

УДК 525.235

БИОЛОГИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ФАКТОРОВ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЁТА НА КЛЕТКИ ОПОРНЫХ И СОЕДИНИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА

© 2015 Л.Т. Волова¹, Е.И. Пугачев¹, П.Е. Тимченко², Е.В. Тимченко²

¹ Самарский государственный медицинский университет

² Самарский государственный аэрокосмический университет имени академика С.П. Королева (национальный исследовательский университет)

Поступила в редакцию 20.03.2015

Для изучения влияния факторов космического полёта на процессы жизнедеятельности клеток опорных и соединительных тканей человека была предложена и разработана новая биологическая модель, которая представляет собой трехмерный пористый бионоситель, заселенный культурами клеток и помещенный в герметично закрытую емкость, целиком заполненную ростовой средой (патент №143101 от 30.12.2013). Идентификацию клеток в культуре и на бионосителе проводили с помощью комплекса морфологических, биохимических и иммуногистохимических методов исследования, а также растровой электронной (РЭМ) и конфокальной микроскопии. Эффективность данной модели была доказана в двух орбитальных космических полётах на беспилотных аппаратах «Бион-М № 1» и «Фотон № 4». Клетки в течение 30 и 44 дней полёта без смены культуральной среды сохраняли жизнеспособность и пролиферативную активность.

Ключевые слова: культура клеток, 3D-бионоситель, ЛДГ-тест, факторы космического полета

ВВЕДЕНИЕ

Исследования влияния факторов космического полета (микрогравитации, радиации, невесомости) на жизнедеятельность организмов (животных и человека) регулярно проводятся с начала освоения космического пространства и не утратили своей актуальности до настоящего времени.

На начальных этапах космических экспериментов влияние условий космического полета изучали в основном на организменном уровне. Так, изучена частота хромосомных aberrаций в лимфоцитах космонавтов, где показано, что она значительно выше, чем у здоровых людей той же возрастной группы, не побывавших в космосе. Предприняты попытки изучения метаболической и миграционной активности фагоцитов как участников регуляции иммунного ответа. Изучено влияние факторов космического полета на эритроциты человека: выявлены изменения показателей

ионного обмена, липидного и фосфолипидного профилей. Наблюдаемые морфофункциональные сдвиги были объяснены с позиций реакции системы крови на стресс реадaptации.

Что касается экспериментов на клетках животных и человека, то исследования такой направленности стали предпочтительнее в связи со стремительным развитием клеточных биотехнологий в XXI веке [2; 3; 4; 5; 6]. Использование клеточных культур в космической медицине и биологии является этичным и экономически выгодным по сравнению с экспериментами на лабораторных животных. Кроме того, такие исследования технически более просты в исполнении, так как объекты занимают небольшие объемы и не требуют сложных систем жизнеобеспечения.

Известно, что условия космического полета вызывают различные нарушения в опорно-двигательной системе.

Результаты изучения изменений, произошедших в клетках этой системы под влиянием факторов космического полета, а также жизнедеятельности клеток после возвращения их на Землю, могут быть использованы при проведении послеполетных реабилитационных мероприятий и разработке мер профилактики возникших нарушений опорно-двигательной системы у космонавтов.

Цель исследования: разработать новую биологическую модель для исследования влияния факторов космического полёта на культуры клеток опорных и соединительных тканей человека.

Волова Лариса Теодоровна, доктор медицинских наук, профессор, директор Института экспериментальной медицины и биотехнологии. E-mail: csrl.sam@mail.ru
Пугачёв Евгений Игоревич, научный сотрудник Института экспериментальной медицины и биотехнологии. E-mail: Evgenesius@mail.ru
Тимченко Павел Евгеньевич, кандидат физико-математических наук, научный сотрудник, ассистент кафедры радиотехнических устройств. E-mail: Timpravel@mail.ru
Тимченко Елена Владимировна, кандидат физико-математических наук, научный сотрудник, ассистент кафедры экологии и безопасности жизнедеятельности. E-mail: Vorobjeva.82@mail.ru

Для этого было необходимо решить следующие **задачи**:

Вырастить культуры клеток хондробластов и фибробластов.

Определить оптимальный бионоситель для полученных культур клеток.

Разработать технологию получения биологической модели на основе 3D-бионосителя и культур клеток.

С помощью комплекса морфологических, биохимических, иммуногистохимических методов исследования, РЭМ и конфокальной микроскопии определить структурно-функциональные и количественные характеристики клеток в культуре и на носителе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были культуры клеток опорных и соединительных тканей человека и деминерализованная лиофилизированная спонгиоза серии «Лиопласт»® (Патент на изобретение № 2366173 от 10.09.2009 г.) [7], которая использовалась в качестве биологического 3D-носителя для создания модели (рис. 1).

Такая спонгиоза представляет собой природный мелкопористый биопластический материал и состоит из органического компонента губчатой формации костной ткани человека. Этот материал не проявляет антигенных свойств и широко применяется в травматологии и ортопедии.



Рис. 1. Внешний вид деминерализованной спонгиозы серия «Лиопласт®»

Хондробласты из гиалинового хряща человека выращивали в лаборатории культуры клеток ИЭМБ СамГМУ по методике Brittberg (1995) [7] в собственной модификации.

Дермальные фибробласты получали из кожи крайней плоти мальчиков в возрасте до 10 лет при операции циркумцизии по методике Гринберга с соавт. (1988) [8].

На 4 пассаже осуществляли идентификацию полученных культур при помощи морфологических методов. Производили окрашивание монослоя гематоксилином, суданом IV и орсеином.

По завершении эксперимента оценивали морфофункциональное состояние клеток с помощью морфологических, биохимических и иммуногистохимических методов исследования, а также методов статистической обработки данных. Для определения наличия клеток на бионосителе использовали РЭМ и конфокальную микроскопию. Жизнеспособность клеток определяли с помощью ЛДГ-теста.

Сущность ЛДГ-теста заключается в том, что лактатдегидрогеназа появляется в культуральной жидкости только при нарушении целостности клеточных мембран, и соотношение ее активности в культуральной среде и в клетках на носителе отражает соотношение живых и поврежденных клеток в культуре [9; 10; 11; 12].

В настоящем исследовании определение проводили в культуральной среде и лизате клеток, находившихся на бионосителе. Культуральную среду отбирали в эппендорфы и центрифугировали. Бионоситель дважды ополаскивали фосфатно-солевым буфером (ФСБ), помещали в эппендорфы, добавляли 0,001M фосфатный буфер с pH 7,4. Сохранившиеся на носителе живые клетки разрушали путем двукратного замораживания-оттаивания. Отбирали по 1 мл культуральной среды и лизата клеток, добавляли к каждой аликвоте 1 мМ пирувата и 0,2 мМ NADH (никотинамидадениндинкулеотид восстановленный), затем спектрофотометрировали (СФ-56, «ЛОМО», Санкт-Петербург) при длине волны 340 нм. Активность ЛДГ определяли по убыли NADH в ходе реакции превращения пирувата в лактат.

Количество жизнеспособных клеток определяли как отношение активности ЛДГ в лизате клеток к суммарной активности ЛДГ в лизате и в ростовой среде и выражали в процентах.

РЭМ выполнялась на аппаратуре JEOLJSM-6390A (Япония). Конфокальная микроскопия проводилась с помощью экспериментального стенда на базе инвертированного микроскопа Olympus IX71 и лазерного комбайна фирмы ANDOR. Стенд обеспечивал два режима микросъемки: конфокальной микроскопии в видимом свете и режим лазерной флуоресценции. Для визуализации живых клеток на носителе был использован флуорофор GFP (фирмы «Invitrogen», США). Для визуализации поврежденных клеток использовали флуорофор пропидиум йодид («Sigma», США), который не проникает через неповрежденную мембрану живых клеток, поэтому он окрашивает ядра только мертвых клеток и клеток, находящихся в поздних стадиях апоптоза. В отличие от красителей, традиционно используемых в гистологии, данный флуорофор не токсичен и позволяет детально исследовать динамику процессов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первый компонент биологической модели – *деминерализованная лиофилизированная спонгиоза человека* серии «Лиопласт»®.

Важнейшим этапом в технологическом процессе производства этого материала является обезжиривание и удаление из межбалочных пространств крови, жира, всех элементов костного мозга. Это достигается с помощью низкочастотного ультразвука установки с последующей лиофилизацией на сублимационной установке ALPHA2-4LSC. Процесс лиофилизации (вакуумная сушка тканей) представляет собой метод низкотемпературного обезвоживания биоимплантатов, которое происходит в вакууме в результате возгонки (сублимации) воды из состояния льда в пар, минуя жидкую фазу. При лиофилизации вода из биоимплантатов удаляется и составляет не более 5% в ткани без нарушения нативной структуры белков. В кости резко замедляются или прекращаются биохимические реакции, в результате чего ткани становятся более устойчивыми к факторам внешнего воздействия и сохраняют первоначальные свойства в течение длительного периода хранения.

Вторым компонентом биологической модели являются культуры клеток опорных и соединительных тканей человека (хондробласты и фибробласты).

Для получения *хондробластов* использовали фрагменты интактного гиалинового хряща массой 500-1000 мг, взятые у соматически здорового органного донора, обследованного на ВИЧ, RW, гепатит В, С.

Образцы фрагментов хряща поступали в лабораторию культивирования клеток Института экспериментальной медицины и биотехнологии (ИЭМБ) СамГМУ в среде 199 и хранились при температуре +4°C в течение суток. Через сутки, убедившись в стерильности образцов, начинали их обработку.

Хрящ размельчали и подвергали трехкратному промыванию раствором Хенкса (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург, РФ). Измельченный хрящ переносили в сосуд с кластридиальной коллагеназой (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург, РФ) на 18 часов. После этого фермент инактивировали 10% питательной средой (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург, РФ). Фрагменты переносили в культуральные флаконы и заливали полной ростовой средой для дальнейшего инкубирования.

На микропрепаратах, окрашенных орсеином хондробласты имели вытянутую или полигональную форму, ровные четкие границы, овоидное центрально расположенное ядро и 3-6 отростков (рис. 2). При окраске суданом IV и гематоксилином в цитоплазме клеток определялись жировые включения, характерные для зрелых хондроци-

тов. При достижении не менее 50% конfluenceности, клетки формировали на культуральном пластике монослой в виде концентрических фигур Иммунофенотип клеток, полученных из хрящевой ткани: CD105+, CD90+, CD45+, коллаген II типа +, CD34-, CD44-. Это служит подтверждением того, что эти клетки относятся к клеткам хрящевого дифферона.

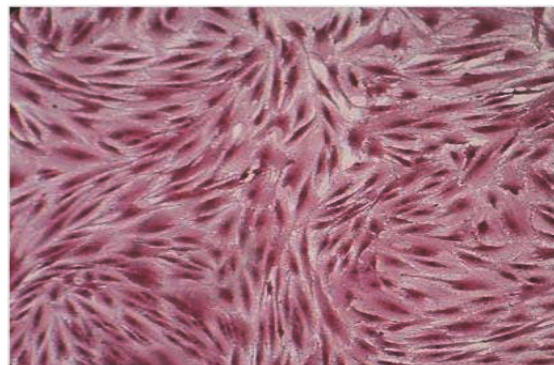


Рис. 2. Культура хондробластов из гиалинового хряща человека. 3 пассаж. Окраска Орсеином. Ув. 200

Дермальные фибробласты получали из кожи крайней плоти мальчиков в возрасте до 10 лет при операции циркумцизии. Образцы кожи поступали в лабораторию культивирования клеток ИЭМБ СамГМУ в среде MEM и хранились при температуре +4°C в течение суток. Через сутки, убедившись в стерильности образцов, начинали их обработку. Кожу очищали от крови, трехкратно промывали в растворе Хенкса и обрабатывали 0,25% трипсином. Действие трипсина останавливали ростовой средой MEM, содержащей 5% эмбриональной телячьей сыворотки, после чего фрагменты помещали в пластиковые культуральные флаконы (Orange Scientific, Бельгия) площадью 25 см² и инкубировали в полной ростовой среде до достижения монослоя.

Клетки культивировали в стандартных условиях в среде 199 (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург, РФ) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки в CO²-инкубаторе MCO-18AIC («Sanyo», Япония) при температуре 37°C, постоянной влажности и 5% CO².

На микропрепаратах, окрашенных орсеином, фибробласты имели вытянутую или (при высокой плотности монослоя) веретенообразную форму, 2-4 отростка, гомогенную цитоплазму. Отростки клеток имели гладкие ровные контуры, значительную длину и контактировали с отростками соседних клеток. Границы клеток четкие, ядра – овальной формы, расположенные, как правило, несколько эксцентрично, содержали 1-2 ядрышка. При окраске суданом IV нейтральный жир не обнаруживался. На пластике клетки формировали монослой в виде «завитков». Иммунофенотип фибробластов: CD44+, CD90+, коллаген I типа +, CD45-, CD34-, CD105-.

Биологическую модель (патент №143101 от 30.12.2013) [13] создавали следующим образом: носитель (аллогенную деминерализованную лиофилизированную спонгиозу) объемом 95 мм³ засеивали 95 тыс. клеток и культивировали в течение 1 суток. Через сутки на носителе определялось 70% прикрепившихся клеток от посевной дозы. Тканеинженерную конструкцию помещали в культуральную ёмкость объемом 4 мл, которую заполняли до краев ростовой средой, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «Биолот», Россия).

Исследование модельного объекта с помощью РЭМ и конфокальной микроскопии продемонстрировало сохранение архитектоники носителя. В опытных образцах обнаруживались прикрепленные отросчатые клетки, которые равномерно располагались на поверхности бионосителя и в межтрабекулярных пространствах [3].

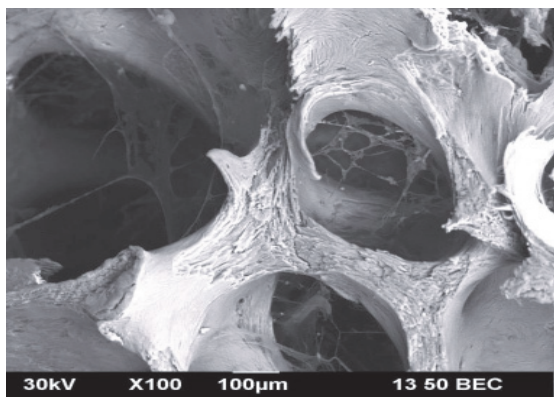


Рис. 3. Деминерализованная спонгиоза с хондробластами. РЭМ. Ув. 100

С помощью конфокальной микроскопии на костных балках как на поверхности, так и в глубине носителя были обнаружены жизнеспособные клетки и в несколько меньшем количестве поврежденные апоптотические клетки. Свидетельством повреждения клеток при применении флуорофора пропидиум иодида служит яркое свечение ядер. Жизнеспособные клетки овальной или удлинённой формы определялись только по очень слабому свечению клеточной мембраны. Данные результаты подтверждаются биохимическими исследованиями (по активности ЛДГ). Через сутки определялись 70% жизнеспособных клеток на носителе.

Эффективность данной модели была доказана в двух орбитальных космических полётах на беспилотных аппаратах «Бион-М №1» и «Фотон №4». Клетки в течение 30 и 44 дней полёта без смены культуральной среды сохраняли жизнеспособность и пролиферативную активность.

ВЫВОДЫ

Разработанная и запатентованная биологическая модель, представляющая собой трехмерный пористый бионоситель (лиофилизированную

деминерализованную спонгиозу «Лиопласт»®) с заселенными на него клетками в полной ростовой среде, показала себя адекватной для изучения влияния условий космического полета на морфофункциональные характеристики клеток *in vitro* в длительных орбитальных полетах без смены культуральной среды. Эта модель позволяет получить большой объём разнообразных данных о жизнедеятельности клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Буравкова Л.Б., Анохина Е.Б. Мезенхимальные стромальные клетки-предшественники: общая характеристика и особенности функционального состояния при пониженном содержании кислорода // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2008. Т. 94. № 7. С. 737–757.
2. Буравкова Л.Б., Григорьева О.В., Рыкова М.П., Григорьев А.И. Цитотоксическая активность лимфоцитов – естественных киллеров *in vitro* в условиях микрогравитации // Доклады Академии Наук. 2008. Т. 421. С. 128–130.
3. Буравкова Л.Б. Проблемы гравитационной биологии клетки // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2008 Т. 42. № 6. С.10–18.
4. Константинова Н.А. Влияние клиностатирования на начальные стадии дифференцировки эмбриональных стволовых клеток мыши *in vitro* / автореферат диссертации. Москва, 2008.
5. Мерзлякина Н.В. Морфофункциональные особенности культивируемых эндотелиальных клеток и мезенхимальных стволовых клеток человека в условиях измененной силы тяжести / автореферат диссертации. Москва, 2005.
6. Пат. 2366173 Российская Федерация, МПК А01N/00. Способ изготовления крупноблочных лиофилизированных костных имплантатов / Волова Л.Т. № 2008119004/14; заявл.15.05.2008; опубл.10.09.2009. Бюл. № 25. 6 с.
7. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Sjogren-Jansson E, Peterson L. Autologous cartilage cell transplantation. The goal is pain relief and restored joint function. Nord Med. 1995; 110(12): 330–4. Swedish.
8. Гринберг К.Н., Кухаренко В.И., Ляшко В.Н., Терехов С.М., Пичугина Е.М., Фрейдин М.И., Чериков В.Г. Культивирование фибробластов человека для диагностики наследственных болезней // Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. С. 250–257.
9. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced by cadmium in cortical neurons in culture / E. Lopez [et al.] // British Journal of Pharmacology. 2003. Vol. 138. P. 901–911.
10. A bioluminescent cytotoxicity assay for assessment of membrane integrity using a proteolytic biomarker. / Ming-Hsuang Cho, Andrew Niles, Ruili Huang, James Inglese, Christopher P. Austin, Terry Riss, Menghang Xia // Toxicol In Vitro. - 2008 June. - Vol. 22(4). P. 1099–1106.
11. Effects of conventional and new peritoneal dialysis solutions on human peritoneal mesothelial cell viability and proliferation. / Hunjoo Ha, Mi Ra Ju, Hoo Nam Choi, Mi Kyung Cha, Hyun Seung Kang, Mi Ho Kim, and Hi Bahl Lee // Biocompatibility of New Peritoneal

- Dialysis Solutions. August 26, 2000, Seoul, Korea. Peritoneal Dialysis International. Vol. 20. Suppl. 5.
12. In vitro suppression of fibroblast growth inhibitory lymphokine production by asbestos. / *Irma Lemaire, Claire Dubois* // Clin. exp. Immunol. 1983. Vol. 53. P. 239–248.
13. Пат. 143101 Российская Федерация, МПК C12M1/00. Устройство для культивирования клеток во время беспилотного космического полета / *Волова Л.Т., Россинская В.В., Болтовская В.В., Кулагина Л.Н., Долгушкин Д.А.* Патентообладатель Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. № 2013159098/10; заявл. 30.12.2013; опубл. 10.07.2014. Бюл. № 19. 2 с.

A BIOLOGICAL MODEL FOR THE PURPOSES OF STUDYING THE EFFECTS OF SPACE FLIGHT FACTORS ON THE HUMAN SUPPORTIVE AND CONNECTIVE TISSUE CELLS

© 2015 L.T. Volova¹, E.I. Pugachev¹, P.E. Timchenko², E.V. Timchenko²

¹ Samara State Medical University

² Samara State Aerospace University named after Academician S.P. Korolyov
(National Research University)

A new biological model was invented and created in order to study the effects of space flight factors on the vital functions of human connective and supportive tissue cells. The model is in essence a spongy 3D bio-carrier, populated by tissue cultures and placed into a hermetically sealed container completely filled with growth tissue (patent #143101 registered December 30th 2013). Cell identification within the culture and on the bio-carrier was done using the complex of morphological, biochemical and immunohistochemical study methods, as well as the method of raster electron microscopy (REM) and confocal microscopy. The efficiency of this model proved itself during two orbital space flights on board of two unpiloted spacecrafts, Bion-M 1 and Foton 4. Cells retained their viability and proliferative activity during 30 and 44 days of space flight without culture medium change.

Keywords: cell culture, cell-tissue graft, LDH-test, factors of spaceflight.

Larisa Volova, MD, Professor, Director of the Institute of Experimental Medicine and Biotechnology.

E-mail: csrl.sam@mail.ru.

Evgeniy Pugachev, Research Fellow at the Institute of Experimental Medicine and Biotechnology.

E-mail: Evgenesius@mail.ru.

Pavel Timchenko, Candidate of Physics and Mathematics, Research Fellow, Assistant Lecturer at the Radio Devices Department. E-mail: Timpavel@mail.ru

Elena Timchenko, Candidate of Physics and Mathematics, Research Fellow, Assistant Lecturer at the Ecology and Life Department. E-mail: Vorobjeva.82@mail.ru