

**МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ
ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ХРЯЩА КРЫСЫ ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ
ИНЖЕНЕРИИ**

*Величко А. В., Музыченко Б. А., Назаренко Е. М., Дубко А. Д.,
Нижегородова Д. Б., Зафранская М. М.*

*Международный государственный экологический институт имени
А. Д. Сахарова Белорусского государственного университета,
Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической
медицины Белорусского государственного медицинского университета
e-mail: alesjswirskay@mail.ru*

Summary. *Cartilage progenitor cells are promising candidates for cell-based therapy of degenerative changes cartilage tissue. The developed methodology included the stages of mechanical and enzymatic sample preparation of cartilage tissue, the stage of cell culture with an assessment of cell culture viability, and the stage of confirmation of authenticity by morphological characteristics.*

Хондрогенез представляет собой сложный и жестко регулируемый процесс, молекулярные и клеточные механизмы которого еще не до конца изучены. Несмотря на отсутствие естественной репаративной способности, суставной хрящ содержит популяцию прогениторных клеток, сходных с популяциями стволовых клеток и являющуюся перспективным типом клеток-кандидатов для восстановления ткани с дегенеративными изменениями. Целью работы явилась разработка методологии получения прогениторных клеток хряща из коленного сустава лабораторных крыс.

Материалы и методы исследования. Исследование проведено на беспородных лабораторных крысах массой 220–280 г ($n = 5$) с соблюдением положений Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и в научных целях (Страсбург, 1991 г.). Животных выводили из эксперимента путем инъекции тиопентала натрия.

Изучение морфологии прогениторных клеток хряща проводили на инвертированном фазово-контрастном микроскопе Nikon TiS2-RFL System (Nikon, Япония). Жизнеспособность клеток определяли путем оценки процента неокрашенных клеток трипановым синим 0,4 % (Gibco, Германия) при подсчете в камере Горяева.

Результаты. Разработанный методологический подход включал следующие этапы: этап механической и ферментативной пробоподготовки хрящевой ткани, этап культивирования клеток с оценкой жизнеспособности клеточной культуры, этап подтверждения подлинности по морфологическим характеристикам. Пробоподготовку хрящевой ткани коленного сустава осуществляли путем предварительного измельчения до размера 1 мм^3 с последующей инкубацией в растворе коллагеназы II типа в концентрации 2 мг/мл (Stem cell, США) в течение 16–18 ч при температуре 37 °C. Полученную суспензию пропускали через клеточный фильтр с ячейками диаметром 40 мкм (Biologix, Китай), центрифугировали при $200\times g$ в течение 10 мин при комнатной температуре, супернатант удаляли и осадок ресуспендировали до концентрации 2×10^4 клеток/мл. Этап культивирования проводили в среде DMEM/F12 с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco, Германия), 1 % антибиотика-антимикотика (Gibco, Германия), 1 % L-глутамина (Gibco, США), в которой разводили клетки в концентрации 1×10^4 клеток/мл на чашку Петри диаметром 30 мм. Первую замену среды проводили через 24 ч и оценивали морфологию свежесекретированных клеток (рис. 1, а), и в последующем среду меняли один раз в 2 дня. Клетки культивировали 20 дней. Жизнеспособность клеточных культур варьировала от 87 % и до 98 %.

На 10 сутки отмечались первые морфологические изменения. Прогениторные клетки хряща содержали крупное ядро, занимающее более половины объема цитоплазмы, и эксцентрично расположенные ядрышком. На наружной ядерной мембране в области ядерных пор располагались многочисленные рибосомы. Плазмалемма формировала многочисленные короткие отростки. Рибосомальный аппарат являлся доминирующим органоидом и включал рибосомы и полисомы, свободно расположенные в цитоплазме, а также фиксированные на мембране гранулярного эндоплазматического ретикулума. Комплекс Гольджи развит слабо и располагался в околядерной зоне. Представлен двумя – тремя узкими цистернами, содержащими на периферии незначительное количество мелких везикул. Морфологически можно выделить три типа везикул: гладкоконтурные и два типа окаймленных. На рисунке 1, б представлен хондроцит дифференцированный из прогениторных клеток.

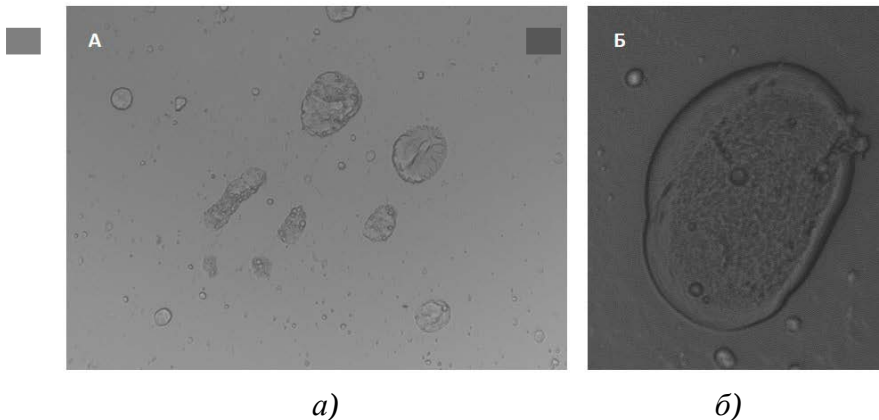


Рисунок 1 – Культура свежевыведенных прогениторных клеток хрящевой ткани 1-е сутки (а), хондроцит дифференцированный из прогениторных клеток (б)

Таким образом, представленный методологический подход позволяет получить прогениторные клетки хряща с соответствующей морфологией и высокой жизнеспособностью, которые могут быть использованы для последующих исследований в области клеточной и тканевой инженерии.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
Государственный комитет по науке и технологиям Республики Беларусь
Белорусский национальный технический университет
Научно-технологический парк БНТУ «Политехник»
Институт Конфуция по науке и технике БНТУ

НОВЫЕ ГОРИЗОНТЫ – 2024

Сборник материалов
XI Белорусско-китайского молодежного инновационного форума

21–22 ноября 2024 года

ТОМ 2

Минск
БНТУ
2024