



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 5/00 (2024.08); C12N 5/0655 (2024.08)

(21)(22) Заявка: 2024103793, 15.02.2024

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.02.2024

Дата регистрации:
02.09.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 15.02.2024

(43) Дата публикации заявки: 22.04.2024 Бюл. № 12

(45) Опубликовано: 02.09.2024 Бюл. № 25

Адрес для переписки:

125284, Москва, 2-й Боткинский пр-д, 3,
Московский научно-исследовательский
онкологический институт имени П.А. Герцена,
патентоведу, Урванцев Евгений Евгеньевич

(72) Автор(ы):

Исаева Елена Васильевна (RU),
Барановский Денис Станиславович (RU),
Кисель Анастас Андреевич (RU),
Клабуков Илья Дмитриевич (RU),
Яценко Елена Михайловна (RU),
Шегай Петр Викторович (RU),
Иванов Сергей Анатольевич (RU),
Каприн Андрей Дмитриевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Национальный медицинский
исследовательский центр радиологии"
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (ФГБУ "НМИЦ радиологии"
Минздрава России) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2409662 C2, 20.01.2011. RU
2677688 C1, 21.01.2019. ISAEVA E.V. et al. The
Use of Collagen with High Concentration in
Cartilage Tissue Engineering by Means of 3D-
Bioprinting, Cell and Tissue Biology, 2021, vol.
15, pp. 493-502. ЛЫЗО Т.С. и др.
Морфофункциональная характеристика
пролиферации хондроцитов при
экспериментальном остеоартрозе у крыс,
(см. прод.)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НАЗАЛЬНЫХ ХОНДРОЦИТОВ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫСЯТ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области
биотехнологии, в частности к способу получения
назальных хондроцитов новорожденных крысят.
Указанный способ включает получение
фрагментов хряща с последующим
изолированием из них хондроцитов
ферментативным путем, причем фрагменты
носового хряща получают у 4-8-дневных крысят

на полуавтоматическом микротоме с
вибрирующим лезвием. Изобретение обеспечивает
получение большего количества жизнеспособных
клеток, в том числе в пересчете на одно животное,
причем указанные клетки обладают лучшей
адгезионной способностью, более короткой лаг-
фазой и более высокой скоростью пролиферации.
10 ил., 1 пр.

(56) (продолжение):

Природные системы и ресурсы, 2021, 11 (2), с. 5-11. VEDICHERLA S. et al. Rapid Chondrocyte Isolation for Tissue Engineering Applications: The Effect of Enzyme Concentration and Temporal Exposure on the Matrix Forming Capacity of Nasal Derived Chondrocytes, BioMed research international, 2017, 2395138. <https://doi.org/10.1155/2017/2395138>.

R U 2 8 2 5 8 9 7 C 2

R U 2 8 2 5 8 9 7 C 2

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 5/00 (2024.08); *C12N 5/0655* (2024.08)(21)(22) Application: **2024103793, 15.02.2024**(24) Effective date for property rights:
15.02.2024Registration date:
02.09.2024

Priority:

(22) Date of filing: **15.02.2024**(43) Application published: **22.04.2024** Bull. № 12(45) Date of publication: **02.09.2024** Bull. № 25

Mail address:

**125284, Moskva, 2-j Botkinskij pr-d, 3, Moskovskij
nauchno-issledovatelskij onkologicheskij institut
imeni P.A. Gertsena, patentovedu, Urvantsev
Evgenij Evgenevich**

(72) Inventor(s):

**Isaeva Elena Vasilevna (RU),
Baranovskii Denis Stanislavovich (RU),
Kisel Anastas Andreevich (RU),
Klabukov Ilia Dmitrievich (RU),
Iatsenko Elena Mikhailovna (RU),
Shegai Petr Viktorovich (RU),
Ivanov Sergei Anatolevich (RU),
Kaprin Andrei Dmitrievich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe biudzhethnoe
uchrezhdenie «Natsionalnyi meditsinskii
issledovatelskii tsentr radiologii» Ministerstva
zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii (FGBU
«NMITs radiologii» Minzdrava Rossii) (RU)**(54) **METHOD FOR PRODUCING NASAL CHONDROCYTES OF NEWBORN RAT PUPS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology, particularly to a method for producing nasal chondrocytes of newborn rat pups. Said method involves obtaining cartilage fragments with subsequent enzymatic isolation of chondrocytes, wherein nasal cartilage fragments are obtained in 4-8-day-old rat pups

on a semi-automatic microtome with a vibrating blade.

EFFECT: invention enables to obtain a large number of viable cells, including in terms of one animal, wherein said cells have better adhesion capacity, shorter lag phase and higher proliferation rate.

1 cl, 10 dwg, 1 ex

Изобретение относится к регенеративной медицине, в частности к тканевой инженерии, может быть использовано при изготовлении тканеинженерных конструкций, в том числе с применением 3D-биопечати.

Структура и функции хрящевой ткани, например, в суставах, могут быть легко нарушены вследствие травмы, старения или заболевания, что приводит к значительному снижению качества жизни. Из-за своей аваскулярной природы хрящ плохо подвергается регенерации. Достижения регенеративной медицины и тканевой инженерии позволяют решить задачу восстановления хрящевой ткани с помощью имплантации аутологичных хондроцитов и/или тканеинженерных конструкций, содержащих эти же клетки.

Для реализации этих подходов в клинических условиях необходимо получать большие количества жизнеспособных хондроцитов. В то же время хрящ не является самой клеточной тканью, только 2-10% его объема составляют хондроциты [A.O. Oseni, P.E. Butler, A.M. Seifalian Optimization of chondrocyte isolation and characterization for large-scale cartilage tissue engineering. J Surg Res.2013; 181(1):41-8. doi: 10.1016/j.jss.2012.05.087.; S.A. Muhammad, N. Nordin, P. Hussin et al. Optimization of Protocol for Isolation of Chondrocytes from Human Articular Cartilage. Cartilage.2021; 13(2_suppl):872S-884S. doi: 10.1177/1947603519876333.; R. A. Somoza, J. F. Welter Isolation of Chondrocytes from Human Cartilage and Cultures in Monolayer and 3D. Methods Mol Biol. 2021:2245:1-12. doi: 10.1007/978-1-0716-1119-7_1]. Они представляют собой высокоспециализированные клетки, локализованные внутри плотного внеклеточного матрикса (ВКМ) хряща в полостях, известных как лакуны [E.B. Hunziker, T.M. Quinn, H-J Häuselmann Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. Osteoarthritis Cartilage. 2002;10(7):564-72. doi: 10.1053/j.joca.2002.0814]. Во время разрушения плотного ВКМ при извлечении хондроцитов они часто подвергаются воздействию агрессивных ферментов в течение продолжительных периодов времени. Это снижает не только конечное количество клеток, но также их жизнеспособность, пролиферативную активность [A.O. Oseni, P. E. Butler, A. M. Seifalian Optimization of chondrocyte isolation and characterization for large-scale cartilage tissue engineering. J Surg Res. 2013; 181(1):41-8. doi: 10.1016/j.jss.2012.05.087] и способность формировать матрикс после изоляции [S.A. Muhammad, N. Nordin, P. Hussin et al. Optimization of Protocol for Isolation of Chondrocytes from Human Articular Cartilage. Cartilage.2021; 13(2_suppl):872S-884S. doi: 10.1177/1947603519876333]. Увеличение количества клеток путем пассирования не решает проблему, так как хондроциты склонны к дедифференцировке в фибробласты при повторных пассажах [Marlovits S., Hombauer M., Truppe M., et al. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. J Bone Joint Surg Br. 2004; 86(2):286-95. doi: 10.1302/0301-620x.86b2.14918.; Schlegel W., Nürnberger S., Hombauer M., et al. Scaffold-dependent differentiation of human articular chondrocytes, Int. J. Mol. Med 2008; 22:691-699. doi: 10.3892/ijmm_00000074]. Несмотря на то, что за последние 50 с лишним лет [R. A. Somoza, J. F. Welter Isolation of Chondrocytes from Human Cartilage and Cultures in Monolayer and 3D. Methods Mol Biol. 2021: 2245:1-12. doi: 10.1007/978-1-0716-1119-7_1] протоколы изоляции, размножения и поддержания этих клеток были значительно улучшены, разработка протокола, оптимально подходящего для выделения хондроцитов из ткани, все еще является актуальной задачей. А интенсивное развитие тканевой инженерии и регенеративной медицины требует совершенствования методов выделения клеток мелких лабораторных животных для проведения экспериментальных исследований.

Источником гиалинового хряща в организме человека и животных может быть реберный хрящ или хрящ носовой перегородки. Хондроциты, полученные из хряща носовой перегородки, обладают большим потенциалом в качестве клинически ценного

источника клеток для регенерации хрящевой ткани [М.Н. Lim, J.Н. Jeun, D.Н. Kim, et al. Evaluation of Collagen Gel-Associated Human Nasal Septum-Derived Chondrocytes As a Clinically Applicable Injectable Therapeutic Agent for Cartilage Repair. *Tissue Eng Regen Med.* 2020; 17 (3):387-399. doi: 10.1007/s13770-020-00261-9].

- 5 Кроме получения назальных хондроцитов из хрящевой ткани человека [B.E. Pippenger, M. Ventura, K. Pelttari, et al. Bone-forming capacity of adult human nasal chondrocytes. *J Cell Mol Med.* 2015; 19(6):1390-1399. doi: 10.1111/jcmm.12526; G.G. Lehoczkzy, R.E.Trofin, Q. Vallmajo-Martin, et al. In Vitro and Ectopic In Vivo Studies toward the Utilization of Rapidly Isolated Human Nasal Chondrocytes for Single-Stage Arthroscopic Cartilage Regeneration Therapy. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(13):6900. doi: 10.3390/ijms23136900.; J.Н. Jeon, B.G. Yun, M.J. Lim, et al. Rapid Cartilage Regeneration of Spheroids Composed of Human Nasal Septum-Derived Chondrocyte in Rat Osteochondral Defect Model. *Tissue Eng Regen Med.* 2020; 17(1):81-90. doi: 10.1007/s13770-019-00231-w.; M. Mumme, A. Barbero, S. Miot, et al. Nasal chondrocyte-based engineered autologous cartilage tissue for repair of articular cartilage defects: an observational first-in-human trial. *Observational Study Lancet.* 2016; 388(10055):1985-1994. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31658-0.; M. H. Lim, J.Н. Jeun, D.Н. Kim, et al. Evaluation of Collagen Gel-Associated Human Nasal Septum-Derived Chondrocytes As a Clinically Applicable Injectable Therapeutic Agent for Cartilage Repair. *Tissue Eng Regen Med.* 2020; 17(3):387-399. doi: 10.1007/s13770-020-00261-9] описано использование для этих целей таких животных, как крысы
- 10 [K. Bardsley, A. Kwarciak, C. Freeman, et al. Repair of bone defects in vivo using tissue engineered hypertrophic cartilage grafts produced from nasal chondrocytes. *Biomaterials.* 2017; 112:313-323. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.10.014.; C. Bermueller, S. Schwarz, A.F. Elsaesser, et al. Marine collagen scaffolds for nasal cartilage repair: prevention of nasal septal perforations in a new orthotopic rat model using tissue engineering techniques *Tissue Eng Part A.* 2013; 19(19-20):2201-14. doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0650], кролики [W. Chen, C. Li, M. Peng, et al. Autologous nasal chondrocytes delivered by injectable hydrogel for in vivo articular cartilage regeneration. *Cell Tissue Bank.* 2018; 19(1):35-46. doi: 10.1007/s10561-017-9649-y.; Y. Yan, R. Fu, C. Liu, et al. Sequential Enzymatic Digestion of Different Cartilage Tissues: A Rapid and High-Efficiency Protocol for Chondrocyte Isolation, and Its Application in Cartilage Tissue Engineering. *Cartilage.* 2021; 13(2_suppl):1064S-1076S. doi: 10.1177/19476035211057242], овцы [A.O. Oseni, P. E. Butler, A. M. Seifalian Optimization of chondrocyte isolation and characterization for large-scale cartilage tissue engineering. *J Surg Res.* 2013; 181(1):41-8. doi: 10.1016/j.jss.2012.05.087] и крупный рогатый скот [W. Kafienah, M. Jakob, O. Démarateau, et al. Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes. *Comparative Study Tissue Eng.* 2002; 8(5):817-26. doi: 10.1089/10763270260424178.; M.B Pabbruwe, E. Esfandiari, W. Kafienah, et al. Induction of cartilage integration by a chondrocyte/collagen-scaffold implant. *Biomaterials.* 2009; 30(26):4277-86. doi: 10.1016/j.biomaterials. 2009.02.052]. От способа получения фрагментов хрящевой ткани зависит продолжительность ферментативного воздействия на них, что оказывает непосредственное влияние на
- 40 жизнеспособность изолированных клеток. У человека материал получают или при биопсии с помощью перфоратора, или во время пластических операций на носовой перегородке. Обычно авторы не описывают подробно эти процедуры. Только в одной работе приводится способ извлечения фрагментов хряща диаметром 6 мм из носовой перегородки под местной анестезией через разрез Киллиана (около 10 мм краниальнее каудальной границы перегородки и примерно 5 мм дорсально от переходной зоны к
- 45 верхней челюсти) с использованием инструмента для пункционной биопсии. После того, как образец хряща был отделен от надхрящницы, разрезан на небольшие кусочки и обработан ферментативно, изолированные назальные хондроциты культивировали

в течение 2 недель до применения [M. Mumme, A. Barbero, S. Miot, et al. Nasal chondrocyte-based engineered autologous cartilage tissue for repair of articular cartilage defects: an observational first-in-human trial. *Observational Study Lancet*. 2016; 388(10055):1985-1994. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31658-0].

5 Способы получения фрагментов носовой перегородки у животных различаются в зависимости от вида животного.

Известен способ прижизненного получения фрагментов носовой перегородки диаметром 2 мм при биопсии у новозеландского кролика под общей анестезией [W. Chen, C. Li, M. Peng, et al. Autologous nasal chondrocytes delivered by injectable hydrogel for in vivo articular cartilage regeneration. *Cell Tissue Bank*. 2018; 19(1):35-46. doi: 10.1007/s10561-017-9649-y]. У таких животных, как овцы и крупный рогатый скот, образцы хряща отбирали в течение нескольких часов после убоя [A.O. Oseni, P. E. Butler, A. M. Seifalian Optimization of chondrocyte isolation and characterization for large-scale cartilage tissue engineering. *J Surg Res*. 2013; 181(1):41-8. doi: 10.1016/j.jss.2012.05.087.; W. Kafienah, M. Jakob, et al. Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes. *Comparative Study Tissue Eng*. 2002; 8(5):817-26. doi: 10.1089/10763270260424178.; M.B Pabbruwe, E. Esfandiari, W. Kafienah, et al. Induction of cartilage integration by a chondrocyte/collagen-scaffold implant. *Biomaterials*. 2009; 30(26):4277-86. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.02.052]. В работе М.В. Pabbruwe et al. (2009) для этого
10 использовали перфоратор для биопсии кожи, извлекая фрагменты цилиндрической формы диаметром 8 мм и толщиной 4,0 мм.

В двух работах для получения хрящевой ткани носовой перегородки использовали взрослых крыс [C.C. Bermueller, S. Schwarz, A.F. Elsaesser, et al. Marine collagen scaffolds for nasal cartilage repair: prevention of nasal septal perforations in a new orthotopic rat model using tissue engineering techniques *Tissue Eng Part A*. 2013; 19(19-20):2201-14. doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0650.; K. Bardsley, A. Kwarciak, C. Freeman, et al. Repair of bone defects in vivo using tissue engineered hypertrophic cartilage grafts produced from nasal chondrocytes. *Biomaterials*. 2017; 112:313-323. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.10.014]. Способы извлечения хряща не описаны.

30 Во всех представленных случаях фрагменты хряща после измельчения подвергают ферментативной обработке в течение определенного времени, которое отличается у разных авторов. Используют различные комбинации ферментов, но чаще всего коллагеназу II типа, концентрация которой составляет от 0,15% до 0,3% в разных исследовательских группах. После определения жизнеспособности изолированные
35 клетки высевают в хондрогенную или обычную среду и культивируют или замораживают после одного пассажа в зависимости от задач исследования.

Во всех приведенных работах фрагменты хряща для получения хондроцитов отбирали у взрослых животных, что является существенным недостатком. Известно, что количество и жизнеспособность хондроцитов, изолированных из хрящевой ткани, кроме
40 других факторов, коррелирует с возрастом донора [A. Barbero, S. Grogan, D. Schäfer, et al. Age related changes in human articular chondrocyte yield, proliferation and post-expansion chondrogenic capacity. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2004; 12: 476-484. doi:10.1016/j.joca.2004.02.010]. Поэтому предпочтительней отбирать хрящи у молодых животных или даже эмбрионов.

45 За прототип взят способ получения фрагментов хряща носовой перегородки с последующей изоляцией хондроцитов у 21-дневных эмбрионов крысы [J.M. Sautier, J.R. Nefussi, N. Forest. In vitro differentiation and mineralization of cartilaginous nodules from enzymatically released rat nasal cartilage cells. *Biol Cell*. 1993; 78(3):181-9. doi: 10.1016/0248-

4900(93)90128-2]. Этот же способ был использован и в более поздних работах [R. Nadra, P. Menuelle, S. Chevallier, A. Berdal. Regulation by glucocorticoids of cell differentiation and insulin-like growth factor binding protein production in cultured fetal rat nasal chondrocytes. J Cell Biochem. 2003; 88(5):911-22. doi: 10.1002/jcb.10396] и [A. Asselin, S. Hattar, M. Oboeuf, D. et al. The modulation of tissue-specific gene expression in rat nasal chondrocyte cultures by bioactive glasses. Biomaterials. 2004; 25(25):5621-30. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.01.016]. Авторы отбирали ткани 21-дневных эмбрионов крысы Sprague-Dawley. Извлекали матку с плодами и сразу же помещали в холодный фосфатно-буферный раствор (PBS). В среднем было получено 13 плодов от одной беременной крысы. Отдельные эмбрионы были обезглавлены и у них снимали кожу до переднего края носовой кости. Под препаровальным микроскопом рассекали лобно-носовые швы, центральную часть межностовых швов и хрящи носовой перегородки, очищали от надкостницы и соединительной ткани. Фрагменты ткани перед диссоциацией объединяли и инкубировали на магнитной мешалке в течение 2 ч при 37°C в ферментной смеси коллагеназы (0,25%) и гиалуронидазы (0,1%). По истечении периода инкубации клетки механически диссоциировали путем отсасывания фрагментов ткани через стеклянную пипетку объемом 10 мл. Полученную клеточную суспензию фильтровали через 13-мм металлический фильтр Swinney для удаления остатков тканей. Суспензию центрифугировали при 1600 об/мин в течение 5 мин, трижды промывали в PBS, подсчитывали и ресуспендировали в среде DMEM с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (Biosis), 10 мМ/3-глицерофосфата (Sigma), 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты и антибиотиков (50 ЕД /мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина). Затем клетки высевали в количестве 2×10^5 клеток/см² в чашки для культивирования диаметром 50 мм (Falcon) или на покровные стекла для иммуногистохимических исследований. Клетки инкубировали во влажном инкубаторе в атмосфере из 5% CO₂ и воздуха, а среду для культивирования меняли каждые 48 ч в течение 12 суток, чтобы проследить морфологические изменения в культурах.

Однако иссечение фрагментов хряща под микроскопом трудоемко и требует высокой квалификации сотрудников, а механическая диссоциация клеток может повреждать их в не меньшей степени, чем ферментативная обработка.

Техническим решением является разработка способа получения изолированных назальных хондроцитов новорожденных крысят, обладающих высокой адгезионной способностью и пролиферативной активностью.

Технический результат решается тем, что так же, как и в известном способе, получают фрагменты хряща, а затем изолируют из них хондроциты ферментативным путем.

Особенностью заявляемого способа является то, что фрагменты носового хряща получают у 4-8-дневных крысят на полуавтоматическом микротоме с вибрирующим лезвием, промывают их в стерильном фосфатно-солевом буферном растворе, измельчают и подвергают однократной обработке 0,15% раствором коллагеназы I типа в течение 20 часов при 37°C, после чего клетки отмывают от фермента центрифугированием в питательной среде с добавлением сыворотки крови животных, определяют их жизнеспособность на проточном цитометре, культивируют во флаконах до образования монослоя, снимают с пластика, типировать и замораживают.

Изобретение поясняется подробным описанием, примерами использования и иллюстрациями, на которых изображено:

Фиг. 1 - Микротом с вибрирующим лезвием Leica VT1200 (Германия), общий вид: слева направо: панель управления; блок питания; базовый прибор.

Фиг. 2 - фотоиллюстрация: голова 8-дневного крысенка, зафиксированная на диске

для образцов с помощью цианакрилатного клея в буферном поддоне до начала резки.

Фиг. 3 - фотоиллюстрация: срез головы животного, выполненный с помощью вибрирующего микротом.

Фиг. 4 - фотоиллюстрация извлечения носовой перегородки и носовых раковин хирургическими инструментами.

Фиг. 5 - Сравнительная схема проведения анализа проточной цитометрии: а, б, в) анализ проточной цитометрии - хондроциты получены по предложенному способу; г, д, е) анализ проточной цитометрии - клетки получены по стандартной методике. N=4.

Фиг. 6 - Диаграмма распределения количества клеток в поле зрения: а) стандартный способ получения хондроцитов и б) предлагаемый нами способ получения хондроцитов, (N=24).

Фиг. 7 - фотоиллюстрация назальных хондроцитов, изолированных с помощью микротом, на 2-е сутки после посева: а) колония (> 50 клеток); б, в) отдельные клетки.

Об. × 5 фазовый контраст.

Фиг. 8 - Фотоиллюстрация назальных хондроцитов, изолированных по стандартной методике: а, б) отдельные клетки и колонии (< 50 клеток) на 2-е сутки после посева.

Об. × 5 фазовый контраст.

Фиг. 9 - Фотоиллюстрация: монослой во флаконе с назальными хондроцитами, изолированными с применением микротом, 6-й день. Об. × 5 фазовый контраст.

Фиг. 10 - Фотоиллюстрация: монослой во флаконе с назальными хондроцитами, изолированными по стандартной методике, 7-й день. Об. × 5 фазовый контраст.

Способ осуществляют следующим образом.

Вначале подготавливают к работе микротом с вибрирующим лезвием (Leica VT1200, Германия) (Фиг. 1). На базовый прибор устанавливают поддон для льда, в него помещают буферный поддон, в котором, в свою очередь, закрепляют диск для образцов. Предварительно поддоны и диск стерилизуют в 70%-ном этиловом спирте. Буферный поддон заполняют холодным стерильным фосфатно-солевым буферным раствором рН - 7,4 («ЭКО-Сервис», Россия). Закрепляют стерильное лезвие в держателе. На панели управления настраивают ручную скорость резания, толщину срезов и амплитуду вибрации.

Для получения фрагментов хряща из носовой перегородки используют новорожденных крысят (возраст от 4 до 8 дней).

Производят декапитацию животного на уровне 1-2 шейного позвонка. Голову животного фиксируют горизонтально на диске для образцов с помощью цианакрилатного клея, погружают в фосфатный буфер и устанавливают лезвие микротом на уровне носовых проходов под углом 45-50° к поверхности кожи (Фиг. 2). С помощью микротом выполняют автоматический срез головы животного на указанном уровне в горизонтальной проекции (Фиг. 3). На полученном препарате отчетливо визуализируется перпендикулярная пластинка носовой перегородки и носовые раковины. При помощи глазных ножниц двумя разрезами по направлению сверху вниз рассекают перпендикулярную пластинку носовой перегородки в области переднего септального угла и перпендикулярной пластинки решетчатой кости. При помощи пинцета (например, офтальмологического или микрохирургического пинцета с шириной кончиков не более 1 мм) захватывают носовую перегородку в области переднего септального узла. Непрерывной вертикальной тракцией единым блоком извлекают препарат носовой перегородки и носовых раковин (Фиг. 4). Удаляют соединительную ткань и надхрящницу, измельчают на фрагменты толщиной 3-4 мм.

Далее фрагменты дважды промывают стерильным фосфатно-солевым буфером рН

- 7,4 («ЭКО-Сервис», Россия) с добавлением антибиотиков: 50 ЕД /мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и помещают в 0,15%-ный раствор коллагеназы I типа (Gibco, США) в среде DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л (ПанЭко, Россия), инкубируют при +37°C и 5% CO₂ в течение ~20 ч в CO₂-инкубаторе (SCO5W, Shellab, США). После инкубации для окончательного разделения клеток раствор перемешивают 30 мин при 100 об/мин на магнитной мешалке (Biosan, Латвия). Нерасщепленные фрагменты ткани удаляют фильтрованием (100 нм, нейлон; SPL Lifesciences, Южная Корея). Затем клетки осаждают в течение 5 мин при 400 g (центрифуга Hermle Z446K, Германия). Для отмывания от фермента клеточный осадок ресуспендируют в среде DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Бразилия) и центрифугируют в том же режиме. Процедуру повторяют дважды. После этого клетки ресуспендируют в среде DMEM с сывороткой, подсчитывают в камере Горяева, часть клеток отбирают для проточной цитометрии. Оставшуюся клеточную суспензию переносят в культуральные флаконы Corning (США) из расчета не менее 10 000 на см² поверхности, добавляют среду DMEM (содержание глюкозы 4,5 г/л), содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки, пенициллин-стрептомицин (по 50 ЕД/мкг/мл), глютамин (649 мкг/мл) и помещают в CO₂-инкубатор для прикрепления. Через 24 ч производят замену среды на свежую. Культивируют до образования монослоя, после чего снимают с пластика. На этом этапе клетки типировать, затем используют в экспериментах или замораживают.

Способ подтверждается экспериментальными данными.

Пример 1

В день эксперимента получали назальные хондроциты у 8-дневных беспородных крысят. Всего было взято 8 животных, разделенных на две группы по 4. У крысят первой группы хондроциты получали предлагаемым способом. У крысят второй группы использовали способ изоляции хондроцитов со стандартной ферментативной обработкой, описание которого приводится ниже.

Производили декаптацию животного на уровне 1-2 шейного позвонка. Голову помещали в чашку Петри в стерильный фосфатно-солевой буферный раствор. Снимали кожу и ножницами производили поперечный разрез на уровне глаз, отделяя верхнюю челюсть. Затем строго по центру вдоль спинки носа в сагиттальном направлении выполняли рассечение тканей. На полученном препарате четко визуализируется носовая перегородка. Иссекали носовую перегородку с окружающими тканями и промывали ее в фосфатно-солевом буферном растворе с добавлением антибиотиков. Для удаления всех мягких тканей хрящи помещали в стакан с 0,25% раствором трипсина и 0,2% раствором коллагеназы I типа в питательной среде DMEM (ПанЭко, Россия) в соотношении 1:1. Перемешивали при 100 об/мин на магнитной мешалке (Biosan, Латвия) 30 минут при +37°C. Процедуру повторяли еще раз со свежими растворами. Затем два раза перемешивали по 30 минут только в 0,25% растворе трипсина, меняя раствор. Центрифугировали при 100 G 2 мин (центрифуга Hermle Z446K, Германия). Супернатант выбрасывали, хрящи помещали в новый стакан с 0,15% раствором коллагеназы I типа в питательной среде DMEM и оставляли на ночь при +37°C в CO₂ в инкубаторе SCO5W, Shellab (США). На следующий день после ~20 часовой инкубации для окончательного разделения клеток раствор один раз перемешивали в течение 30 минут на магнитной мешалке при 100 об/мин, непереваренные фрагменты удаляли фильтрованием через сито для клеток с размером пор 100 нм (нейлон; SPL Lifesciences, Южная Корея). Для отмывания от фермента фильтрат центрифугировали при 400 G 5 минут, к осадку

добавляли питательную среду DMEM с 10% сыворотки, операцию повторяли еще раз. После последнего центрифугирования клеточный осадок ресуспендировали в питательной среде DMEM, часть клеток отбирали для проточной цитометрии. Оставшуюся клеточную суспензию переносили в культуральные флаконы Corning

(США) из расчета не менее 10000 на см² поверхности, добавляли среду DMEM (содержание глюкозы 4,5 г/л), содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Бразилия), пенициллин-стрептомицин (по 50 ЕД/мкг/мл), глютамин (649 мкг/мл) и помещали в СО₂-инкубатор для прикрепления. Через 24 ч производили замену среды на свежую. Культивировали до образования монослоя, после чего снимали с пластика, типировали и замораживали.

Способы сравнивали между собой по нескольким показателям:

- 1) количество живых клеток непосредственно после изоляции из хряща;
- 2) количество клеток в пересчете на одно животное;
- 3) способность клеток к адгезии и их пролиферативная активность;
- 4) время образования монослоя.

Изолированные из хрящевой ткани клетки подсчитывали в камере Горяева каждый образец не менее, чем в двух полях зрения под микроскопом Leica DMI1 (Leica Microsystem, Germany).

Живые и мертвые клетки детектировали после окрашивания флуоресцентным красителем DAPI (1 мкг/мл, D1306, Invitrogen, США) с помощью проточной цитометрии. Проточную цитометрию проводили на MACSQuant Analyzer 16 (Miltenyi Biotec, Германия).

Приводим принципиальную схему проведения анализа проточной цитометрии клеток, полученных по предложенному нами способу (Фиг. 5 а, б, в) и схему проточной цитометрии клеток, полученных по стандартной методике (Фиг. 5 г, д, е).

Для измерения флуоресценции DAPI использовали канал V1 с фильтром 450/50 нм. Общий объем пробы составлял 400 мкл, для анализа отбиралось 50 мкл. В образцах (N=4) количество записываемых событий составляло 50000 для предлагаемой методики и от 19127 до 35525 для стандартной. Разное количество событий связано с разным количеством изолированных клеток. Стратегия гейтирования проточной цитометрии заключалась в отсечении дэбриса, построении региона P1 по FSC-A против SSC-A. Для отсеечения клеточных дуплетов строился регион P2 по гейту 1 на диаграмме FSC-A против FSC-H. Далее из гейта 2 выбирались события с низкой интенсивностью флуоресценции DAPI и задавался регион P3.

Для исследования способности к адгезии и пролиферативной активности клеток их подсчитывали через 2-е суток после посева во флаконах, не снимая с пластика, и на 5-е сутки, - снимая. Через 2 суток после посева считали количество распластанных клеток в поле зрения. Для этого фотографировали клетки в каждом флаконе в 12 полях зрения по всему периметру флакона с помощью микроскопа Leica DMI1 (Leica Microsystem, Germany; Flexacam C1 camera, Leica Microsystem, Germany) с объективом ×5. Подсчет клеток на фотографиях проводили в программе ImageJ 1.52a. Каждая группа состояла из 2-х флаконов с площадью поверхности 25 см². На 5-е сутки клетки снимали с пластика раствором трипсина-ЭДТА (ПанЭко, Россия), ресуспендировали и подсчитывали в камере Горяева в двух полях зрения каждый образец. % конфлюэнтности определяли визуально под микроскопом Leica DMI1 с объективом ×5, осматривая флаконы ежедневно.

Статистическая обработка

Статистическую обработку проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа one-way ANOVA. Данные сравнивали по U-критерию Манна - Уитни, $P < 0,05$ считали статистически значимым. Графики строили в программе GraphPad Prism 10.

Результаты

Количество живых клеток, изолированных из фрагментов хряща, полученных с помощью вибрирующего микротом, по данным проточной цитометрии составило $89,78 \pm 0,20\%$, в то время как при использовании стандартного протокола - $88,59 \pm 0,14\%$. Между группами есть достоверное различие ($P < 0,05$) по U-критерию Манна-Уитни. Это говорит о том, что жизнеспособность клеток, полученных предлагаемым способом, сразу после изоляции из хряща отличалась в лучшую сторону от жизнеспособности клеток, изолированных по стандартному протоколу. Количество клеток в пересчете на одно животное по предлагаемому методу составляло 747500 ± 38891 и 306667 ± 9428 по стандартному, отличаясь в 2,4 раза.

Подсчет клеток на вторые сутки после посева показал, что медиана количества клеток в поле зрения для стандартного метода составляет 51 (Фиг. 6 а), в то время как для предлагаемого - 80 (Фиг. 6 б). Между группами есть достоверные различия по U-критерию Манна-Уитни ($P < 0.00001$). Во флаконах с клетками, изолированными с применением микротом, на этом сроке мы наблюдали присутствие мелких и более крупных (> 50 клеток) колоний (Фиг. 7 а) и делящиеся клетки (Фиг. 7 б, в). Во флаконах с клетками, изолированными по стандартной методике, делящиеся клетки встречались реже, колонии чаще содержали менее 50 клеток (Фиг. 8 а, б). На 5-е сутки общее количество клеток в первом случае составляло $1\,550\,000 \pm 14142$ /флакон, во втором - $750\,000 \pm 42426$ /флакон, т.е. различалось в 2 раза. Поскольку количество посеянных клеток было одинаковым ($232\,000 \pm 3535$ /флакон) в обоих случаях, из этого следует, что в группе предлагаемого метода число клеток увеличилось в 6,6 раза, в группе стандартного метода - только в 3,2 раза. Клетки первой группы на 6-е сутки сформировали 100% монослой (Фиг. 9), в то время как во второй группе монослой был сформирован на сутки позже, и на 7-е сутки встречались отдельные «окна», не заполненные клетками (Фиг. 10).

Выводы

Предлагаемый способ изоляции назальных хондроцитов с применением вибрирующего микротом позволяет получить большее количество жизнеспособных клеток, в том числе в пересчете на одно животное. Клетки обладают лучшей адгезионной способностью, более короткой лаг-фазой и более высокой скоростью пролиферации (по сравнению с клетками, изолированными по стандартной методике с длительной ферментативной обработкой), и может быть использован при изготовлении тканеинженерных конструкций, в том числе с применением 3D-биопечати.

(57) Формула изобретения

Способ получения назальных хондроцитов новорожденных крысят, включающий получение фрагментов хряща с последующим изолированием из них хондроцитов ферментативным путем, отличающийся тем, что фрагменты носового хряща получают у 4-8-дневных крысят на полуавтоматическом микротоме с вибрирующим лезвием, промывают их в стерильном фосфатно-солевом буферном растворе, измельчают и подвергают однократной обработке 0,15%-ным раствором коллагеназы I типа в течение 20 часов при 37°C , после чего клетки отмывают от фермента центрифугированием в питательной среде с добавлением сыворотки крови животных, определяют их

жизнеспособность на проточном цитометре, культивируют во флаконах до образования монослоя, снимают с пластика, типируют и замораживают.

5

10

15

20

25

30

35

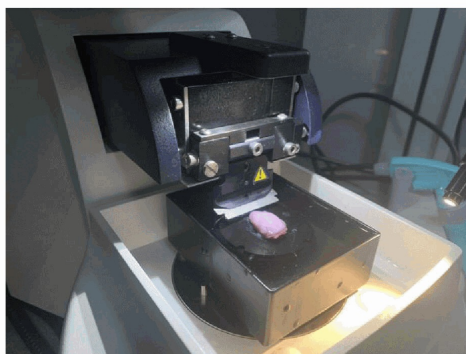
40

45

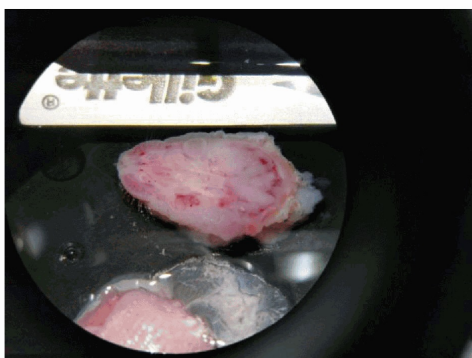
1



Фиг.1



Фиг.2

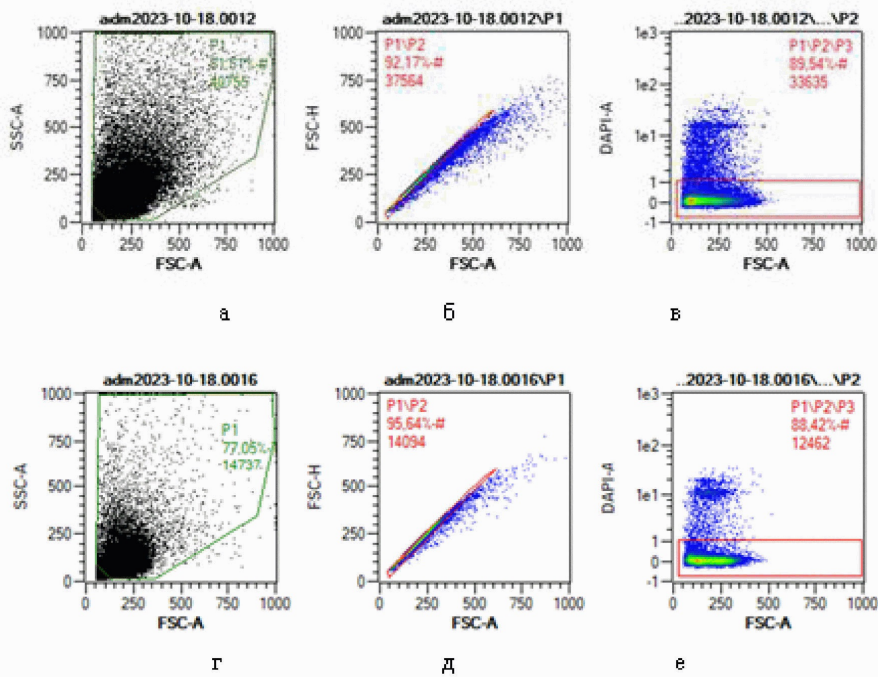


Фиг. 3

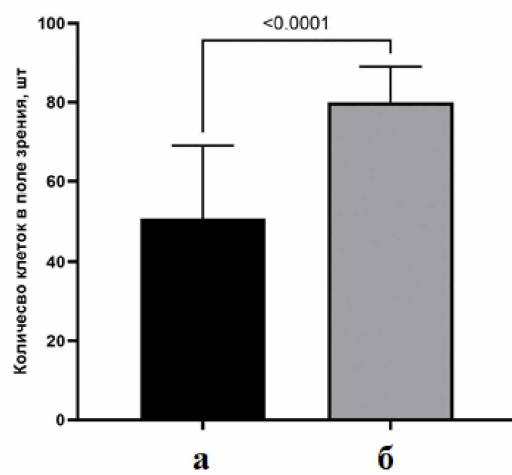
2



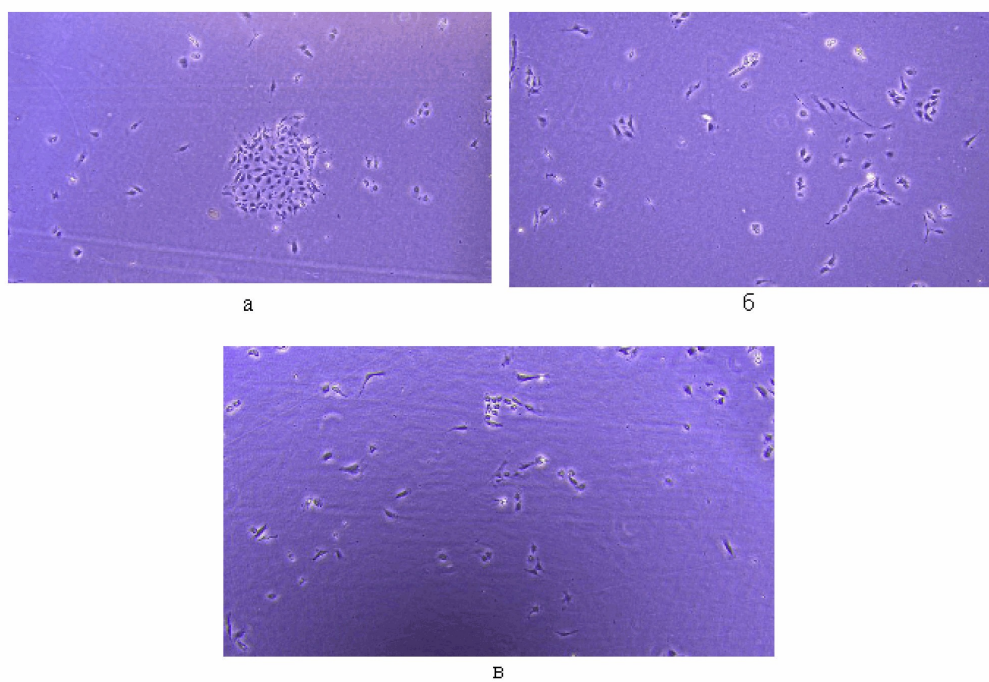
Фиг. 4



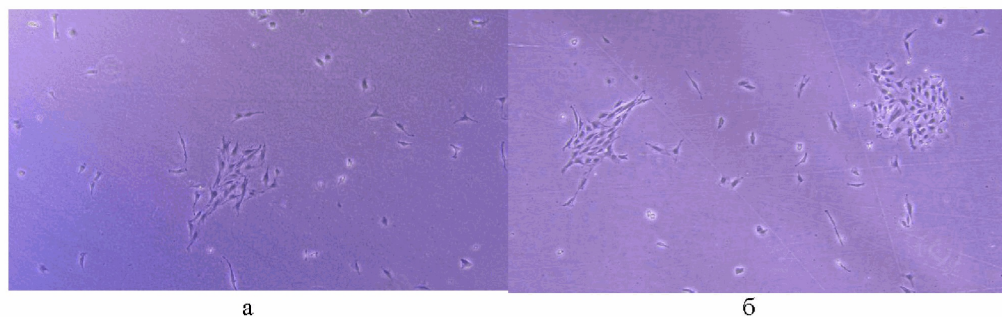
Фиг. 5



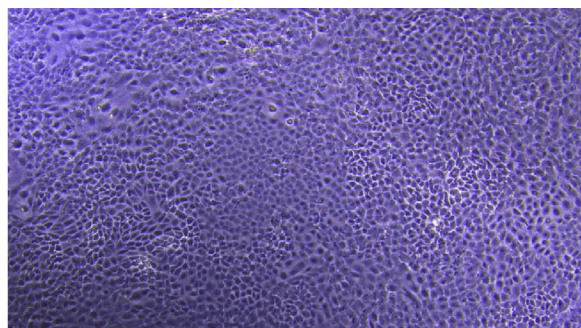
Фиг. 6



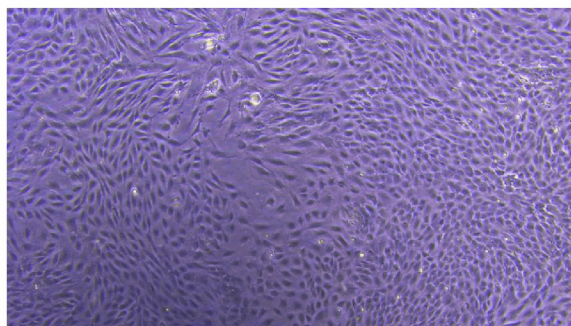
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10