

## Культивированные хондроциты человека и возможности их клинического применения

Д.А. ЗУБОВ, О.М. КОРЧАК, А.Г. ПОПАНДОПУЛО, И.О. СЛИПЧЕНКО, И.О. РАЗЕНКОВА  
Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака АМН Украины, г. Донецк

При тяжелых ожогах на лице достаточно часто страдают ушные раковины, в меньшей мере – нос. Ожоги II-III степени могут приводить к нарушению микроциркуляции в надхрящнице, прилегающей непосредственно к коже, что вызывает появление выпота между хрящом и надхрящницей, нагноение и некроз хряща. Поэтому термические ожоги могут сопровождаться возникновением острых хондритов, часто заканчивающихся образованием дефектов и деформаций ушных раковин и крыльев носа.

Таким образом, глубокие ожоги ушных раковин и носа требуют раннего агрессивного лечения для предотвращения осложнений в виде хондрита. В результате после заживания деформированные уши и нос требуют сложной реконструктивной операции. Именно при последней процедуре в настоящее время целесообразно применение биотехнологического подхода и методов клеточно-тканевой терапии с целью восстановления утраченного при ожогах эластического или гиалинового хряща.

На материально-технической базе Лаборатории клеточного и тканевого культивирования ИНВХ им. В.К. Гусака АМНУ впервые в Украине была получена пролиферирующая культура клеток эластического и гиалинового хряща человека.

Для успешного размножения хондроцитов *in vitro* существуют определенные критические требования. Монослойные культуры серийно пассированных хондроцитов не способны производить хрящевой матрикс, этот феномен был описан как *дедифференциация* хондроцитов *in vitro*. Причем при определенных условиях, этот процесс вполне обратим.

Первичная культура хондроцитов суставного хряща и хряща носовой перегородки человека была получена ферментативным методом. Использовался раствор коллагеназы IA, наиболее оптимальной концентрацией фермента оказалась 300 ед./мл с экспозицией 3,5 часа.

Суспензия изолированных эластических хондроцитов отличалась от таковой гиалиновых морфологической однородностью и одноклеточностью. В то же время гиалиновые хондроциты изолировались в виде хондронов – инкапсулированных в

территориальный матрикс скоплений из 2-3 клеток. Посевная концентрация клеток составила  $5 \times 10^3 - 1 \times 10^4/\text{см}^2$ .

*Эластические хондроциты.* На третьи сутки после посева наблюдалась умеренная пролиферация хондроцитов: каждая прикрепившаяся клетка дала начало кластеру специфической формы из 5-17 эпителиоидных клеток, равномерно расположенных по всему дну культурального флакона. Конфлюентная культура была получена на 13 сутки после посева. При этом клетки имели специфическую эпителиоидную морфологию. Хондроциты 3-го пассажа обладали фибробластоидной морфологией, которая сохранялась до 6-го пассажа.

Пассированные хондроциты, подвергшиеся *дедифференциации* в процессе культивирования, были посеяны с ростовой средой, содержащей частично деминерализованную костную пудру (10 мкг/мл), при этом сразу после адгезии фибробластоидные клетки снова приобрели округлую форму как при первичном выделении. Такую обратную индукцию эпителиоидной морфологии хондроцитов 4-го пассажа можно связать с наличием тканеспецифических компонентов внеклеточного матрикса, входящих в состав вышеуказанной пудры.

*Гиалиновые хондроциты.* Эти клетки обладают значительно пониженным пролиферативным потенциалом, чем эластические. Так, удовлетворительной пролиферации этого типа клеток удалось достичь лишь на 10-е сутки после изоляции и посева.

Пассированные хондроциты были заморожены в суспензии посредством программного замораживателя (Computer controlled Freezer IceCube 1810, SY-LAB) со скоростью 1 град/мин в криосреде (DMEM/F12, 10% ЭТС, 10% DMSO). Долгосрочное хранение клеток производилось в жидком азоте в условиях криобанка Лаборатории до дальнейшего использования.

Окраска культуры хондроцитов (первично выделенных, пассированных и криоконсервированных) *Hoechst 33342* на дефрагментацию ядра, тенденции к увеличению числа клеток в стадии необратимого апоптоза не выявила.

Таким образом, в связи с активным пролиферативным статусом хондроцитов в культуре можно заключить, что клетки хряща взрослого пациента могут быть размножены *in vitro* и использованы

Адрес для корреспонденции: Зубов Д.А., Лаборатория клеточного и тканевого культивирования, пр. Ильича, 36-8, Донецк 83003; тел.: +38 (062) 385-76-85, e-mail: zubov@lctc.dn.ua

для репарации хряща *in vivo* при их адекватной трансплантации в место тканевого дефекта. При этом возможна длительная криопрезервация полученных культур хондроцитов с минимальной потерей жизнеспособности после разморозки.

Иначе говоря, одним из концептуальных подходов в лечении ожогов хряща, а также приобретенных или врожденных дефектов, либо дегенеративных заболеваний хряща (остеоартроз) является применение методов тканевой инженерии и клеточной терапии, в данном случае это – аутологичная пересадка хондроцитов в виде тканевых эквивалентов. Последние можно сконструировать на основе культивированных клеток, включенных в состав подложек натурального происхождения. Такие эквиваленты могут быть имплантированы в место тканевого дефекта или прогрессирующей утраты хряща.