

DOI: 10.15825/1995-1191-2017-3-81-92

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА В ПРОТОЧНОМ БИОРЕАКТОРЕ

В.И. Севастьянов, Ю.Б. Басок, А.М. Григорьев, Л.А. Кирсанова, В.Н. Василец

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

В специально разработанном биореакторе проведены эксперименты по формированию тканеинженерной конструкции хрящевой ткани. На первом этапе была сформирована клеточно-инженерная конструкция, состоящая из биополимерного микроструктурированного коллагенсодержащего гидрогеля, мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч) и индукционной хондрогенной культуральной среды, которая была помещена в проточный биореактор. В ходе эксперимента установлено, что на 16-е сутки МСК ЖТч приобретают характерную для хондробластов уплощенную форму и проявляют высокую пролиферативную активность с формированием собственного внеклеточного матрикса. Анализ гистологической картины показал, что на данном этапе можно говорить о начале формирования тканеинженерной конструкции хрящевой ткани человека.

Ключевые слова: проточный биореактор, клеточно- и тканеинженерная конструкции, биополимерный матрикс, мезенхимальные стромальные клетки, хрящевая ткань.

APPLICATION OF TISSUE ENGINEERING TECHNOLOGY FOR FORMATION OF HUMAN ARTICULAR CARTILAGE IN PERFUSION BIOREACTOR

V.I. Sevastianov, Yu.B. Basok, A.M. Grigoriev, L.A. Kirsanova, V.N. Vasilets

V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Formation of tissue-engineered construct was performed in a specially developed bioreactor. At first, a cell-engineered construct of human cartilage tissue consisting of biopolymer microstructured collagen-containing hydrogel, mesenchymal stromal cells of human adipose tissue (hADMSCs) and induction chondrogenic culture medium was prepared and placed in a perfusion bioreactor. As a result, on the 16th day of the study hADMSCs obtain a flattened shape typical for chondroblasts and demonstrate high proliferative activity with the formation of their own extracellular matrix. Histological analysis of the cultured system indicates the beginning of the formation of a tissue-engineered construct of human cartilage tissue.

Key words: perfusion bioreactor, cell-engineered construct of human articular tissue, tissue-engineered construct of human articular tissue, biopolymer matrix, mesenchymal stromal cells, cartilage tissue.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время большое внимание уделяется разработке новых подходов к лечению дефектов хрящевых тканей, основанных на применении технологий тканевой инженерии и регенеративной медицины [1, 2]. Имеющиеся технологии можно разбить на две основные группы [3]:

- имплантация *in situ* клеточно-инженерной конструкции хрящевой ткани человека (КИК ХТч) для стимуляция процессов регенерации поврежденного суставного хряща;
- создание тканеинженерной конструкции хрящевой ткани человека (ТИК ХТч) с использованием специального устройства – биореактора, в кото-

Для корреспонденции: Севастьянов Виктор Иванович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (916) 173-41-84. E-mail: viksev@yandex.ru.

For correspondence: Sevastianov Victor Ivanovich. Address: 1, Shchukinskaya st., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel. (916) 173-41-84. E-mail: viksev@yandex.ru

ром из помещенной в него КИК ХТч формируется ТИК ХТч с последующей ее имплантацией пациенту для полной или частичной замены поврежденного хряща.

В обоих случаях КИК ХТч, состоящую из резорбируемого матрикса, аутологичных хондроцитов (АХ) и/или стволовых клеток, а также индукционной хондрогенной среды, содержащей необходимые сигнальные биомолекулы, предварительно культивируют *in vitro*.

При использовании КИК ХТч для стимулирования регенерации поврежденного хряща основная функция матрикса сводится к обеспечению функциональной активности клеток в месте имплантации в течение времени, достаточного для запуска процессов восстановления хрящевой ткани. В биореакторе матрикс играет роль временного искусственного внеклеточного матрикса, обеспечивающего длительное время необходимые условия для пролиферации/дифференцировки клеток и синтеза ими собственного внеклеточного матрикса (ВКМ).

Целью исследования явилось изучение эффективности КИК ХТч, состоящих из биополимерного микроструктурированного коллагенсодержащего гидрогелевого матрикса (БМКГ), мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч) и индукционной хондрогенной среды для регенерации поврежденного суставного хряща и формирования ТИК ХТч в проточном биореакторе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биополимерный гетерогенный гидрогелевый матрикс

В качестве биodeградируемого матрикса для создания клеточно-инженерной конструкции хряща был выбран БМКГ из линейного ряда композиции имплантируемого гетерогенного геля Сферо®гель (АО «Биомир сервис», г. Краснознаменск). Сферо®гель, инъекционная форма биополимерного гетерогенного гидрогеля, зарегистрированного в России для клинического применения, производится на основе компонентов тканевого ВКМ сельскохозяйственных животных и характеризуется высокой биосовместимостью и биостимулирующими свойствами. Описываемый БМКГ предназначен для замены дефектов мягких тканей, включая применение в области клеточных технологий [3–6].

Подготовка мезенхимальных стромальных клеток и состав КИК ХТч

В эксперименте использовали мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани, полученные от здорового донора в ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России при информированном

согласии пациента. Клетки выделяли и культивировали по стандартной методике на полной ростовой среде (ПРС) для мезенхимальных стволовых клеток человека MesenPRO RS™ без глутамин (Gibco®byLifeTechnologies™, США) с добавлением ростовых добавок MesenPRO RS™ Growth-Supplement (Gibco®byLifeTechnologies™, США) и L-Глутамин 2 мМ (ПанЭко, Россия). Для создания КИК ХТч использовали клетки 2-го пассажа.

Все процедуры проводили в асептических условиях. Клетки снимали с культурального пластика реактивом TrypLe (Invitrogen, США) после промывки монослоя раствором Версена (ПанЭко, Россия). Затем центрифугированием суспензию клеток в ПРС доводили до необходимой концентрации 6×10^6 кл/мл. Для получения КИК ХТч 500 мкл полученной суспензии послойно смешивали с 1 мл биоматрикса БМКГ. Полученный образец наносили на нейлоновую подложку и помещали в ячейку биореактора.

Экспериментальная модель (исследование *in vivo*)

Для анализа *in vivo* влияния внутрисуставного введения КИК ХТч на регенерацию гиалинового хряща большой берцовой кости кролика использовали экспериментальную модель адьювантного артрита (кролики, самки, советская шиншилла) с дальнейшим развитием в остеоартроз (ОА) в сочетании с клиническими, биохимическими, рентгенологическими и гистохимическими исследованиями [7]. Правый сустав служил в качестве отрицательного контроля; а в левый одной группе животных ($n = 5$) вводили БМКГ, а другой группе ($n = 5$) – КИК ХТч.

Описание биореактора

Для проведения экспериментов по формированию ТИК ХТч из КИК ХТч был разработан биореактор, схема которого представлена на рис. 1. Биоматрикс БМКГ с клетками помещали на мембрану из нейлона с размером пор 10 мкм (Merck Millipore Ltd., Ирландия), которая размещалась на пористой подложке рабочей ячейки биореактора.

В ходе предварительных испытаний на фибробластах мышцы линии NIH 3T3 было показано, что нейлоновые мембраны не проявляют по отношению к клеткам каких-либо цитотоксических свойств либо влияния на морфологию клеток. Следует также отметить, что только единичные клетки прикреплялись к поверхности нейлоновых мембран без дальнейшей пролиферации.

Биореактор включал в себя две независимые системы циркуляции. В каждой из них к резервуару с культуральной средой параллельно подключали две

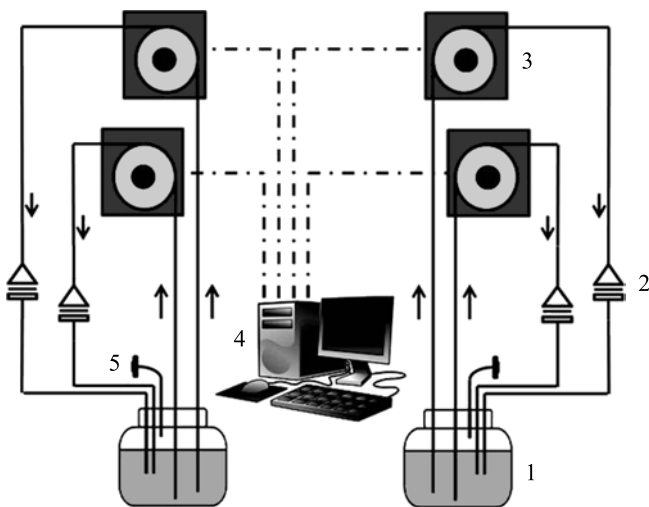


Рис. 1. Схема биореактора: 1 – резервуар со средой; 2 – рабочая ячейка биореактора; 3 – перистальтический насос; 4 – контроллер, управляемый компьютером; 5 – стерильный фильтр

рабочие ячейки (высота 5 мм, диаметр основания 22 мм). Постоянную циркуляцию среды с заданной скоростью обеспечивали четырьмя перистальтическими насосами (MasterFlex, США), размещенными снаружи CO_2 -инкубатора. Управление потоком осуществляли через связанный с компьютером контроллер (Harvard Apparatus, США) с помощью программного обеспечения ORCA Controller Software. Рабочие ячейки и резервуары со средой помещали в инкубатор, где поддерживали температуру 37°C , относительную влажность 90–100%, состав газовой смеси CO_2 – 5% и O_2 – 20%.

Прижизненное окрашивание клеток комплексом LIVE/DEAD

Через определенный отрезок времени культивирования образец КИК ХТч извлекали из ячейки биореактора, помещали в чашку Петри и окрашивали комплексом флуоресцентных красителей Live/Dead (Invitrogen, США). Данный комплекс состоит из двух компонентов: calcein AM дает зеленую флуоресценцию живых клеток, регистрируемую при длине волны 515 нм, ethidium homodimer-1, проникая через поврежденную мембрану клеток и связываясь с ДНК, дает красную флуоресценцию при 635 нм. Красители отличаются очень низкими значениями фонового свечения и хорошей диффузией в гидрогель, что позволяет использовать их для оценки состояния клеток в образце. Необходимые количества красителей смешивали в стерильном фосфатном буфере DPBS, после чего добавляли в чашку Петри с фрагментом ТИК. Через 30 минут инкубирования при комнатной температуре, образец фотографировали с использованием флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse TS100.

Гистологические методы исследования образцов

Образцы фиксировали в 10-процентном забуференном растворе формалина (не менее 4 ч), промывали в течение 15 минут в проточной воде и обезвоживали в спиртах восходящих концентраций (в двух порциях 70, 80, 96% этанола, по 5 минут в каждой смене спиртового раствора), выдерживали по 5–7 минут в смеси этанола и хлороформа, в хлороформе и заливали в парафин. Срезы толщиной 4–5 мкм, полученные с помощью микротомы Leica RM3255, депарафинировали, регидратировали и окрашивали, следуя стандартным методикам, гематоксилином и эозином, альциановым синим для выявления мукополисахаридов и на соединительную ткань по методу Массона. Анализ и фотосъемку полученных препаратов проводили, используя микроскоп Nikon Eclipse, оснащенный цифровой фотокамерой.

Окрашивание парафиновых срезов образцов гематоксилином и эозином

Срезы окрашивали гематоксилином Майера в течение 10 мин, промывали в проточной воде 3–5 мин, ополаскивали дистиллированной водой и окрашивали 1% раствором эозина 30–50 с. Ополаскивали дистиллированной водой, обезвоживали в этаноле с восходящими концентрациями (70, 80, 96%), просветляли в карбол-ксилоле, ксилоле и заключали в бальзам.

Окрашивание парафиновых срезов альциановым синим

Для приготовления раствора альцианового синего (Sigma, США) 1 г красителя растворяли в 100 мл 3% уксусной кислоты. Раствор фильтровали и наносили на депарафинированные и регидратированные срезы на 30 минут, после чего промывали в дистиллированной воде и докрасивали в течение 10 минут гематоксилином. Стекла со срезами выдерживали в проточной воде 3–5 минут, обезвоживали в спиртах восходящих концентраций, ксилоле и заключали в бальзам.

Окрашивание парафиновых срезов по методу Массона

Депарафинированные, регидратированные срезы окрашивали железным гематоксилином Вейгера в течение 2 минут, промывали водопроводной водой 15 минут и окрашивали кислым фуксином 2 минуты. После чего срезы быстро ополаскивали дистиллированной водой и помещали в 1-процентный раствор фосфорновольфрамной кислоты на 10 минут. Раствор кислоты сливали, не ополаскивая

срезы в воде, и помещали стекла в раствор анилинового синего на 1–2 минуты. Затем срезы ополаскивали водопроводной водой и дифференцировали в 1-процентном растворе уксусной кислоты в течение 10 минут. Проводили обезвоживание в спиртах восходящих концентраций, просветляли в ксилоле и заключали в балзам. При этом соединительнотканые волокна окрашиваются в синий цвет, ядра клеток – в черный или темно-синий, цитоплазма клеток – в малиново-розовый или красный.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Внутрисуставное введение КИК ХТч для регенерации поврежденного суставного хряща

На 90-е сутки после моделирования остеоартроза (ОА) суставов в контроле отмечены эрозии и отслоение поверхностных слоев, разрежение клеток в глубоких слоях, исчезновение столбчатой структуры, хаотичное расположение хрящевых клеток и локальное разъединение хрящевого матрикса (рис. 2, а). На 60-е сутки после инъекции БМКГ в пораженный сустав морфологических отличий в ткани по сравнению с отрицательным контролем не было. При этом отмечали начало формирования столбчатой структуры и относительную целостность поверхностного слоя. Интересно, что за тот же период после имплантации КИК ХТч в травмированный сустав в ткани присутствовали признаки частичной регенерации хрящевой структуры, такие как образования столбцов хондроцитов в среднем слое, восстановление поверхностного слоя (увеличение количества клеток), появление изогнутых групп клеток в ВКМ (рис. 2, б). Радиологические

исследования динамики развития ОА коленного сустава не позволили наблюдать процесс регенерации гиалинового хряща после инъекции КИК ХТч. Полученные результаты функциональной эффективности КИК ХТч на экспериментальной модели, для которой клеточный компонент являлся ксеногенным, можно объяснить стимулирующим действием КИК ХТч на процессы регенерации суставного хряща. Можно предположить, что регенеративный потенциал КИК ХТч был связан с активирующим влиянием на миграцию стволовых клеток из окружающих тканей в поврежденный участок и их последующей дифференцировкой в хондроциты.

2. Формирование ТИК ХТч из КИК ХТч в проточном биореакторе

В многосуточном эксперименте на каждую мембрану из нейлона (Millipore, Ирландия) наносили образец КИК ХТч в виде 1,5 мл суспензии МСК ЖТч в ростовой среде MesenPRO RS™, послойно смешанных с 1 мл БМКГ матрикса. При этом конечная концентрация клеток в смеси составляла 2×10^6 клеток на 1,0 мл КИК ХТч. Четыре рабочие ячейки биореактора с КИК ХТч одни сутки инкубировали в ростовой среде MesenPRO RS™ (Gibco® by Life Technologies™, США) в статике. Далее все четыре ячейки помещали в предварительно заполненную ростовой средой систему биореактора и инкубировали в условиях потока при скорости и объеме циркулирующей среды 0,5 мл/мин и 110 мл соответственно. Через 24 ч циркуляции ростовой среды одну ячейку с образцом (№ 1) извлекли из биореактора и провели в биореакторе замену ростовой среды на среду STEMPRO® (Gibco® by Life

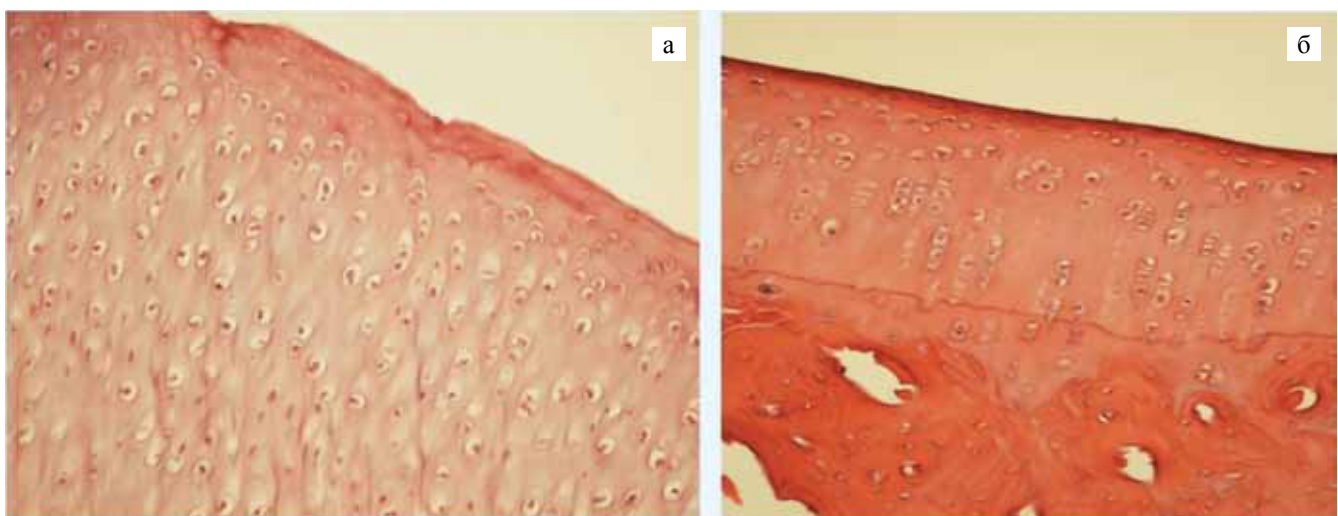


Рис. 2. Гистологическая структура хряща сустава большой берцовой кости кролика в экспериментальной модели ОА на 120-е сутки от начала эксперимента: а – правый коленный сустав через 90 суток после моделирования ОА (отрицательный контроль); б – левый коленный сустав через 90 суток после моделирования ОА и 60 суток после внутрисуставного введения КИК ХТч. Окраска – гематоксилин и эозин. $\times 200$

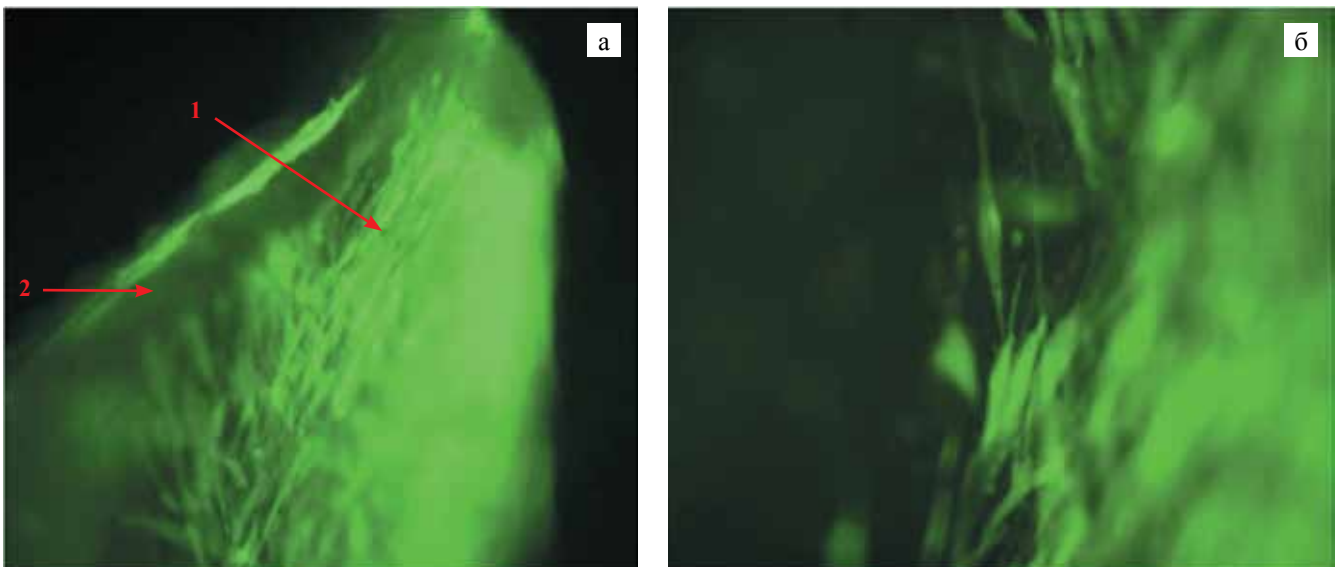


Рис. 3. Микрофотография поверхности образца № 3: 14 суток культивирования в дифференцировочной среде STEMPRO® в условиях потока. МСК ЖТч на поверхности микрочастицы БМКГ. Окрашивание флуоресцентными красителями Live/Dead (Invitrogen, США); а – $\times 50$, б – $\times 100$. 1 – скопление клеток; 2 – БМКГ

Technologies™, США), индуцирующую хондрогенную дифференцировку. На следующий день эксперимента (48 ч культивирования в условиях потока, из них 24 ч в дифференцировочной среде) из биореактора была изъята вторая ячейка с образцом (№ 2). На 14-й день культивирования в дифференцировочной среде из биореактора извлекли последнюю ячейку (образец № 3). Замену дифференцировочной среды проводили каждую неделю.

Образцы № 1 и № 3 дополнительно окрашивали флуоресцентным витальным красителем Live/Dead (Invitrogen, США) для контроля жизнеспособности клеток согласно методике, изложенной в инструкции фирмы-производителя. Через сутки после начала эксперимента клетки в большом количестве прикреплялись к частицам гидрогеля, распластывались. Оценка состояния клеток через две недели после замены среды на дифференцировочную показала, что на поверхности микрочастиц БМКГ идет пролиферация прикрепившихся клеток, и соответственно, рост клеточной массы (рис. 3) с образованием на некоторых участках гидрогеля сплошных клеточных пластов с высокой плотностью клеток.

Гистологическое исследование образца № 1 показало, что через двое суток культивирования в ростовой среде MesenPRO RS™ (24 ч в статике и 24 ч в условиях потока) клеточная масса на поверхности гидрогеля была незначительной. Клетки, обнаруживаемые на отдельных частицах БМКГ, характеризовались уплощенной, вытянутой формой и овальным ядром. Прикрепившиеся клетки были расположены строго на поверхности частиц гидрогеля и не проникали в толщу биоматрикса (рис. 4). Через 24 ч после замены ростовой среды на диф-

ференцировочную STEMPRO® (образец № 2) происходило заметное нарастание клеточной массы и распространение клеток по поверхности практически всех фрагментов гидрогеля. По сравнению с предыдущим образцом увеличивалось количество многослойных групп клеток, в которых определялись два морфологически различных клеточных типа: клетки уплощенной формы и клетки сигарообразной формы с округлым ядром (рис. 5). Также наблюдалось прорастание клеток в толщу биоматрикса, сопровождающееся резорбцией гидрогеля. Клетки приобретали уплощенную форму и формировали скопления в виде пластов.

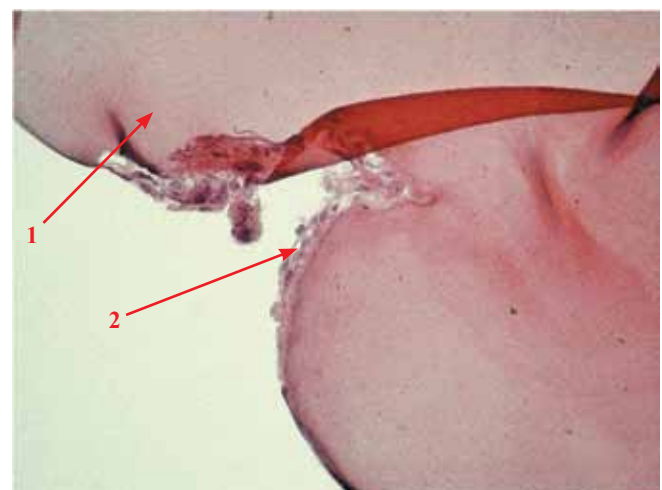


Рис. 4. Гистологическая картина образца № 1: культивирование КИК ХТч в ростовой среде MesenPRO RS™ в течение 24 ч в статике и 24 ч в условиях потока. Рост МСК ЖТч на поверхности биоматрикса БМКГ. Окрашивание гематоксилином и эозином. $\times 200$. 1 – БМКГ; 2 – клетки

Через 14 суток инкубации в условиях потока в дифференцировочной среде STEMPRO®, на 16-е сутки эксперимента в образце № 3 наблюдали значительное нарастание клеточной массы с прогрессивным увеличением доли внеклеточного матрикса (ВКМ), что свидетельствовало не только о пролиферативной, но и высокой функциональной активности клеток.

Соотношение клеток и матрикса при этом менялось в пользу последнего. Большинство клеток в этих трехмерных структурах имело фибробластоподобную форму.

Окрашивание образцов на соединительную ткань по методу Массона позволяло определить

во внеклеточном матриксе не только наличие коллагена, но и выявляло структурную организацию матрикса: тонкие синие волокна формировали сеть, окружающую фибробластоподобные клетки. При этом наиболее плотная упаковка коллагеновых фибрилл была в непосредственной близости клеток-продуцентов (рис. 6).

Использование альцианового синего для выявления мукополисахаридов во внеклеточном матриксе давало слабое сине-зеленое окрашивание, расцениваемое нами как позитивную реакцию на появление в составе ВКМ, синтезированного клетками, гликозаминогликанов (рис. 7). Полученные результаты, вероятно, свидетельствуют о дифференцировке

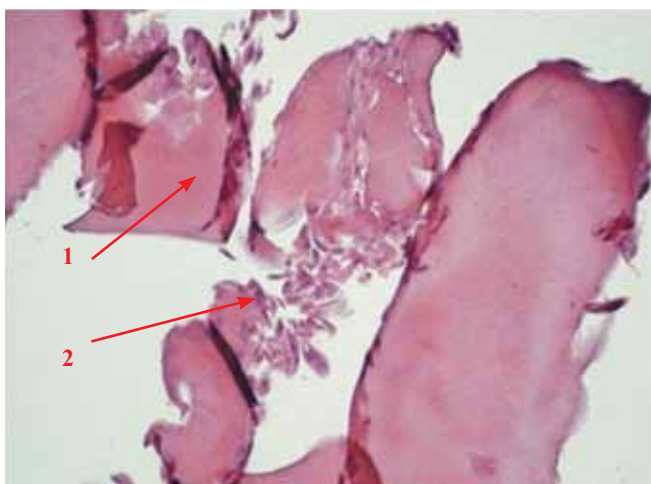


Рис. 5. Гистологическая картина образца № 2: культивирование 24 ч в дифференцировочной среде STEMPRO® в условиях потока. Начало формирования трехмерной клеточной структуры и прорастание МСК ЖТч в толщу биоматрикса. Окрашивание гематоксилином и эозином. ×200. 1 – БМКГ; 2 – скопление клеток

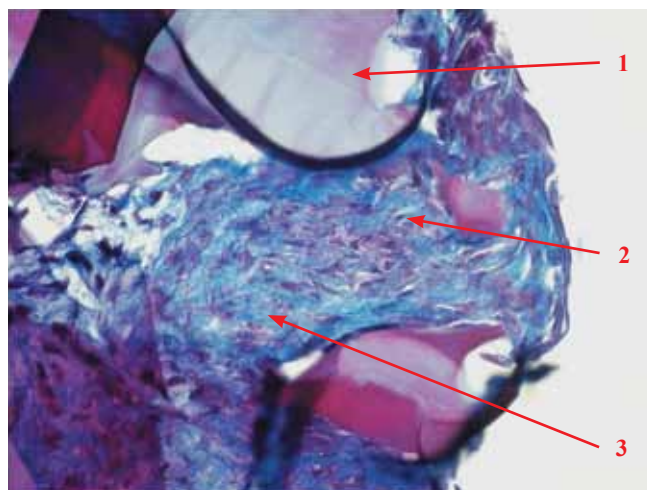


Рис. 6. Гистологическая картина образца № 3: 14 суток культивирования в дифференцировочной среде STEMPRO® в условиях потока. Коллагеновые волокна во внеклеточном матриксе. Окрашивание по методу Массона. ×200. 1 – БМКГ; 2 – клетка; 3 – ВКМ

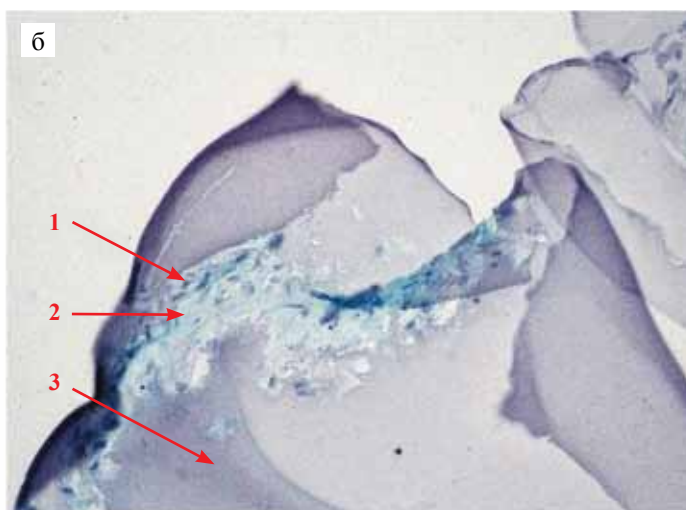
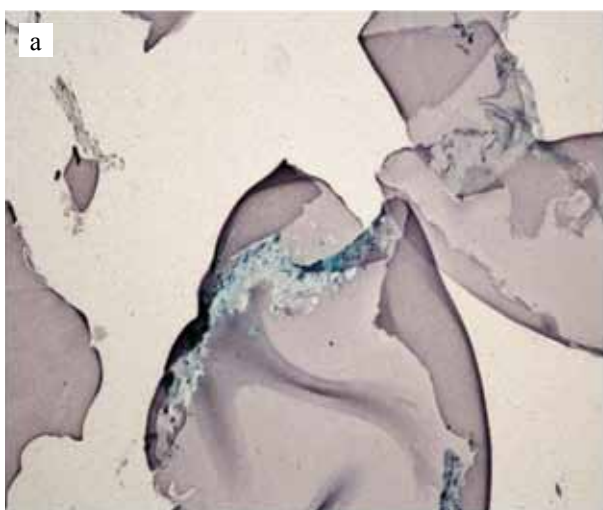


Рис. 7. Гистологическая картина образца № 3: 14 суток культивирования в дифференцировочной среде STEMPRO® в условиях потока. Позитивное окрашивание внеклеточного матрикса альциановым синим. а – ×100. б – ×200. 1 – клетки; 2 – ВКМ; 3 – БМКГ

МСК ЖТч в хондроциты и начале формирования ТИК ХТч.

Следует отметить существенное различие в гистологической картине образцов КИК ХТч при культивировании в статике и в условиях потока. При культивировании МСК ЖТч с биоматриксом БМКГ в хондрогенной среде в статике [8] через 14 суток наблюдали образование трехмерных структур (микросфер) размером ~ 30–300 мкм, что не было отмечено при культивировании КИК ХТч в проточном биореакторе. Как на сроках 14 и 28 суток дифференцировки в статике, так и на сроках 14 суток дифференцировки в условиях потока, нам не удалось выявить наличие коллагена II типа в полученных конструкциях, что может быть связано с малым временем дифференцировки. Заметим, что при культивировании КИК ХТч в статике цитоплазматическое окрашивание клеток антителами к коллагену человека II было обнаружено только к 42-м суткам хондрогенной дифференцировки [8].

INTRODUCTION

Recently, the development of new approaches to the treatment of cartilage tissue damage based on the use of tissue-engineering technologies and regenerative medicine attracted major attention [1, 2]. The existing technologies can be divided in two basic groups [3]:

- *in situ* implantation of cell-engineered construct of human articular tissue (CEC ATh) for the stimulation of regenerative processes of damaged articular cartilage;
- creation of a tissue-engineered construct of human articular tissue (TEC ATh) using a special device – a bioreactor where TEC ATh is formed from the placed in it CEC ATh with a subsequent implantation for full or partial replacement of damaged cartilage.

In both cases CEC ATh consisting of resorbable matrix, autologous chondrocytes (ACs) and/or stem cells, as well as induction chondrogenic culture medium, containing the necessary signal biomolecules, is preliminarily cultured *in vitro*.

When using CEC ATh for the stimulation of the regeneration of damaged cartilage, the main matrix function is the provision of functional cellular activity at the site of implantation during a time period sufficient for the launch of regenerative processes of cartilage tissue. In a bioreactor the matrix plays a role of a temporary artificial extracellular matrix which for a long period of time provides the conditions necessary for cell proliferation/differentiation and their synthesis of their own extracellular matrix (ECM).

The goal of this work was a study of the effectiveness of CEC ATh consisting of biopolymer microstructu-

ВЫВОДЫ

Таким образом, результаты проведенных экспериментов показали, что в биореакторе при скорости потока 0,5 мл/мин через 14 дней культивирования МСК ЖТч с биоматриксом БМКГ в хондрогенной среде происходит активная пролиферация клеток с прогрессивным увеличением продуцируемого клетками ВКМ. Гистохимический анализ образцов на этих сроках выявил наличие коллагена и гликозаминогликанов. Наблюдаемые морфологические изменения в культивируемой в биореакторе КИК ХТч свидетельствуют о начале формирования на 16-е сутки эксперимента ТИК ХТч.

Работа выполнена частично при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-29-07322).

Статья поступила в редакцию 1.03.2017 г.

red collagen-containing hydrogel (BMCH), mesenchymal stromal cells of human adipose tissue (hADMSCs), and induction chondrogenic culture as for the regeneration of damaged articular cartilage and the formation of TEC ATh in a dynamic environment of a perfusion bioreactor.

MATERIALS AND METHODS

Biopolymer heterogeneous hydrogel matrix

As a biodegradable matrix to develop cell-engineered construct of cartilage, the heterogeneous composition of the implantable gel *Sphero*®GEL (ZAO «Biomir service», Krasnoznamensk, Moscow Region) was selected. *Sphero*®GEL, an injectable form of biopolymer heterogeneous hydrogel registered in Russia for clinical use, is produced on the basis of tissue extracellular matrix components of farm animals, possesses high biocompatible and biostimulating properties, and is designed for soft tissue defects replacement, including application in cell technology [3–6].

Preparation of mesenchymal stromal cells and composition of CEC ATh

The study used hADMSCs obtained from a healthy donor at the Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Health of the Russian Federation with patient's informed consent. The cells were separated and cultured using the standard methods [12] on a complete growth medium (CGM) for mesenchymal human stem cells MesenPRO RS™ without glutamine (Gibco®byLifeTechnologies™,

USA) using MesenPRO RS™ Growth Supplement (Gibco®byLifeTechnologies™, USA) and L-Glutamine 2 mM (PanEko, Russia). In order to create CEC hATH the second passage cells were used. All procedures were conducted in aseptic conditions. Cells were removed from culture plastic using a reagent TrypLe (Invitrogen, USA) after rinsing the monolayer with Versene solution (PanEko, Russia). Then the cell suspension in CGM was centrifuged to the needed concentration of 6×10^6 cells/ml. In order to obtain CEC ATH, 500 µl of the suspension obtained were mixed in layers with 1 ml of BMCH biomatrix. The obtained sample was applied to a nylon polymer membrane and placed in a bioreactor culture chamber.

Experimental model (in vivo study)

An analysis *in vivo* of the influence of intra-articular introduction of CEC ATH on the regeneration of hyaline cartilage of the rabbit tibia was performed on the experimental model of the adjuvant arthritis (female Soviet Chinchilla rabbits) with the further development into osteoarthritis (OA) confirmed by the clinical, biochemical, and radiological trials [7]. The right joint served as a negative control; the left one was injected with the BMCH scaffold only for one group of animals (n = 5), while the other group (n = 5) received CEC hAC.

Description of a bioreactor

In order to conduct a study of formation of TEC ATH from CEC ATH, a bioreactor was developed as seen in Fig. 1. A BMCH matrix with cells was placed on a nylon membrane with pore size 10 µm (Merck Millipore Ltd., Ireland) which was located on the porous substrate of a bioreactor culture chamber.

During the preliminary trials on cell line NIH 3T3 mouse fibroblasts it had been shown that nylon mem-

branes are not cytotoxic to cells nor influence their morphology. It has to be noted that only singular cells were attaching to the surface of nylon membranes without further proliferation.

Bioreactor contained two independent circulation systems. In each of them two culture chambers (height 5 mm, base diameter 22 mm) were simultaneously attached to the reservoir with culture medium. Constant medium circulation with a given speed was provided by four peristaltic pumps (MasterFlex, USA) located outside the CO₂ incubator. The flow control was performed via the controller connected to a computer (Harvard Apparatus, USA) using ORCA Controller Software. Culture chambers and reservoirs with medium were placed in an incubator where 37 °C temperature, 90–100% relative humidity, and composition of gas mixture CO₂ – 5% and O₂ – 20% were maintained.

Vital cell LIVE/DEAD staining

After a defined time period a sample of CEC ATH was taken out of a bioreactor culture chamber, placed in a Petri dish and stained with fluorescent dyes Live/Dead. (Invitrogen, USA). This set consists of two components: calcein AM produces green fluorescence of live cells registered at 515 nm wave length, while ethidium homodimer-1 penetrating the damaged cell membrane and linking with DNA, results in red fluorescence at 635 nm. The dyes are distinguished by low flash values and good hydrogel diffusion which allows to use them for evaluation of cell condition in a sample. The needed amount of dyes was mixed with sterile phosphate buffer DPBS and then added to the Petri dish with a TEC fragment. After 30 minutes of incubation at room temperature the picture of the sample was taken with a fluorescent microscope Nikon Eclipse TS100.

Histological study of samples

The samples were fixated in 10% buffered formalin solution (no less than 4 h), rinsed during 15 minutes in running water and dehydrated in alcohols of rising concentrations (in two portions of 70, 80, 96% ethanol; 5 minutes in each replacement of alcohol solution), let stand 5–7 minutes in a mixture of ethanol and chloroform, in chloroform, and poured into paraffin. Sections with a thickness of 4–5 µm obtained using microtome Leica RM3255 were deparaffinized, rehydrated and stained per the standard methods with hematoxylin and eosin, alcian blue to detect mucopolysaccharides and connective tissue using Masson’s method. The analysis and imaging of the samples obtained were conducted using Nikon Eclipse microscope with a digital camera.

Staining of paraffin sections of samples with hematoxylin and eosin

Sections were stained with Mayer’s hematoxylin during 10 min, washed in running water for 3–5 min,

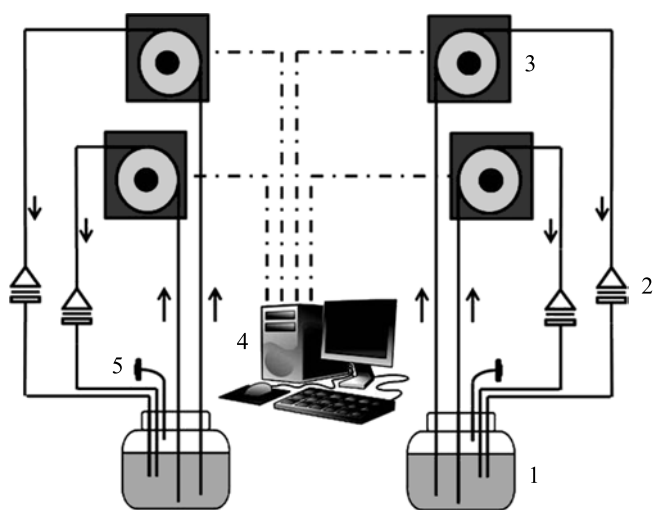


Fig. 1. Bioreactor set-up: 1 – reservoir with medium; 2 – culture chamber; 3 – peristaltic pump; 4 – computer-guided controller; 5 – sterile filter

rinsed with distilled water and stained with 1% eosin solution for 30–50 sec. Then they were rinsed in distilled water, dehydrated in ethanol with rising concentrations (70, 80, 96%), clarified in carbolxylol, xylene and placed in balm.

Staining of paraffin sections with alcian blue

In order to prepare an alcian blue solution (Sigma, USA) 1 g of dye was diluted in 100 ml of 3% acetic acid. The solution was filtered and applied to deparaffinized and rehydrated sections for 30 minutes after which they were rinsed in distilled water and additionally stained during 10 minutes with hematoxylin. Section slides were placed in running water for 3–5 minutes, dehydrated in alcohols of rising concentrations, xylene, and placed in balm.

Masson's staining of paraffin sections

Deparaffinized rehydrated sections were stained with Weigert's iron hematoxylin for 2 minutes, rinsed with running water for 15 minutes and stained with acid fuchsine for 2 minutes. Afterwards the sections were quickly rinsed with distilled water and placed into 1% solution of phosphotungstic acid for 10 minutes. The acid solution was drained without rinsing the sections and the slides were placed in aniline blue for 1–2 minutes. Then the sections were rinsed with running water and differentiated in 1% solution of acetic acid. Dehydration was performed in alcohols of rising concentrations, the sections were clarified in xylene and placed in balm. During this process the connective tissue fibers are stained blue, cell nuclei – black or dark-blue, cell cytoplasm – raspberry pink or red.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Intra-articular introduction of CEC ATH for the regeneration of damaged articular cartilage

On Day 90 after OA modeling the control joints demonstrated erosion and exfoliation of the superficial lamina, deep layer cellular rarefaction, columnar structure disappearance, chaotic location of cartilage cells and local separation of cartilage matrix (Fig. 2, a). On Day 60 after the injection of the BMCH scaffold alone into the affected joint the morphological difference in the tissue specimens compared to the negative control is not pronounced. The beginning of columnar structure formation and the relative superficial layer integrity were observed. Meanwhile, over the same timeframe following the implantation of CEC hAC into the injured joint the specimens demonstrate the signs of partial cartilage structure regeneration such as chondrocyte columnar formation in the middle layer, rejuvenation of superficial layer (the cell number increase), the emergence of isogenic cartilage cell groups in the extracellular matrix (Fig. 2, b). Radiological studies of the dynamics of the knee joint OA development did not allow to monitor the process of hyaline cartilage regeneration upon the injection of CEC hAC. The obtained results of the functional effectiveness of CEC hAC on the experimental model which is xenogenic by the cellular component to the recipient animal can be explained by the stimulating action of CEC hAC on the regeneration processes of articular cartilage. It can be assumed that the regeneration potential of CEC hAC is due to its activating effect on migration of stem cells from the surrounding tissue into the damaged area with the subsequent differentiation into chondrocytes.

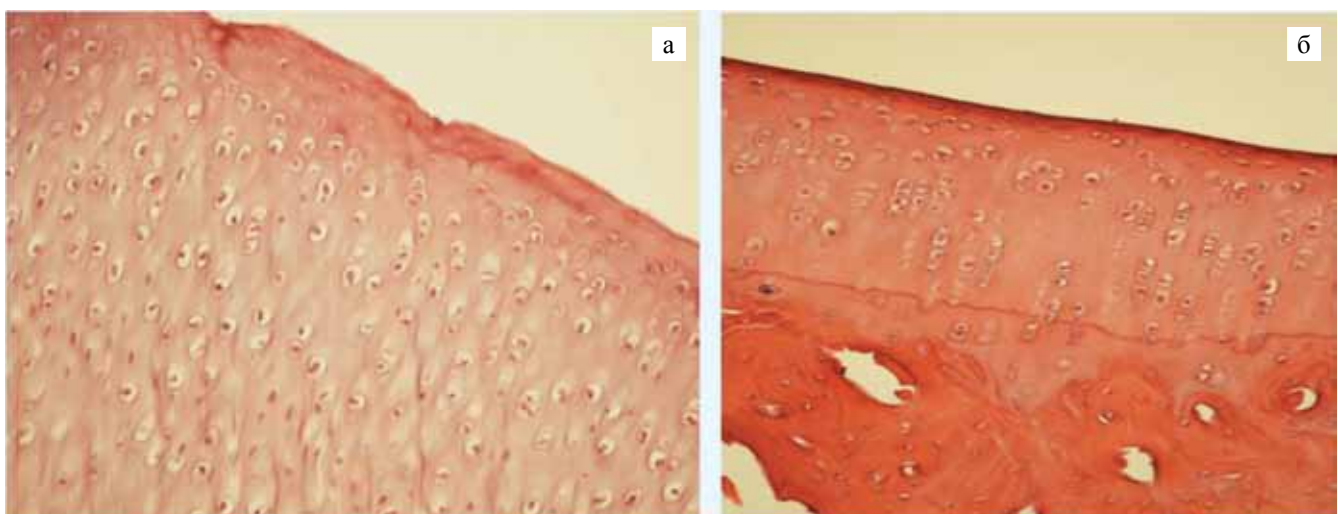


Fig. 2. The histological structure of the cartilage in the joints of the tibia in the rabbit experimental model of OA 120 days from the start of the experiment: a – the right knee joint after 90 days after modeling OA (negative control); b – left knee joint after 90 days after modeling OA and 60 days after intra-articular introduction of CEC hATH. Colouring with hematoxylin and eosin ($\times 200$)

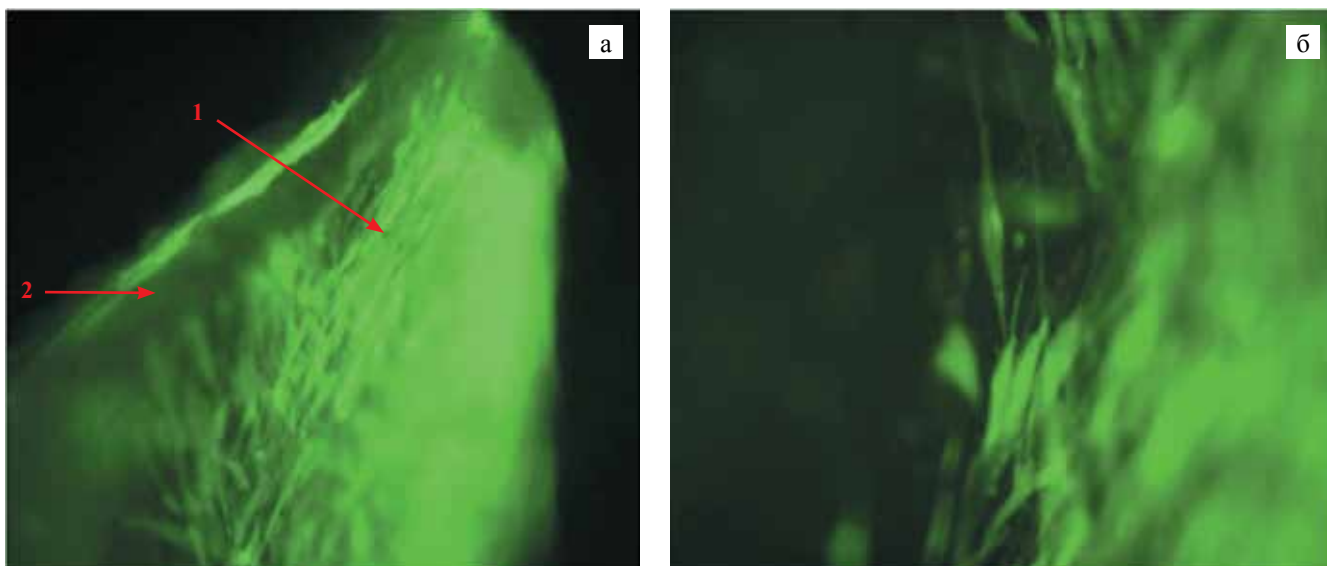


Fig. 3. Microphotograph of Sample № 3 surface: 14 days of culturing in STEMPRO® differential medium in flow conditions. hADMSCs on the surface of BMCH microparticle. Staining with fluorescent dyes Live/Dead (Invitrogen, USA). a – ×50, b – ×100. 1 – cell cluster; 2 – BMCH

2. The formation of TEC ATH from CEC ATH in a flow-through bioreactor

In a multi-day trial a sample of CEC ATH was applied to each nylon membrane (Millipore, Ireland) as 1.5 ml of hADMSC suspension in MesenPRO RS™ growth medium mixed by layers with 1 ml of matrix BMCH. At that, the final cell concentration in the mix was composed of 2×10^6 cells per 1.0 ml of CEC ATH. Four culture chambers of a bioreactor with CEC ATH were incubated for one day in MesenPRO RS™ growth medium (Gibco® by Life Technologies™, USA) in static conditions. Afterwards all four culture chambers were placed in a bioreactor system previously filled with growth medium and incubated in flow conditions at speed and volume of circulating medium of 0.5 ml/min and 110 ml respectively. After 24 h of growth medium circulation one culture chamber with a sample (№ 1) was removed from a bioreactor, while the growth medium in the bioreactor was replaced with a STEMPRO® (Gibco® by Life Technologies™, USA) medium inducing chondrogenic differentiation. On the next day of study (48 h of culturing in flow conditions, including 24 h in differential medium) the second culture chamber with Sample № 2 was removed from a bioreactor. On Day 14 of culturing in differential medium the last culture chamber (Sample № 3) was removed from the bioreactor. The differential medium was changed weekly. Samples № 1 and № 3 were additionally stained with fluorescent vital stain Live/Dead (Invitrogen, USA) to control cell viability according to manufacturer’s instructions. After one day of the beginning of the study large amounts of cells were attaching to hydrogel particles while flattening. The cell state evaluation after two weeks of medium replacement with the differential one has shown that on the surface of BMCH microparticles there was a

proliferation of the attached cells and, correspondingly, the growth of cellular mass (Fig. 3) with the formation on some hydrogel areas of uniform cellular layers with high cellular thickness.

Histological study of Sample № 1 demonstrated that after 2 days of culturing in MesenPRO RS™ growth medium (24 h in static and 24 h in flow conditions) the cell mass on the hydrogel surface was insignificant. Cells found on some BMCH particles were characterized by flattened elongated shape and oval nucleus. The attached cells were located strictly on the surface of hydrogel particles without penetration into biomatrix (Fig. 4). 24 h after the growth medium was replaced with STEMPRO® differential medium (Sample № 2),



Fig. 4. Histologic pattern of Sample № 1: culturing of CEC ATH in MesenPRO RS™ growth medium during 24 h in static conditions and 24 h in flow conditions. Growth of hADMSCs on the BMCH matrix surface. Hematoxylin and eosin staining. ×200. 1 – BMCH; 2 – cells

a noticeable growth of cellular mass took place as well as the distribution of cells on the surface of practically all hydrogel fragments. Compared to a previous sample, the amount of multilayered cellular groups has increased where two morphologically different cellular types could be detected: cells of flattened shape and cigar-shaped cells with rounded nucleus (Fig. 5). Additionally, a penetration of cells into biomatrix was observed accompanied by hydrogel resorption. Cells obtained a flattened shape and formed layers.

After 14 days of flow incubation in STEMPRO® differential medium, on Day 16 of the study in Sample № 3 a significant increase in cellular mass was observed with progressive increase in the share of extracellular matrix (ECM) which proved not only proliferative but also high functional cellular activity.

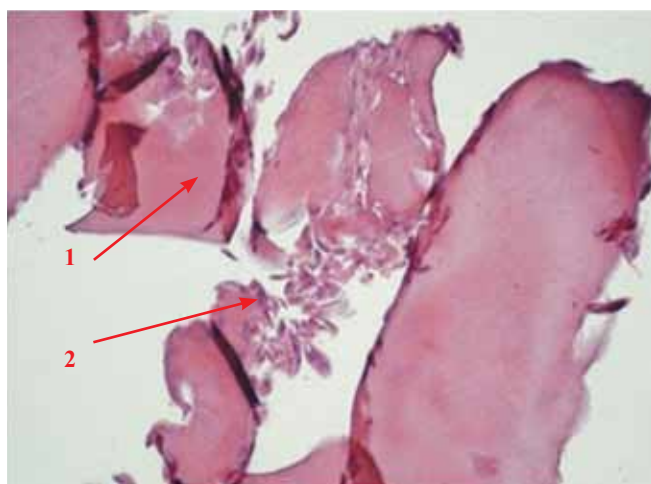


Fig. 5. Histologic pattern of Sample № 2: 24 h in STEMPRO® differential medium in flow conditions. The beginning of the formation of three-dimensional cellular structure and penetration of hADMSCs into biomatrix. Hematoxylin-eosin staining. ×200. 1 – BMCH; 2 – cell clusters

The proportion of cells and matrix was changing in favor of the latter. The majority of cells in those three-dimensional structures had fibroblast-like shape. Masson’s staining for connective tissue allowed not only to determine the presence of collagen in the extracellular matrix but also to reveal the matrix structure: thin blue fibers formed a net surrounding the fibroblast-like cells. At that, the densest packaging of collagen fibrils was in the immediate surrounding of producer cells (Fig. 6).

The use of alcian blue in order to detect mucopolysaccharides in extracellular matrix resulted in a weak blue-green staining which we evaluated as a positive reaction to glycosaminoglycans appearing in the cell-synthesized ECM (Fig. 7). The results obtained possib-

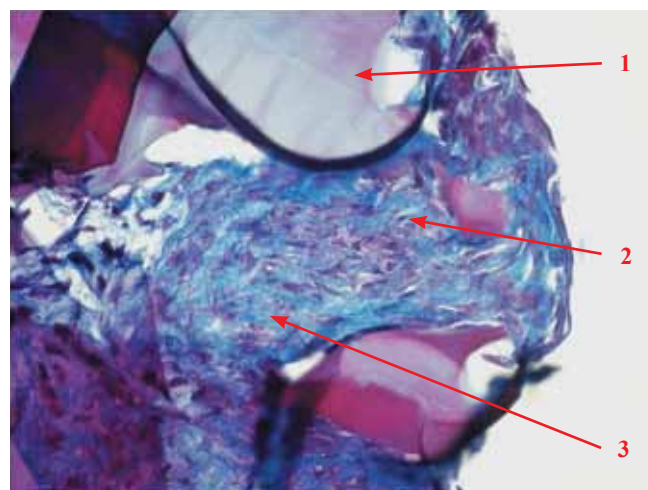


Fig. 6. Histological pattern of Sample № 3: 14 days of culturing in STEMPRO® differential medium in flow conditions. Collagen fibers in extracellular matrix. Masson’s staining. ×200. 1 – BMCH; 2 – cell; 3 – ECM

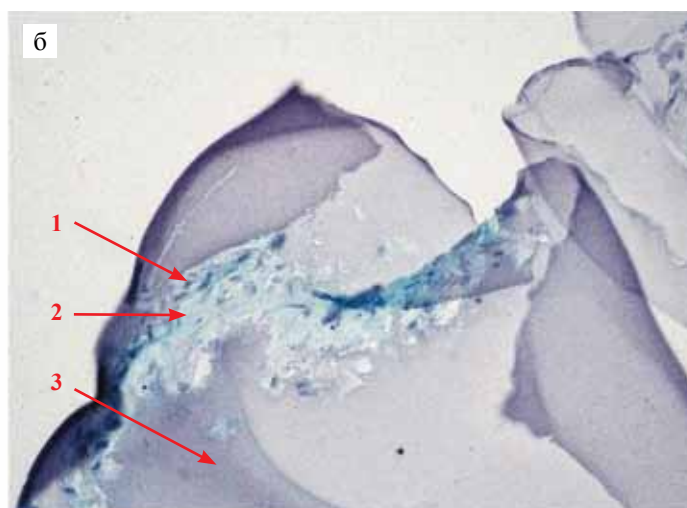
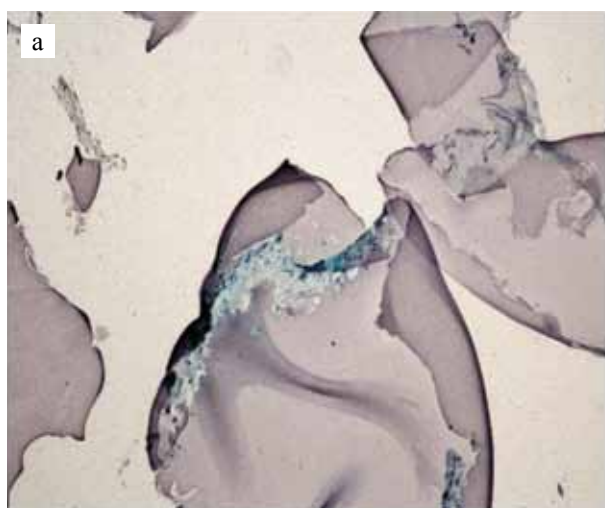


Fig. 7. Histologic pattern of Sample № 3: 14 days of flow culturing in STEMPRO® differential medium. Positive staining of extracellular matrix with alcian blue. a – ×100, b – ×200. 1 – cells; 2 – ECM; 3 – BMCH

ly indicate the differentiation of hADMSCs into chondrocytes and the beginning of TEC ATH formation.

It is important to note a significant difference in histologic pattern of CEC ATH samples in static and flow culturing. While culturing hADMSCs with BMCH matrix in chondrogenic medium in static conditions [8], after 14 days a formation of three-dimensional structures (microspheres) size ~ 30–300 μm was observed which was not noted while culturing CEC ATH in a perfusion bioreactor. Both at Day 14 and 28 in static conditions, as well as at Day 14 in flow differentiation conditions we were unable to detect the presence of type II collagen in the constructs obtained which may be caused by the short differentiation time. Let it be noted that during static culturing of CEC ATH, the cytoplasmic cell staining with human collagen II antibodies was detected only on Day 42 of chondrogenic differentiation [8].

Thus, the test results have shown that in a bioreactor at a flow rate of 0.5 ml/min after 14 days of hADMSC culturing with BMCH biomatrix in chondrogenic medium, an active cellular proliferation with a progressive increase of ECM produced by cells takes place. A histochemical analysis of samples at that time revealed the presence of collagen and glycosaminoglycans. The observed morphological changes in a bioreactor-cultured CEC ATH confirm that the formation of TEC ATH started on Day 16 of the study.

CONCLUSIONS

The obtained results demonstrate the effectiveness of CEC ATH consisting of biopolymer microstructured collagen-containing hydrogel (BMCH), mesenchymal stromal cells of human adipose tissue (hADMSCs), and induction chondrogenic culture as for the regeneration of damaged articular cartilage in experimental model of osteoarthritis and the formation of TEC ATH in a dynamic environment of a perfusion bioreactor.

This work was partially supported by Russian Foundation of Basic Research grant № 16-29-07322.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Liu M, Yu X, Huang F, Cen S, Zhong G, Xiang Z. Tissue engineering stratified scaffolds for articular cartilage and subchondral bone defects repair. *Orthopedics*. 2013; 36 (11): 868–873. doi: 10.3928.
2. Stubbs AJ, Howse EA, Mannava S. Tissue engineering and the future of hip cartilage, labrum and ligamentum teres. *J. Hip. Preserv. Surg.* 2015; 11 (3): 23–29. doi: 10.1093.
3. Sevast'janov VI, Grigor'ev AM, Skaleckij NN, Got'e SV. Razrabotka i jeksperimental'no-klinicheskoe issledovanie tkaneinzhenernoj konstrukcii hrjashha. *Transplantologija: itogi i perspektivy*. 2014. T. VI. Pod red. S.V. Got'e. M., 2015: 125–130.
4. Sevast'janov VI, Perova NV, Nemeč EA, Surguchenko VA, Ponomareva AS. Primery jeksperimental'no-klinicheskogo primenenija biosovmestimyh materialov v regenerativnoj medicine. *Biosovmestimye materialy (učebnoe posobie)*. Pod red. V.I. Sevast'janova i M.P. Kirpichnikova. M.: MIA, 2011. Chast' II, glava 3: 237–252. [In Russ].
5. Solov'eva IV, Perova NV, Sevast'janov VI. Vozmožnosti primenenija biopolimernogo mikrogeterogennogo kolagensoderžashhego gelja pri travmah i zabolevanijah oporno-dvigatel'nogo apparata. *Sovremennaja medicina*. 2016; 2: 66–69. [In Russ].
6. Solov'eva IV, Shesternja N, Perova NV, Sevast'janov VI. Kombinirovannoe primenenie biopolimernogo geterogennogo gidrogelja i gialuronovoj kisloty pri OA (pervyj opyt). *Vrach*. 2016; 1: 12–17. [In Russ].
7. Sevastianov VI, Dukhina GA, Grigoriev AM, Perova NV, Kirsanova LA, Skaletskij NN et al. The functional effectiveness of a cell-engineered construct for the regeneration of articular cartilage. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2015; 17 (1): 86–96. doi:10.15825/1995-1191-2015-1-86-96. [In Russ, English abstract].
8. Surguchenko VA, Ponomareva AS, Kirsanova LA, Skaleckij NN, Sevastianov VI. The cell-engineered construct of cartilage on the basis of biopolymer hydrogel matrix and human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (*in vitro* study). *J. Biomed. Mater. Res*. 2015; 103A (2): 463–470.

The article was submitted to the journal on 1.03.2017