

ИССЛЕДОВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ХОНДРОБЛАСТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ПАССАЖИРОВАНИЯ IN VITRO

Корель А.В.¹, Фаламеева О.В.¹, Кирилова И.А.¹, Садовой М.А.^{1,2}

¹ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, Новосибирск, e-mail: AKorel@niito.ru;

²ФГБОУ ВО «НГМУ» Минздрава России, Новосибирск, e-mail: niito@niito.ru

Необходимость достаточно длительного культивирования первично выделенных клеток для наработки определенного объема клеточной массы для использования в области клеточных технологий ставит вопрос определения оптимального периода использования клеточных линий. Для этого оценивают влияние длительного культивирования клеточных культур на пролиферацию, дифференцировку, длину теломера, фенотип и морфологию этих клеток. Поскольку в литературе не было обнаружено исследований синтетических особенностей хондробластов в зависимости от длительного пассажирования, нами было предпринято исследование способности хондробластов пластинки роста позвонков синтезировать гликозаминогликаны внеклеточного матрикса (уроновые кислоты и сульфатированные гликозаминогликаны) в динамике роста культуры. Исследуя культуральные среды, полученные при пересеве хондробластов беспородного щенка (2 месяца), было установлено, что пик синтетической активности хондробластов находится в промежутке от 1-го до 6-го пассажа. Полученные данные дают основание утверждать, что период от 1–6 пассажа является оптимальным для клеточных манипуляций с хондробластами. Таким образом, исходя из литературных данных и наших результатов хондробласты при длительном пассажировании теряют свои морфо-функциональные характеристики и снижают синтетическую активность. В связи с этим, целесообразнее использовать их для клеточной и генной терапии на ранних пассажах.

Ключевые слова: хондробласты, длительное пассажирование, синтетическая активность, гликозаминогликаны.

INVESTIGATION OF SYNTHETIC ACTIVITY OF HONDROBLASTES DEPENDING ON PASSENGING DURATION IN VITRO

Korel A.V.¹, Falameeva O.V.¹, Kirilova I.A.¹, Sadovoy M.A.^{1,2}

¹Novosibirsk research Institute of traumatology and orthopedics n. a. Ya. L. Tsivyan, Novosibirsk, e-mail: AKorel@niito.ru;

²Novosibirsk State Medical University Novosibirsk, e-mail: niito@niito.ru

The need for a sufficiently long cultivation of the primary isolated cells for the production of a certain volume of cell mass for use in the field of cellular technologies raises the question of determining the optimal period for the use of cell lines. To do this, the effect of prolonged cultivation of cell cultures on proliferation, differentiation, telomere length, phenotype and morphology of these cells is evaluated. Since, in the literature, no studies of the synthetic features of chondroblasts were found depending on long-term travel, we undertook a study of the ability of the chondroblasts of the vertebral growth plate to synthesize the glycosaminoglycans of the extracellular matrix (uronic acids and sulfated glycosaminoglycans) in the growth dynamics of the culture. Investigating the culture media obtained by the transplantation of the non-pedigree puppy's chondroblasts (2 months), it was found that the peak of the synthetic activity of the chondroblasts is in the interval from the 1st to the 6th passage. Thus, based on literature data and our results, chondroblasts lose their morpho-functional characteristics during prolonged passage and reduce their synthetic activity. In this regard, it is more appropriate to use them for cell and gene therapy in early passages.

Keywords: chondroblasts, prolonged passaging, synthetic activity, glycosaminoglycans.

Цель тканевой инженерии – создание функциональных тканевых трансплантатов, которые могут способствовать регенерации или замещению дефектов в тканях. В настоящее время исследуются возможности создания трансплантатов – тканеинженерных конструкций – на основе биоразлагаемых носителей, заполняемых тканеспецифическими клетками, предварительно выращенными in vitro. Чтобы в полной мере мобилизовать биологический

потенциал клеток, в настоящее время разрабатывается новое поколение систем тканевого инжинеринга с учетом экспансии клеток в культуре и наработки ими межклеточного матрикса. Для преодоления проблемы недостаточного количества донорских клеток при заселении их в матрицы необходимо увеличить их численность в культуре *in vitro* в течение адекватного времени культивирования и пассажирования, когда клетки достигают необходимой численности и дифференцировки. В этом случае необходимо определить сроки культивирования клеток для оптимального заселения матриц. В работе с клеточными культурами обычно используют 3–5 пассажей [1]. Этот выбор основан на исследованиях морфологии, кариотипической стабильности, способности к дифференцировке длительно культивированных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) [2]. В доступной литературе представлен ряд работ, посвященных исследованию зависимости синтетической активности от времени культивирования эндотелиоцитов [3], МСК [2, 4], но работ, посвященных этой проблеме, применительно к хондробластам не обнаружено. Функциональная активность клеток определяется способностью создавать и накапливать в окружающей среде внеклеточный матрикс. Основными компонентами гиалинового хряща являются коллаген и протеогликаны. Протеогликаны – сложные белково-углеводные молекулы, состоящие из центральной нити белка и прокрепленных к ней углеводных цепей – гликозаминогликан (ГАГ). ПГ в ткани обеспечивают метаболические потоки, межклеточные контакты, биомеханическую прочность. В культуре клеток синтезированные протеогликаны обеспечивают межклеточные контакты и способствуют формированию монослоя [5].

Цель работы

Исследовать способность хондробластов пластинки роста позвонков синтезировать гликозаминогликаны внеклеточного матрикса в динамике роста культуры.

Материал и методы

Материалом для культивирования служили хондробласты, извлеченные в стерильных условиях из пластики роста позвонков двухмесячного беспородного щенка. Исследование выполнено с соблюдением положений Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации и Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (утв. Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.03.2003 г. № 226). Гиалиновый хрящ отмывали в растворе Хенкса с канамицином 1 г/л в течение 15 минут, измельчали в чашке Петри с минимальным объемом среды RPMI 1640 (Биолот, Россия) до размеров 1–2 мм², а затем помещали в раствор 1,5 % коллагеназы II типа (Gibco) в силиконизированной посуде для инкубирования на шейкере при температуре 37 °С в течение 5–8 часов.

Суспензию пропускали через нейлоновый фильтр и центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Далее клетки ресуспендировали в ростовой питательной среде. Полученную популяцию клеток культивировали в культуральных флаконах в концентрации 3×10^5 /мл в среде RPMI 1640 1:1 с добавлением 20 фетальной сыворотки плодов коров (Gibco) и 100 ед/мл пенициллина-стрептомицина (Биолот, Россия), инкубировали в культуральных флаконах (TRP) в стандартных условиях CO_2 инкубатора: 37 °C и 5 % CO_2 .

Смену среды осуществляли 2 раза в неделю. При достижении монослоем 80 %-й конfluence, клетки переводили в суспензию с использованием раствора трипсина 0,02 и версена 0,025 в соотношении (1:1) и рассевали в соотношении 1:3. На 1–10 пассажах (3–30 дней) среды культивирования клеток забирали для исследования содержания в них гликозаминогликанов (ГАГ).

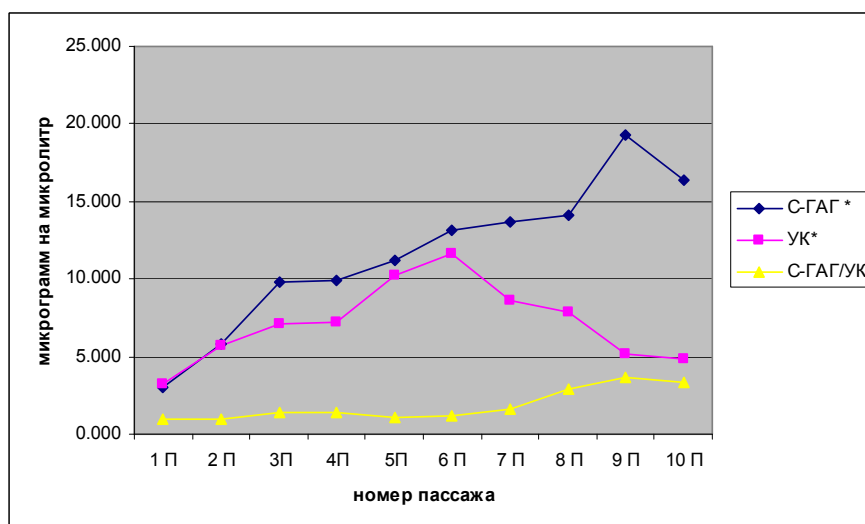
Для выделения ГАГ среды обрабатывали раствором папаина с добавлением 0,01M ЭДТА и 0,005 M цистеина в буфере 0,2 M ацетата натрия pH 5,8 (60 °C, 18 часов, 0,2 мг папаина на грамм сырой ткани). Раствор диализовали против буфера 0,05 M ацетата натрия с 0,01M ЭДТА pH 5,8 (+4 °C, 24 часа). Белки из экстрактов осаждали ТХУ (5 % конечная концентрация) и удаляли центрифугированием (9000 g, +2°C, $r_{\infty} = 8$ см). После повторного диализа ГАГ осаждали тремя объемами этанола в присутствии 4 % ацетата калия (-18 °C, 24 часа), осадок отделяли центрифугированием, промывали этанолом, ацетоном и высушивали в вакуумном эксикаторе. Выделенные ГАГ растворяли в дистиллированной воде. Количество определяли по присутствию гексуроновых кислот и сульфатированных ГАГ [6]. Результаты представлены в виде микрограммов на 100 микролитров среды. Отношение количеств ГАГ, определяемых по гексуроновым кислотам и по количеству сульфатированных групп, считали показателем степени сульфатированности. В качестве стандарта использовали хондроитинсульфат С и гексуроновую кислоту фирмы ICN.

Результаты и обсуждение

При исследовании влияния длительного пассажирования на синтез хондробластами компонентов межклеточного матрикса было установлено (рисунок, таблица), что количество уроновых кислот (УК) нарастает с 1-го по 6-й пассаж ($3.282 \pm 0.164 - 11.589 \pm 0.579$ мкг/мкл), количество сульфатированных ГАГ (С-ГАГ) нарастает с 1-го по 9 пассаж ($3.041 \pm 0.152 - 19.238 \pm 0.962$ мкг/мкл).

Количество ГАГ, синтезированных хондробластами дикого щенка (2 месяца) во время длительного пассажирования. * – количественный состав ГАГ в микрограммах на 100 микролитров; С-ГАГ – сульфатированные ГАГ, УК – уроновые кислоты, С-ГАГ/УК – отношение количества сульфатированных ГАГ к количеству уроновых кислот.

№ пассажира	С-ГАГ *	УК*	С-ГАГ/УК
1	3,041±0,152	3,282±0,164	0,927
2	5,808±0,290	5,734±0,287	0,956
3	9,804±0,490	7,104±0,355	1,380
4	9,876±0,494	7,178±0,359	1,370
5	11,192±0,560	10,279±0,514	1,083
6	13,132±0,657	11,589±0,579	1,133
7	13,638±0,682	8,648±0,432	1,578
8	14,112±0,706	7,837±0,392	2,917
9	19,238±0,962	5,179±0,259	3,715
10	16,341±0,817	4,82±0,241	3,391



Количество ГАГ (в микрограммах на 100 микролитров), синтезированных хондробластами дикого щенка (2 месяца) во время длительного пассажирования. С-ГАГ – сульфатированные ГАГ, УК – уроновые кислоты, С-ГАГ/УК – отношение количества сульфатированных ГАГ к количеству уроновых кислот

Соотношение С-ГАГ/УК, которое указывает на степень сульфатированности ГАГ остается неизменным (0,927–0,874), близким к единице с 1-го по 6-й пассаж (что указывает на высокий уровень синтеза обоих компонентов ВКМ), далее с 7-го по 9-й пассаж наблюдает небольшой рост (1,578–3,715) и к 10-му пассажиру наблюдается снижение небольшое (3,390). Эта динамика отражает различия в синтетической активности хондробластов с 7-го пассажира: снижение синтеза С-ГАГ (8,648±0,432 – 4,82±0,241 мкг/мкл) и продолжение нарастания синтеза УК до 9-го пассажира (13,638±0,682 – 5,179±0,259 мкг/мкл), с понижением на 10-м

пассаже ($4,82 \pm 0,241$ мкг/мкл). Таким образом, можно определить оптимальный период использования хондробластов для тканеинженерных манипуляций: 1–6 пассаж (3–12 дней).

Необходимость достаточно длительного культивирования первично выделенных клеток для наработки определенного объема клеточной массы для дальнейшего использования в области клеточных технологий ставит задачи типирования клеточных линий с целью определения оптимального периода их использования. Для этого оценивают влияние длительного культивирования (7–10 пассажей) клеточных культур на пролиферацию, дифференцировку, длину теломера, фенотип и морфологию этих клеток [1, 7, 8].

К сожалению, в доступной литературе не было обнаружено данных по типированию хондробластов. МСК наиболее хорошо охарактеризованные на настоящий момент, в силу того, что их активно используют для дифференцировки и последующих манипуляций. Исследования в области стандартизации и паспортизации МСК показали, что уровень дегидрогеназной активности в первичной культуре клеток мезенхимального происхождения возрастает на протяжении первых 5–7 пассажей, после чего постепенно снижается, что коррелирует со снижением терапевтического эффекта их использования. Также было установлено, что кариотип клеток в первичной культуре мезенхимального происхождения остаётся неизменным на протяжении первых десяти пассажей [7].

Мультипотентные МСК, выделенные из подкожно-жировой клетчатки человека в условиях длительного (начиная с 17-го пассажа) культивирования, теряют способность к адгезии с белками внеклеточного матрикса (коллаген, фибронектин, ламинин). Обнаружено, что, если на ранних пассажах (2–5), пассаж ММСК, выделенный из подкожно-жировой клетчатки человека, способен при соответствующей индукции дифференцироваться в хондро-, остеобласты и адипоциты, то на поздних пассажах (после 17 пассажа) сохраняется только адипогенный дифференцировочный потенциал [8].

В настоящее время широко изучено влияние длительного пассажирования на изменение биохимических свойств эндотелиальных клеток различных типов. Например, снижение пролиферативной активности, увеличение экспрессии белков окислительного стресса, активация сигнальных путей NFκ-B и p53 [9], снижение производства оксида азота и экспрессия поверхностно-активного белка D (SP-D) [10] были обнаружены в культуре эндотелиальных клеток коронарных артерий после многократного пассажирования *in vitro*. Был также выявлен усиленный апоптоз эндотелиальных клеток легочной артерии свиней [11].

При исследовании влияния длительного хранения клеточных линий на -80 °C на адгезивные, пролиферативные, дифференцировочные свойства, был также определен

оптимальный период для клеточных манипуляций 2–5 пассажей, причем два первых пассажа были необходимы для адаптации культуры клеток после хранения [3].

Полученные нами результаты хорошо коррелируют с литературными данными, хотя они посвящены другим клеточным линиям, но можно утверждать, что работы с клеточными культурами должны проводиться в период максимальной синтетической активности и фенотипической стабильности, в нашем исследовании это 1–6 пассажи.

Заключение

Таким образом, исходя из литературных данных и наших результатов, хондробласты при длительном пассажировании теряют свои морфо-функциональные характеристики и снижают синтетическую активность. В связи с этим, целесообразнее использовать их для клеточной и генной терапии на ранних пассажах.

Список литературы

1. Стандартизация биохимического профиля клеточных материалов мезенхимального происхождения методом зондирования уровня дегидрогеназной активности / В.В. Бурунова [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2010. – № 2. – С. 63-67.
2. Jianchun L., Shijie Lv., Chang L., Yang L., Shujun W., Xin G., Feng N., Hua Y., Xin H., Guangwei Su., Xiaojun M. Effects of Serial Passage on the Characteristics and Cardiac and Neural Differentiation of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells // Stem Cells International. Vol. 2016. ID 9291013. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9291013>.
3. Liao H., He H., Chen Y., Zeng F., Huang J., Wu L., Chen Y. Effects of long-term serial cell passaging on cell spreading, migration, and cell-surface ultrastructures of cultured vascular endothelial cells // Cytotechnology. 2014. Vol. 66. No. 2. P. 229–238/ doi: 10.1007/s10616-013-9560-8.
4. Mohyeddin-Bonab M., Alimoghaddam K., Talebian F., Hamid-Ghaffari S., Ghavamzadeh A., Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro // BMC Cell Biol. 2006. P. 7–14. doi: 10.1186/1471-2121-7-14.
5. Melrose J., Smith S.M., Little C.B., Moore R.J., Vernon-Roberts B., Fraser R.D. Recent advances in annular pathobiology provide insights into rim-lesion mediated intervertebral disc degeneration and potential new approaches to annular repair strategies // Eur. Spine J. 2008. Vol.17, No. 9. P. 1131-1148.
6. Морфофункциональные закономерности регуляции хондрогенеза пластинок роста тел позвонков и подвздошной кости / А.М. Зайдман [и др.] // Хирургия позвоночника. – 2013. – № 3. – С. 068-080.

7. Сравнительный анализ цитофенотипов клеток мезенхимального ряда, изолированных из тканей человека / Ю.Г. Суздальцева [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2007. – № 1. – С. 38-45.
8. Савченкова И.П., Савченкова Е.А., Гулюкин М.И. Изменения мультипотентных стромальных клеток, выделенных из подкожно-жировой ткани человека, в результате длительного культивирования / И.П. Савченкова, Е.А. Савченкова, М.И. Гулюкин // Цитология. – 2017. – Т. 59. – № 5. – С. 307-314.
9. Lee M.Y., Wang Y., Vanhoutte P.M. Senescence of cultured porcine coronary arterial endothelial cells is associated with accelerated oxidative stress and activation of NFκB // J Vasc Res. 2010. Vol. 47. P. 287–298. doi: 10.1159/000265563.
10. Lee M.Y., Sorensen G.L., Holmskov U., Vanhoutte P.M. The presence and activity of SP-D in porcine coronary endothelial cells depend on Akt/PI3 K, Erk and nitric oxide and decrease after multiple passaging // Mol Immunol. 2009. Vol. 46. P. 1050–1057. doi: 10.1016/j.molimm.2008.09.027.
11. Zhang J., Patel J.M., Block E.R. Enhanced apoptosis in prolonged cultures of senescent porcine pulmonary artery endothelial cells // Mech Ageing Dev. 2002. Vol. 123. P. 613–625. doi: 10.1016/S0047-6374(01)00412-2.