J*. 2008; 17 (Suppl 4): 467 – 479:
4. Aleksandrova S.A., Nashkina Yu.A., Tsupkina N.V. Metodologicheskie podkhody sozdaniya tkaneinzhenernykh konstrukciy dlya vosstanovleniya defectov kostnoy tkani (opyt Instituta of Cytologii RAN). *Kletochnye cultury*. 2016; 32: 95-104. (in Russian)
5. Kirilova I.A., Sharkeev Yu.P., Nikolaev S.V. Physicomechanical properties of the extracellular matrix of a demineralized bone. *AIP Conference Proceedings*. 2016; 1760 (1): 020027. doi <https://doi.org/10.1063/1.4960246>
6. Vakhrushev I.V., Antonov E.N., Popova A.V. Razrabotka tkaneinzhenernykh implantyov dlya regeneracii kostnoy tkani na osnove polylactoglycolydnnykh scaffoldov novogo pokoleniya I multipotentnykh mezenkhimalnykh stvolovykh kletok pulpy molochnoy zuba. *Kletochnye tehnologii v biologii i medicine*. 2012; 1: 29-33. (in Russian)
7. Torgomyan A.L., Gambaryan A.K., Asratyan A.A., Hudaverdyan D.N. Sovremennye metody vosstanovleniya sustavnogo gialinovogo hryashcha pri osteoartrite. *Medicinskaya nauka Armenii NAN RA*. 2014; LIV(1): 23- 37 (in Russian)
8. Behrens P., Ehlers E.M., Kochermann K.U., Rohvedel J., Russlies M., Plotz W. New therapy procedure for localized cartilage defects. Encouraging results with autologous chondrocyte implantation. *MMW Fortschr. Med.*, 1999, 141: 49-51.
9. Kopelev P.V., Naschekina Y.A., Alexandrova S.A., Evaluation of the viability of rabbit chondrocytes in culturation on polylactic scaffolds intended for tissue engineering of cartilaginous tissue. *BIT*. 1 (2); 31-35. (in Russian)
10. Sovetnikov N.N., Kal'sin V.A., Konoplyanikov M.A., Muhanov V.V. Kletochnye tehnologii i tkanevaya inzheneriya v lechenii defectov sustavnoj poverhnosti. *Klinicheskaya praktika*. 2013; 1: 52-66. (in Russian)
11. Sergeeva N.S., Komlev V.S., Barinov S.M. i dr. EHvolyuciya vzglyadov na materialy, prednaznachennye dlya zameshcheniya kostno-hryashchevykh defectov. *Biotehnologiya: sostoyanie i perspektivy razvitiya: materialy VIII Moskovskogo Mezhdunarodnogo Kongressa. ZAO «EHkspo-biohim-tehnologii»*, RHTU im. D.I. Mendeleeva. 2015. (in Russian)
12. Pallante A.L., Chen A.C., Ball S.T. et al. The in vivo performance of osteochondral allografts in the goat is diminished with extended storage and decreased cartilage cellularity. *Am. J. Sports Med.* 2012; 40 (8): 1814-23 doi: 10.1177/0363546512449321
13. Deev RV., Tsupkina N.V., Bozo I.Ya. Tkaneinzhenernyy ekvivalent kosti: metodologicheskie osnovy sozdaniya I biologicheskie svoystva. *Kletochnaya transplantologiya I tkanevaya inzheneriya*. 2011; 6 (16): 62-67. (in Russian)

Для цитирования: Е.И. Щелкунова, А.А. Воропаева, А.В. Корель, Д.А. Майер, В.Т. Подорожная, И.А. Кирилова. Заселение деминерализованного костного матрикса клетками хондрогенного ряда. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2018; 7 (2): 102-111. DOI: 10.17802/2306-1278-2018-7-2-102-111

To cite: E.I. Shchelkunova, A.A. Voropaeva, A.V. Korel, D.A. Mayer, V.T. Podorognaya, I.A. Kirilova. Seeding of the demineralized bone matrix with chondrogenic cells. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2018; 7 (2): 102-111. DOI: 10.17802/2306-1278-2018-7-2-102-111