

---

**EUROPEAN**  **of Molecular  
Journal Biotechnology**

---

Has been issued since 2013.  
ISSN 2310-6255.  
2013. Vol.(1). № 1. Issued 4 times a year

EDITORIAL STAFF

**Dr. Novochadov Valerii** – Volgograd State University, Volgograd, Russia (Editor-in-Chief)  
**Dr. Goncharova Nadezhda** – Research Institute of Medical Primatology, Sochi, Russia

EDITORIAL BOARD

**Dr. Malcevschi Alessio** – University of Parma, Parma, Italy  
**Dr. Mathivanan D.** – St. Eugene University, Lusaka  
**Dr. Nefed'eva Elena** – Volgograd State Technological University, Volgograd, Russia  
**Dr. Tarantseva Klara** – Penza State Technological University, Penza, Russia

The journal is registered by Federal Service for Supervision of Mass Media, Communications and Protection of Cultural Heritage (Russia). Registration Certificate ПИИ № **ФЦ77-55114** 26.08.2013.

Journal is indexed by: **CrossRef** (UK), **EBSCOhost Electronic Journals Service** (USA), **Electronic scientific library** (Russia), **Global Impact Factor** (Australia), Open Academic Journals Index (Russia), **ULRICH's WEB** (USA).

All manuscripts are peer reviewed by experts in the respective field. Authors of the manuscripts bear responsibility for their content, credibility and reliability.

Editorial board doesn't expect the manuscripts' authors to always agree with its opinion.

Postal Address: 26/2 Konstitutcii, Office 6  
354000 Sochi, Russia

Website: <http://ejournal8.com/>  
E-mail: [ejm2013@mail.ru](mailto:ejm2013@mail.ru)

Founder and Editor: Academic Publishing  
House *Researcher*

Passed for printing 16.9.13.

Format 21 × 29,7/4.

Enamel-paper. Print screen.

Headset Georgia.

Ych. Izd. l. 4,5. Ysl. pech. l. 4,2.

Circulation 1000 copies. Order № 1.

European Journal of Molecular Biotechnology

2013

No

1

Издается с 2013 г. ISSN 2310-6255.  
2013. № 1 (1). Выходит 4 раза в год.

#### РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

**Новочадов Валерий** – Волгоградский государственный университет, Волгоград, Россия  
(Гл. редактор)

**Гончарова Надежда** – Научно-исследовательский институт медицинской приматологии РАН, Сочи, Россия

#### РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

**Малкевсчи Алессо** – Университет города Парма, Парма, Италия

**Мативанан Д.** – Университет Санкт Евген, Лусака, Замбия

**Нефедьева Елена** – Волгоградский государственный технический университет, Волгоград

**Таранцева Клара** – Пензенский государственный технологический университет, Пенза

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере массовых коммуникаций, связи и охраны культурного наследия (Российская Федерация). Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ № ФС77-55114 от 26.08.2013 г.

Журнал индексируется в: **CrossRef** (Великобритания), **EBSCOhost Electronic Journals Service** (США), **Global Impact Factor** (Австралия), **Научная электронная библиотека** (Россия), **Open Academic Journals Index** (Россия), **ULRICH's WEB** (США).

Статьи, поступившие в редакцию, рецензируются. За достоверность сведений, изложенных в статьях, ответственность несут авторы публикаций.

Мнение редакции может не совпадать с мнением авторов материалов.

Адрес редакции: 354000, Россия, г. Сочи,

ул. Конституции, д. 26/2, оф. 6

Сайт журнала: <http://ejournal8.com/>

E-mail: [ejm2013@mail.ru](mailto:ejm2013@mail.ru)

Учредитель и издатель: ООО «Научный издательский дом "Исследователь"» - Academic Publishing House *Researcher*

Подписано в печать 16.9.13.

Формат 21 × 29,7/4.

Бумага офсетная.

Печать трафаретная.

Гарнитура Georgia.

Уч.-изд. л. 4,5. Усл. печ. л. 4,2.

Тираж 1000 экз. Заказ № 1.

## C O N T E N T S

Gaifullin N.M., Bachurin A.V. Recombinant Bone Morphogenetic Protein 2 Stimulates the Remodeling Chitosan-Based Porous Scaffold Into Hyaline-like Cartilage: Study in Heterotopic Implantation .....	4
Nefed'eva E., Veselova T., Veselovskii V., Lysak V. Influence of Pulse Pressure on Seed Quality and Yield of Buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench.) .....	12
Novochadov V.V. Growth Factor Technologies in Cartilage Tissue Engineering (Review) .....	28
Pavlova V., Vasichkina E., Nefed'eva E., Lysak V. Influence of Pulse Pressure on the State of Biopolymers and the Probability of Hydrolysis of Starch in Seeds .....	38

ISSN: 2310-6255

Founder: Academic Publishing House *Researcher*

DOI: 10.13187/issn.2310-6255

Has been issued since 2013.

**European Journal of Molecular Biotechnology**



UDC 616.72-018.3 : 577.3

**Recombinant Bone Morphogenetic Protein 2 Stimulates the Remodeling  
Chitosan-Based Porous Scaffold Into Hyaline-like Cartilage:  
Study in Heterotopic Implantation**

<sup>1</sup>Nurshat M. Gaifullin

<sup>2</sup>Alexey V. Bachurin

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University, Russian Federation  
Lomovnosovskiy Avenue 31/5, Moscow, 119192  
PhD (Medicine), Assistant-professor  
E-mail: gaifulin@rambler.ru

<sup>2</sup>OXY-center, Russian Federation  
Uritzko st. 186, Krasnodar, 350047  
Senior embryologist

**Abstract.** To study the morphology of remodeling the chitosan-based three-dimensional porous scaffold, containing bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) for chondroinduction, the experiments with heterotopic implantation using 28 Wistar rats were carried out. Scaffolds with growth factor (n=12) or without it (n=12), against intact control (n=4) were implanted subcutaneously. Classical methods of histology and morphometry as well as immune histochemical markers (CD-68, CD-31, MMP-9, TIMP-1, and osteonectin expression), one used to investigate zone of remodeling in euthanized animals at 4 and 8 weeks after implantation.

The BMP-2 application provides more intensive and rapid new cartilage formation from the scaffold matter. The additional chondroinductive effect proved more intensive settlement and proliferation of chondral cells in the regenerate, expression of chondral phenotype with the building the hyaline-like matrix, and the supporting necessary balance between the matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors.

**Keywords:** cartilage tissue engineering; chitosan; MMP-9; TIMP-1; BMP-2; osteonectin; macrophages.

**Introduction.** The essence of tissue engineering is the development and application of biomaterials for transplantation to replace tissues and functions have been partially or completely lost. Materials and framing constructs (scaffolds), created for reconstructive cartilage surgery, are no exception. In this regard, they should have complete biocompatibility, support the vitality of the settled cells, transform into natural autologous matrix, and managed to change the structure and properties in response to the action of environmental factors [1, 2, 3, 4].

Chitosan is deacetylated form of chitin, which is widely distributed polymer of natural origin, it has a majority of the above properties, as was shown to be biomimetic to the osseous and cartilaginous tissues. Chitosan has gained popularity for various modifications of cartilage engineered scaffold due to availability of commodities for its production and ease enzymatic treatments to improve its physical and chemical properties [5, 6]. It easily forms copolymers with other materials (silk, hydroxyapatite, polyalginate, polylactic acids, etc.), forming the porous

composites with adequate mechanical properties and ability to adhesion and proliferation of cells [7, 8, 9].

Initially high viscosity of chitosan solutions allows the use of various methods to create three-dimensional porous scaffolds ranging from freezing-drying up to foaming gases, which bubbles form the stable pores of up to 500  $\mu\text{m}$  in diameter. The necessity of creating porous structures is determined by the mechanical, biochemical and physiological needs of prosthetic tissue. Firmly-elastic properties of some chitosan-based scaffolds approach to values for the trabecular bone, they can carry compressive loads up to 75 MPa. It was proved the influence of pore sizes and thickness of chitosan membrane, forming a porous 3D matrix, on the quality of cell adhesion, intensity of subsequent cell adhesion, proliferation and neoangiogenesis [7, 10]. Porous surface of chitosan scaffolds ensure the efficiency of its use with options of surface spray and gel fillers for additional stimulation of chondrogenesis.

The alignment of different growth factors in the area of implantation used to be similar effective stimulant in cartilage tissue engineering. Many of growth factor (epidermal EGF, platelet derived growth factor, transforming growth factor TGF- $\beta$ , and others), bone morphogenetic proteins (BMPs), matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs), as well the majority of known cytokines it was proven to impact on chondrogenesis [2, 3, 6]. For the needs of regenerative medicine, TGF- $\beta$  and BMP-2 were most promising if they used as a temporary tissue deposits (for 5-7 days following implantation) had provided additional chondroinductive and chondroconductive properties of implants [11, 12].

Quite recently, Russian molecular biotechnologists have developed original method for obtaining recombinant BMP-2 by highly efficient producer strain based on *E. coli* BL21(DE3). New biomaterial have been created on its basis, and the activity of this factor have been shown both *in vitro*, and on the model of ectopic osteogenesis *in vivo* [12, 13].

We felt it necessary to study experimentally the chondroplastic properties of this BMP-2 in case of combination with chitosan-based scaffold, since it originally had precisely the ability to chondroinduction.

**Material and methods.** The work was performed using 28 white rats Wistar weight from 240 to 290 g. The experimental protocol corresponded to the ethical standards set out in the International Code of Medical Ethics (1994), the Good Laboratory Practice (GLP) principles, the Helsinki Declaration (2000) and the Directives of the European Community 86/609EEC.

Three-dimensional porous coin-like pellets were fabricated at the Bioengineering and Bioinformatics Department of Volgograd State University (Russia) using commercial chitosan product (Pharma Nutrients, USA). Fabrication included an additional cleaning and deacetylation of the primary material in an oxygen-free medium under reduced pressure, washing out and slow dehydration under conditions preventing cornification, resuspending in the temporary medium, and the formation of porous structure with using freeze-drying method. As a result of this procedures the scaffolds of 5 mm in diameter, thick of 2 mm in the center, up to 1 mm edges, with regular pore size of 70-150  $\mu\text{m}$  were obtained [14].

Scaffolds were implanted under the skin in the area of the withers in rats, anesthetized by intramuscular Zoletyl injection of 40 mg/kg of body weight. In the main group (12 cases) 2 mL of BMP-2-containing matter «Gamalant<sup>TM</sup>-pasta-FORTE Plus» developed in Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology (Russia), were placed on the surface of each scaffold before implantation evenly with 24 point touches of capillary needles (12 on each side). Developers were previously shown good osteoinductive and osteoconductive effects of this stimulator during application on bioactive implant surfaces placed in the bone tissue [12]. The second group consisted of 12 animals which have similarly established implants without making a growth factor.

The dynamics of healing and scaffold remodeling traced through 4 and 8 weeks after implantation. All rats were output from the experiment by Zoletyl overdose (200 mg/kg of body weight), the pieces of tissue from the implantation area were taken for histological examination. Eight pieces of subcutaneous adipose tissue of four rats being in standard conditions of the same vivarium due to all experiment time, were studied as control samples.

The mobility *in situ*, the condition of surrounding tissues, the presence of supplying vessels, the severity of adhesions, and degree of scaffold biodegradation evaluated immediately after seizure of samples.

Complete cycle of histological slide production includes embedding into Paraffin with the STP 420 D dehydration/infiltration unit (Microm, Germany) and the EG 1160 modular embedding station (Leica, Germany), microtomy with rotary system Leica RM 2255 (Leica, Germany), staining with Link 48 and cover slipper (Dako, Denmark), microscopy and digital photomicrography with Leica DM 4000 (Leica, Germany). To stain slices classic hematoxylin-eosin and Masson's trichrome protocols were used, to reveal density of tissue matrix toluidine blue was applied [15]. Immunohistochemical study included the identification of cell numbers such as vascular endothelium (CD31), macrophage/osteoclasts (CD-68), osteoblasts and osteocytes (Osteonectin), and chondral cells (MMP-9, TIMP-1). Commercial Ready-to-Use Kits of Dako (Denmark) and Leica Mycrosystems (Germany) were applied.

Morphometric analysis was performed using the software ImageJ (USA). Specific density of matrix (CU), the volume fractions of the tissue compartments in a regenerate (%), and numerical density of single cells (1/mm<sup>3</sup>) were determined quantitatively. Processing of these data have performed using Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA) software with common requirements for biomedical research. To analyze the differences between the samples Mann-Whitney criterion was used.

**The results of the study.** After 4 weeks the resorption of more than half of chitosan matter was noted in the group with BMP-2 application, and dense mixed regenerate have formed on this place. Morphology of the regenerate had bright structural variability and polymorphism of the cellular elements. Resorption of the surface layers of scaffold was accompanied by the growth of connective tissue elements with an abundance of extracellular chaotically oriented matrix and the presence of vessels. Deeper layers contained in the islets of hyaline-like cartilage, surrounded by connective tissue (Fig. 1A).

In the comparison group the scaffold bioresorption was no less intensive, but the number of cartilaginous elements in the regenerate was noticeably less.

At the 8<sup>th</sup> week the study of tissues regenerate confirmed almost complete bioresorption of scaffold matter. The layer of connective tissue remained on the surface of regenerate, it was slightly thicker, more dense, and with fewer vessels. Chitosan particles were diffusely distributed in the volume of the regenerate and surrounded by macrophages with morphological features of active phagocytosis. Focuses of previously formed cartilage became stronger and merged among themselves, as a result the main mass of regenerate was presented by newly hyaline-like cartilage with small areas of fibrous connective tissue. Small groups of chondrocytes resembling small clusters could be found (Fig. 1B).

In two cases out of five, we observed the presence of small osteogenic islets in the surface layers of regenerate, have been in contact with the vasculature of surface capsules.



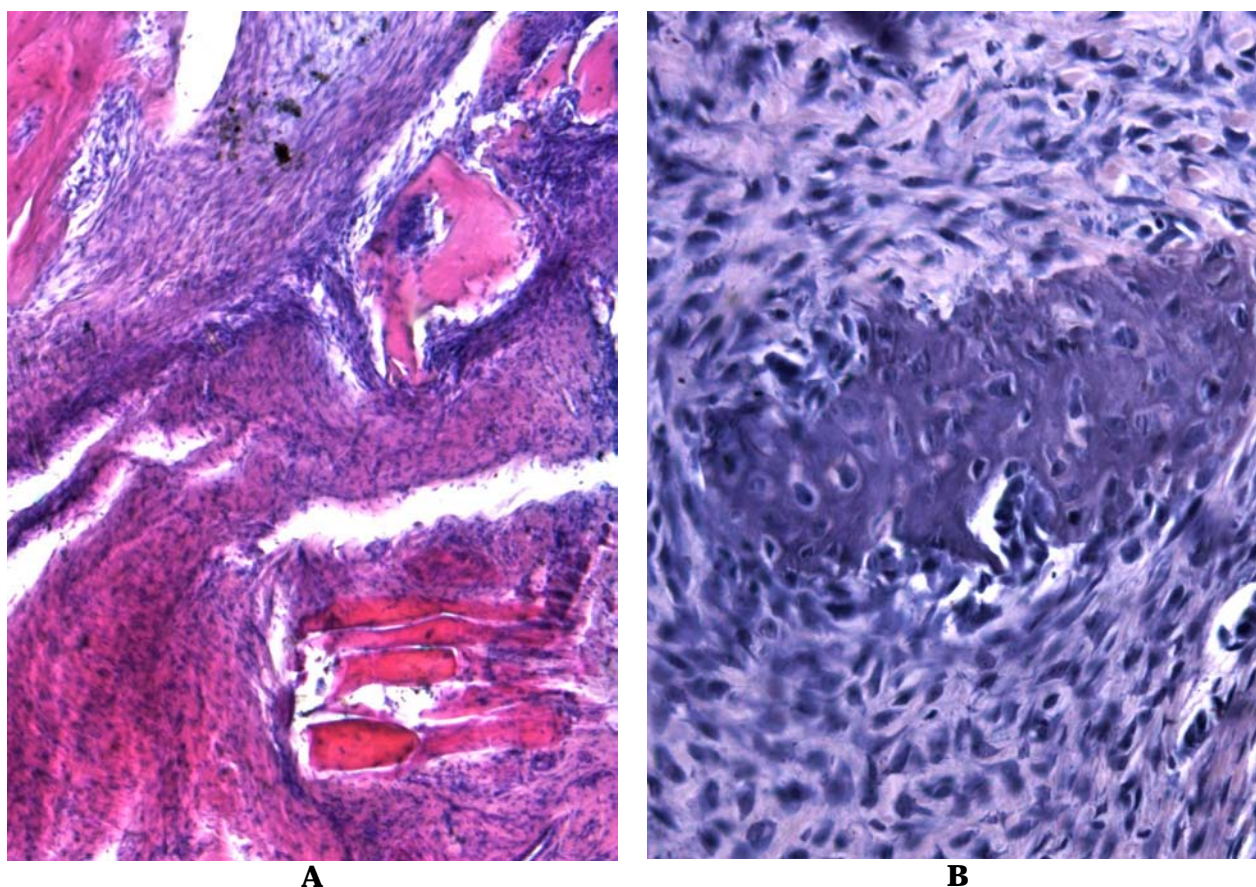


Figure 1. The place of remodeling porous chitosan scaffold with surface stimulation by BMP-2. A. 4 weeks. Mixed regenerate with a prevalence of fibrous cartilage and fragments of resorbing chitosan. Stain with hematoxylin and eosin. x 120. B. 8 weeks. Portion of hyaline-like cartilage in the stage of intensive remodeling. Stain with hematoxylin and eosin. x 480.

In the comparison group the scaffold bioresorption culminated in the formation of mixed regenerate with a prevalence of fibrous cartilage. Macrophages, often in groups of 3-5 cells, were detected on the surface of the non-resorbed polymer particles, captured chitosan fragments were frequently identified in their cytoplasm.

Data of classical morphometry are presented in table. 1.

Table 1  
Quantitative morphological indicators of the regenerate after heterotopic implantation of chitosan scaffolds in rats ( $M \pm m$ )

Indices	Group	Controls	Timing of the experiment	
			4 weeks	8 weeks
Chitosan volume fraction, %	Main Comparative	0	37,2 ± 2,5	6,9 ± 0,5
			39,8 ± 2,7	5,3 ± 0,4 *
Connective tissue volume fraction, %	Main Comparative	45,5 ± 2,9	28,1 ± 2,2	15,1 ± 1,4
			34,0 ± 2,6	29,0 ± 2,3 *
Cartilage volume fraction, %	Main Comparative	0	27,3 ± 2,4	66,9 ± 4,9
			12,8 ± 1,0 *	52,7 ± 4,1 *
Specific density of matrix, CU	Main Comparative	0,25 ± 0,04	0,53 ± 0,06	0,68 ± 0,07
			0,38 ± 0,04	0,45 ± 0,05 *

\* significant differences between groups.

As can be seen from the presented data, for 8 weeks after implantation the volume fraction of the cartilage in a regenerate on the place of chitosan scaffold increased to 52.7% without the use of BMP-2, and to 66.9% when growth factor had been used ( $P < 0.05$ ). This was accompanied by a more intensive and complete resorption of chitosan matter. The specific density of the cartilage matrix provided in the experimental group 1.51 times more than the rate value in the comparison group.

The data about the expression of the investigated immune histochemical markers are given in table. 2.

At 4<sup>th</sup> week numerical density of CD68+ cells mainly represented in regenerate by macrophages, increased in the main group in 14.8 times and in the comparison group in 16.5 times against the rate value in surrounding tissues. Later, the number of macrophages declined dramatically, but it still exceeded the values in the subcutaneous tissue in 5.9-6.8 times without significant differences between experimental and comparison groups. These data showed that the use of BMP-2 was almost not influence the intensity of macrophage reactions due to chitosan scaffold remodeling.

Table 2

The expression of different immunohistochemical markers in regenerates after heterotopic implantation of chitosan scaffolds in rats ( $M \pm m$ )

Indices	Group	Controls	Timing of the experiment	
			4 weeks	8 weeks
CD-68+ cells, 1/mm <sup>3</sup>	Main	49 ± 3,2	724 ± 43,2 *	290 ± 16,8 *
	Comparative		807 ± 46,5 *	331 ± 23,4 *
CD31+ cells, CU	Main	0,17 ± 0,03	0,35 ± 0,05 *	0,22 ± 0,04 *
	Comparative		0,64 ± 0,07 *#	0,47 ± 0,06 *#
MMP-9+ cells, 1/mm <sup>3</sup>	Main	0	1152 ± 57,1	2739 ± 123,5
	Comparative		743 ± 40,8 #	1794 ± 80,2 #
TIMP-1+ cells 1/mm <sup>3</sup>	Main	0	118 ± 7,4	1634 ± 73,2
	Comparative		205 ± 12,6 #	1029 ± 58,0 #
Osteonectin+ cells CU	Main	0	0	0,24 ± 0,03 *
	Comparative		0	0,11 ± 0,02 *#

\* significant differences between groups.

The degree of vascularization estimated from the total brightness of immune- positive material (CD31+ cells) also was the highest at 4<sup>th</sup> week of the experiment. It was higher in 2.1 times after using the BMP-2, comparing to 3.8 times in group without it ( $P < 0.01$  between groups). Similar but less drastic changes have been revealed at 8<sup>th</sup> week of experiment. So, the adding growth factor reduces the intensity of vascularization due to chitosan scaffold remodeling.

The number of chondrocytes synthesizing MMP-9, increased between the 4<sup>th</sup> to the 8<sup>th</sup> week of the experiment, and numerical density of cells was on those dates higher in the main group in 1.5 times higher than in the comparison one. The maximum expression of MMP-9 was revealed in chondrocytes, surrounded by newly hyaline-like matrix, which have been an evidence of intensive tissue remodeling (Fig. 2A).

At the 4<sup>th</sup> week of the experiment cells synthesizing the tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1+ cells), were few in the regenerate, but by the 8<sup>th</sup> week their number had increased, so the ratio MMP-9+ : TIMP-1 had become of 1.7 : 1 in both groups. TIMP-1+ cells were localized in the thickness of the newly cartilaginous tissue (Fig. 2B).



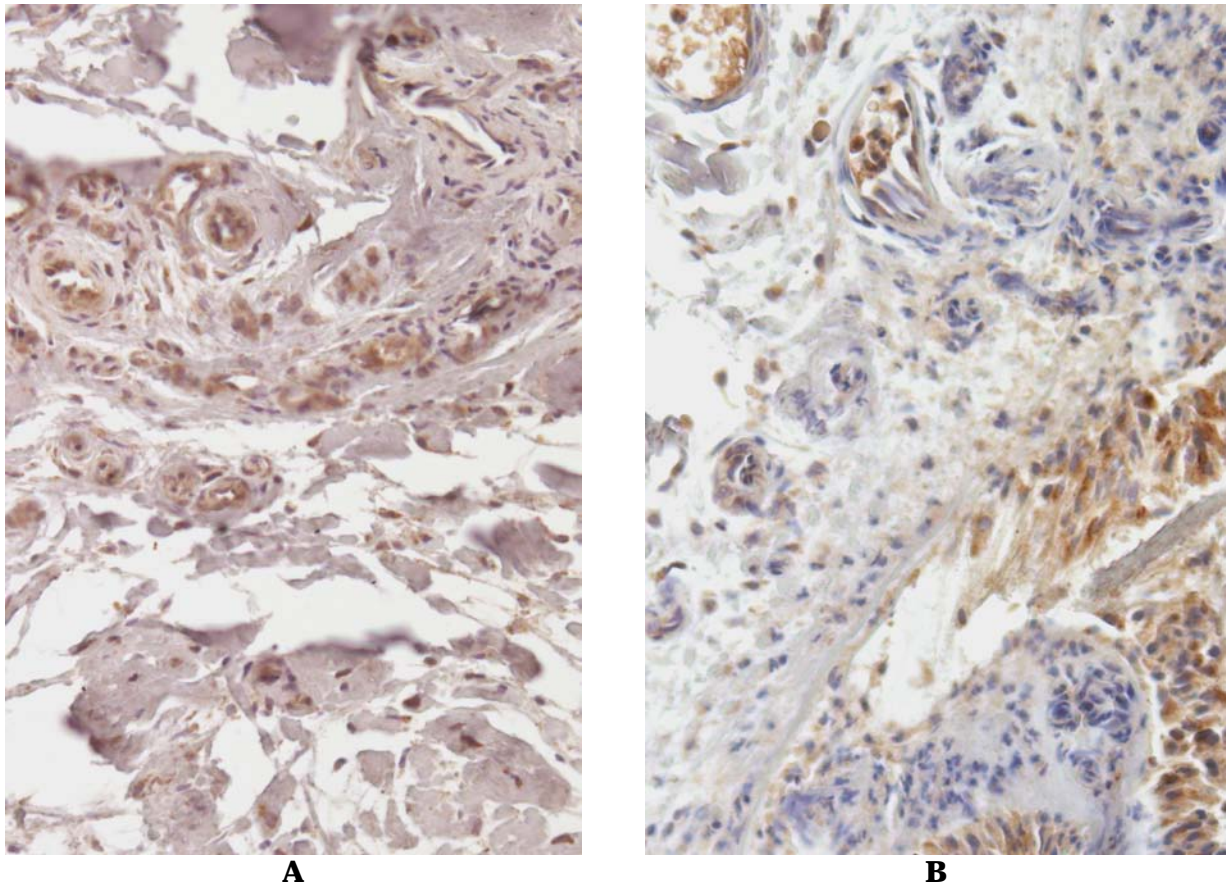


Figure 2. The place of remodeling porous chitosan scaffold with surface stimulation by BMP-2. A. 8 weeks. Numerous cells with high expression of MMP-9 placed in the zone of the newly formed cartilage. MMP-9-specific monoclonal antibodies, immunoperoxidase assay. x 480. B. A smaller number of cells with high expression of TIMP-1 in the same zone of the regenerate. TIMP-1-specific monoclonal antibodies, immunoperoxidase assay. x 480.

Co-localization of these markers in the regenerate evidenced on the integration of up-regulatory mechanisms of remodeling the neo-formed cartilage on the place of chitosan scaffold.

Osteonectin expression reflecting the presence of osteogenic elements was revealed in regenerates not earlier than 8<sup>th</sup> weeks after implantation, it was slightly higher in the main group. Osteonectin-positive substances were localized mainly around capsular vessels of regenerate, which was a consequence of osteoinductive activity of BMP-2. This fact is not a cause to concern if these scaffolds used for replacement of cartilage defects, because the conditions of tissue healing in the joint excluded osteogenesis, except osteochondral zone where this had a positive effect for tissue-engineering design.

**Discussion.** Since the chondroinductive effect of porous chitosan scaffolds no doubts and was repeatedly confirmed [5, 7, 10, 12], the main task was to find out main effects of small BMP-2 quantities after it's submit to the surface of the implant immediately before implantation. It is clear known, the initial processes in scaffold matter are inconceivable without migration and activation of tissue macrophages. These cells are able not only utilize a scaffold matter, but also develop a wide spectrum of cytokines and other signal molecules, causing stem cells and different immature cells to move from surrounding tissue in scaffold, proliferate, and transfer to chondral phenotype [3, 9, 16].

Bone morphogenetic proteins play a vital role in controlling the proliferation, differentiation, phenotypic expression (synthesis of collagen type 2, aggrecan, MMPs, TIMPs etc.), and life cycle duration through the classic Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway activation and the expression of NF- $\kappa$ B factor [11, 17, 18]. In relation to explored model the BMP-2 adding led to significant growth of chondral cell number and results of their function in regenerates. One can see high expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tissue on the place of scaffold implantation.

The sequence of MMP and TIMP activation in the tissues regenerate testifies about running active processes of tissue remodeling already after primary substitution of scaffold matter, which was a feather of restoring natural processes of cartilage matrix renewal.

**Conclusion.** Three-dimensional porous chitosan-based scaffold improved to have high capacity for chondroinduction, resulting in formation of fibrous cartilage with a moderate quarter of hyaline-like cartilage on the place of heterotopic implantation for 8 weeks. By surface adding nano-quantities of BMP-2 it can significantly improve chondroinductive properties of chitosan scaffold, as a result, the main volume of the regenerate after heterotopic implantation, judging by the cell representation, MMP-9 and TIMP-1 expression, and density of matrix is presented by hyaline-like cartilaginous tissue, close in composition and properties of natural hyaline cartilage.

### References:

1. Malanin D.A., Novochadov V.V., Samusev S.R., et al. (2009) Innovative technologies in restoration of damaged or diseased knee joint. *Herold Volgograd State Med. Univ. [Vestnik Volgogradskogo Gosudarstvennogo Meditsinskogo Universiteta]*. (2), pp. 7-13. [in Rus.]
2. van Osch G.J., Brittberg M., Dennis J.E., et al. (2009) Cartilage repair: past and future – lessons for regenerative medicine. *J. Cell Mol. Med.* 13 (5), pp. 792–810.
3. Malanin D.A., Pisarev V.B., Novochadov V.V. (2010) Restoration of Cartilage Lesions in a Knee Joint: Monograph. *Volgograd: Volgograd Scientific Publishing*, 518 pp. [in Rus.]
4. Kock L., van Donkelaar C.C., Ito K. (2012) Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell Tissue Res.* 347(3), pp. 613-627.
5. Di Martino A. Sitterling M., Risbud M.V. (2005) Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials.* 26 (30), pp. 5983-5990.
6. Novochadov V.V. (2013) The control of the cell settlement and scaffold remodeling in cartilage tissue engineering: a review. *Herold Volgograd State Univ. 11: Natural Sciences [Vestnik Volgogradskogo Gosudarstvennogo Universiteta. 11: Estestvennye Nauki]*. (1), pp. 19-28. [in Rus.]
7. Correia C.R., Moreira-Teixeira L.S., Moroni L., et al. (2011) Chitosan scaffolds containing hyaluronic acid for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng. Part C. Methods.* 17 (7), pp. 717-730.
8. Chen J.P. Chen S.H., Lai G.J. (2012) Preparation and characterization of biomimetic silk fibroin/chitosan composite nanofibers by electrospinning for osteoblasts. *Nanoscale Res Lett.* 7 (1), pp. 170-178.
9. Lu T., Li Y., Chen T. (2013) Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Int. J. Nanomedicine.* 8, pp. 337–350.
10. Muzzarelli R.A. (2011) Biomedical exploitation of chitin and chitosan via mechanochemical disassembly, electrospinning, dissolution in imidazolium ionic liquids, and supercritical drying. *Mar. Drugs.* 9 (9), pp. 1510-1533.
11. Bessa P.C., Casal M., and Reis R.L. (2008) Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2, pp. 1-13.
12. Mironov S.P., Gintsburg A.L., Es'kin N.A., et al. (2010) Experimental evaluation of osteoinduction of recombinant bone morphogenic protein (rhBMP-2) of native production fixative on biocomposite or bone matrix. *Herold Traumatol. Ortop. (Moscow) [Vestnik Travmatologii i Ortopedii imeni N.N. Priorova]*. (4), pp. 38-44. [in Rus.]
13. Sharapova N.E., Kotnova A.P., Galushkina Z.M., et al. (2010) Production of the recombinant human bone morphogenetic protein-2 in *Escherichia coli* and testing of its biological activity in vitro and in vivo. *Mol. Biol. (Moscow)*. 44 (6), pp. 923-930.
14. Lyabin M.P., Semenov P.S. (2011) Improved technology obtaining chitosan. *Herold Volgograd State Univ. 11: Natural Sciences [Vestnik Volgogradskogo Gosudarstvennogo Universiteta. 11: Estestvennye Nauki]*. (2), pp. 17-22. [in Rus.]
15. Handbook of histology methods for bone and cartilage. (2003) Ed. by Y.H. An and K.L. Martin. *N.-Y.: Humana Press*, 587 pp.
16. Goldring M.B. (2012) Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 4 (4), pp. 269–285.
17. Meszaros E., Malesud C.J. (2012) Prospects for treating osteoarthritis: enzyme–protein interactions regulating matrix metalloproteinase activity. *Ther. Adv. Chronic Dis.* (3), pp. 219-229.

18. Wang Y., de Li L., Zhang X.B., et al. (2013) Increase of TNF $\alpha$ -stimulated osteoarthritic chondrocytes apoptosis and decrease of matrix metalloproteinases 9 by NF- $\kappa$ B inhibition. *Biomedical and Environment Sciences*. (26). pp. 277-283.

УДК 616.72-018.3 : 577.3

**Рекомбинантный BMP-2 стимулирует ремоделирование пористой матрицы на основе хитозана в гиалиноподобный хрящ: модель гетеротопической имплантации**

<sup>1</sup> Нуршат Минуллаевич Гайфуллин

<sup>2</sup> Алексей Владимирович Бачурин

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия  
119192, г. Москва, Ломоносовский пр., 31, корп. 5

Кандидат медицинских наук, доцент  
E-mail: gaifulin@rambler.ru

<sup>2</sup> ОХУ-центр, Краснодар, Россия  
350047, г. Краснодар, ул. Урицкого, 186  
Старший эмбриолог

**Аннотация.** В экспериментах с использованием 28 белых крыс изучали дополнительные возможности хондроиндукции за счет внесения малых количеств костного морфогенетического белка BMP-2 на поверхность пористых скаффолдов на основе модифицированного хитозана. Скаффолды с фактором роста (n=12), без него (n=12) через 4 и 8 недель после гетеротопической имплантации и ткани подкожной клетчатки интактных крыс (n=4) были изучены с использованием классических гистопатологических и морфометрических методов, а также при иммуногистохимическом выявлении CD-68, CD-31, MMP-9, TIMP-1 и остеоонектина. В результате исследования установлено, что предварительное внесение BMP-2 на поверхность скаффолдов сопровождается дополнительным хондроиндуктивным эффектом, который заключается в более интенсивном заселении и пролиферации в регенерате клеток хондрального ряда, экспрессии хондрального фенотипа с построением матрикса гиалиноподобного хряща и установлении необходимого баланса между матриксными металлопротеиназами и их тканевыми ингибиторами.

**Ключевые слова:** тканевая инженерия хряща; хитозан; MMP-9; TIMP-1; BMP-2; остеоонектин; макрофаги.



ISSN: 2310-6255

Founder: Academic Publishing House *Researcher*

DOI: 10.13187/issn.2310-6255

Has been issued since 2013.



**European Journal of Molecular Biotechnology**

UDC 581.1:631.531.027.3:631.559:581.143

**Influence of Pulse Pressure on Seed Quality and Yield of Buckwheat  
(*Fagopyrum esculentum* Moench.)**

<sup>1</sup> Elena Nefed'eva

<sup>2</sup> Tat'yana Veselova

<sup>3</sup> Vladimir Veselovskii

<sup>4</sup> Vladimir Lysak

<sup>1</sup> Volgograd State Technical University, Russian Federation  
Professor of Industrial Ecology and Safety Department, D. Sc. (Biology)  
400005, Volgograd, Lenin avenue, 28  
E-mail: nefedieva@rambler.ru

<sup>2</sup> Moscow State University named after M.V. Lomonosov, Russian Federation  
Biological Faculty, Department of Biophysics  
Senior Research Fellow of Plant Cell Biophysics Group, D. Sc. (Biology)  
119991, Moscow, GSP-2, Vorob'evy gory

<sup>3</sup> Moscow State University named after M.V. Lomonosov, Russian Federation  
Biological Faculty, Department of Biophysics  
Leading Research Fellow of Plant Cell Biophysics Group, D. Sc. (Biology)  
119991, Moscow, GSP-2, Vorob'evy gory

<sup>4</sup> Volgograd State Technical University, Russian Federation  
Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Professor, D. Sc. (Engineering)  
400005, Volgograd, Lenin avenue, 28  
E-mail: lysak@vstu.ru

**Abstract.** A method of pre-sowing treatment of seeds by pulse pressure which is characterized by high intensity and accuracy of dosage has been proposed. Pulse pressures in the range of 11-29 MPa did not lead to acute lethality determined by phosphorescence at room temperature. So there was no elimination of unproductive individuals but pulse pressure stimulated physiological processes in seeds and plants, leading to increased yield. Changes of germination, growth, and distribution of substances as well as plant productivity were observed. Generalization and analysis of experimental results demonstrated zones in dose-dependent area, such as the zone of hormesis (11-17 MPa), transitional zone (20-26 MPa) and stress zone (29 MPa and more).

**Keywords:** *Fagopyrum esculentum* Moench.; plant stress; phosphorescence at room temperature; seed germination; growth.

**Введение.** В настоящее время активно разрабатываются новые подходы в биотехнологии и биоинженерии растений, направленные на наиболее полную реализацию потенциала продуктивности растений, для чего среди прочих методов используются стимуляторы роста физической природы [3; 16; 2]. Известны зависимости биологического эффекта от дозы воздействия, однако существует проблема разнонаправленного действия больших и малых доз, вызывающих соответственно неадаптивные (повреждение) или адаптивные реакции. В последнем случае развивается запрограммированная реакция, дающая возможность приспособиться к внешним условиям. Проблема стимулирующего

действия физических факторов до сих пор не решена окончательно, несмотря на многочисленные исследования [7; 12].

Концепция гормезиса – эффекта стимуляции от невысоких доз – возникла в медицинской физиологии и представляет интерес для понимания действия физических факторов. Внешний фактор в определенных пределах стимулирует компенсаторно-приспособительные механизмы организма и адаптацию его функций к новым условиям. На современном уровне знаний наиболее изученным является механизм радиационного гормезиса [7].

Эксперименты подтверждают существование двух метастабильных состояний, возникающих у растений под действием факторов разной интенсивности. Для объяснения используют гипотезу о наличии «триггерной» системы восстановления. Под биологическим триггером понимается возможность перехода клетки из одного состояния в другое [14], что соответствует нескольким устойчивым стационарным состояниям системы. Управляют триггером многие факторы, в том числе метаболические изменения.

Стабильными являются нормальное и стрессированное состояние, а переход осуществляется через нестабильное состояние. Поэтому увеличение вариабельности является критерием перехода клетки от нормальной жизнедеятельности к стрессу. Для возвращения триггера в исходное состояние после его включения в биологических системах недостаточно простого приведения величины управляющего параметра к исходному уровню. Существование триггерной системы выгодно для растения. Затруднение перехода из одного состояния в другое при пороговом воздействии предохраняет клетку от «поспешных» решений [14].

На растения действовали импульсным давлением (ИД) [13], возникающим при распространении ударной волны, которая создает объемное сжатие в течение 14–25 мксек. Давление влияет на поглощение воды [4], флоэмный транспорт [5], транспорт газов [1], формирование тканей [11], рост и развитие [8]. ИД усиливает рост и продуктивность растений [10].

Целью является исследование возможностей эпигенетического управления морфогенезом растений гречихи на основании выявленной зависимости физиологических особенностей и продуктивности растений от параметров ИД.

**Материалы и методы.** Семена гречихи (*Fagopyrum esculentum* Moench.) обрабатывали ИД 11, 23 и 29 МПа. При детонации взрывчатого вещества возникает ударная волна, которая передается через воду на семена и создает объемное сжатие в течение 14-25 мксек.

ИД на фронте ударной волны рассчитывали по формуле [13]:

$$P = 53,3 \cdot \left( \frac{Q^{\frac{1}{3}}}{R} \right)^{1,13} \quad (1)$$

где  $P$  – давление, МПа;  $Q$  – масса заряда взрывчатого вещества, кг;  $R$  – расстояние от центра взрыва до поверхности семян, м.

Обработку семян проводили в соответствии со схемой, приведенной на рис. 1. На дно контейнера из нержавеющей стали (1) укладывали порононовые кассеты (2) с сухими семенами (3), закрытыми сетчатым материалом. Контейнер (1) заполняли водой (4). В контейнере под водой закрепляли водостойкое взрывчатое вещество (5) с массой  $Q$  на расстоянии  $R$  от поверхности семян в соответствии с формулой (3). Толщина слоя воды над поверхностью семян составляла 7-13 см. Затем производили детонацию взрывчатого вещества при помощи электродетонатора (7). В каждой кассете находилось до 500 г семян, что являлось одной повторностью для всех нижеизложенных экспериментов.



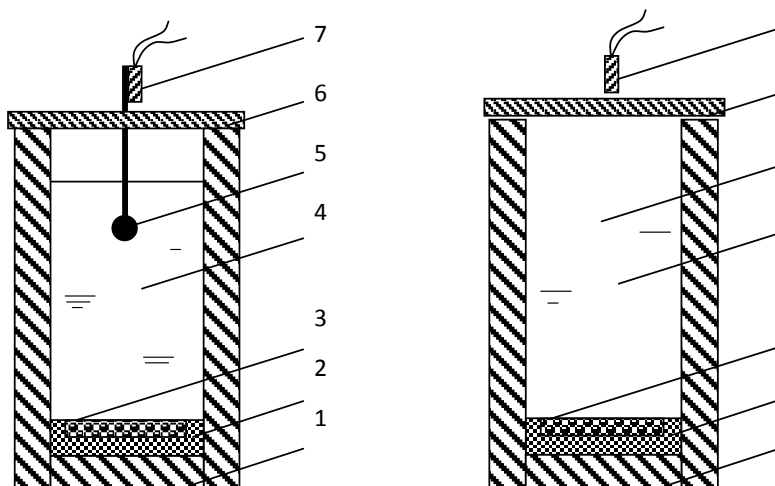


Рис. 1. Схема устройства для обработки семян ИД. Обозначения см. в тексте

После обработки семена высушивали в течение 24 час при комнатной температуре до воздушно-сухого состояния. Контрольные семена замачивали в воде в течение времени, соответствовавшего продолжительности пребывания в воде семян при обработке ИД, и подсушивали. Способ обработки семян запатентован [13]. Достоинством метода является возможность точной дозировки воздействия, учитывая его уникально малую продолжительность.

Определение всхожести проводили согласно ГОСТ 12038-84 290 «Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести». Отбирали фракцию чистых выполненных семян. Четыре-пять проб по 100 семян в каждой проращивали в кювете на влажной фильтровальной бумаге, кювету закрывали стеклом. При учете всхожести отдельно подсчитывали нормально проросшие, а также набухшие, твердые (непроросшие) семена и ненормально проросшие – невсхожие семена. За результат анализа принимали среднее арифметическое результатов определения всхожести всех проанализированных проб. Условия проращивания семян гречихи по ГОСТ 12038-84 290: температура 25 °С, темнота, время проращивания для определения всхожести – 8 сут.

Проводили исследование флуоресценции при комнатной температуре (ФКТ) [17]. Для регистрации ФКТ семена предварительно выдерживали в эксикаторе над силикагелем в течение 24 час для удаления сорбированной из воздуха воды. С плодов гречихи снимали околоплодник и определяли ФКТ (рН 3, чувствительность 5) в отн. ед. В каждом варианте использовали 3 повторности по 50 семян. Исследовали различия в варьировании ФКТ семян под действием ИД. Значения ФКТ в пределах вариационных рядов распределяли по 8 классовым интервалам: 0...4, 11...20, 21...30, 31...40, 41...50, 51...60, 61...70, свыше 70. Количество вариантов, относящихся к каждому классовому интервалу, отражали на графиках. В пределах каждого варианта опыта сравнивали друг с другом отдельные повторности по критерию  $\chi^2$ . Число степеней свободы  $n' = 7$ , критические значения критерия  $\chi^2$  составляют 14,1 ( $P = 0,05$ ); 18,5 ( $P = 0,01$ ); 22,6 ( $P = 0,002$ ).

Определяли сухую массу частей растений путем высушивания при температуре 130 °С до постоянной массы, взвешивали с точностью до 0,1 мг. Исследования проводили в четырех биологических повторностях.

Зная изменения сухой массы растений  $W$ , мг за период времени  $(t_2 - t_1)$ , сут, рассчитывали относительную скорость роста (ОСР), г·(г·сут)<sup>-1</sup>:

$$ОСР = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

Для математического описания роста использовали функцию Б. Гомпертца, позволяющую определить критические точки роста растений [9]. По эмпирическим данным (длина главного побега) строили график функции, которая представляет собой асимметричную S-образную кривую с растянутой верхней ветвью. Форма записи формулы имеет вид:

$$y = \frac{A}{10^{10^{a+bx}}}, \quad (3)$$

где  $A$  – окончательная длина побега, см;  $x$  – время, прошедшее с начала роста, сут;  $a$  и  $b$  – константы, определяющие форму кривой,  $y$  – высота растений в момент времени  $x$ .

После этого расчета определяли скорость роста как производную  $y'$ :

$$y' = \frac{b}{(\lg e)^2} \cdot \lg \frac{y}{A} \cdot y \quad (4)$$

На графиках, приведенных в работе, указаны эмпирические значения – средние арифметические и их стандартные ошибки, а также теоретические кривые роста и скорости роста, рассчитанные по формулам (3) и (4).

Исследовали структуру урожая растений. Проводили мелкоделяночные опыты на площади  $10 \text{ м}^2$  в 4-кратной повторности. Семена сеяли, определив предварительно массу семян, которая должна быть высеяна на  $1 \text{ м}^2$  с тем расчетом, чтобы на этой площади было заданное число всхожих семян. Поскольку ИД оказывает влияние на всхожесть семян, выравнивали посеы по количеству всхожих семян (200 растений на  $1 \text{ м}^2$ ). После определения лабораторной и полевой всхожести семян рассчитывали норму высева во всех вариантах опыта. На  $1 \text{ м}^2$  деланки размером  $1 \text{ м} \times 10 \text{ м}$  длина ряда была  $1 \text{ м}$ , расстояние между соседними рядами –  $15 \text{ см}$  (рядовой способ посева), в длину располагалось 70 рядов. Если всхожесть семян в опыте не отличалась достоверно от контроля, норму высева не увеличивали.

**Результаты и обсуждение.** Результаты, полученные при многолетних исследованиях всхожести семян гречихи, позволили выявить закономерности, касающиеся реакции семян разного физиологического состояния на ИД (рис. 2).

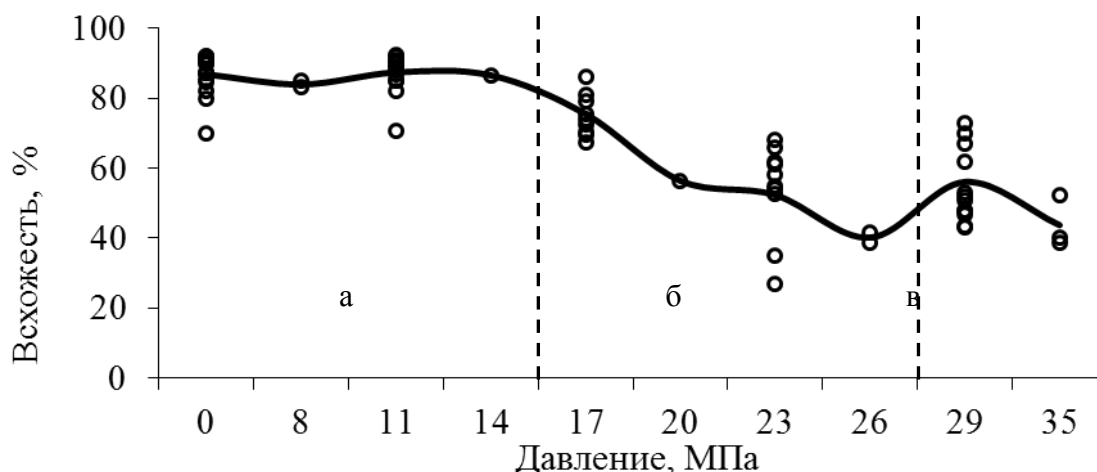


Рис. 2. Изменение всхожести семян гречихи под влиянием ИД. Обозначения см. в тексте

На рис. 2 показано, что у семян была обнаружена немонотонная зависимость: всхожесть не изменялась в интервале 0-14 МПа (рис. 2, а), затем закономерно убывала в диапазоне ИД 17-26 МПа (рис. 2, б), причем при 23 МПа были выявлены значительные колебания. При ИД 29-35 МПа (рис. 2, в) амплитуда колебаний снижалась, а всхожесть даже

несколько увеличивалась при 29 МПа. При экстремально высоких давлениях не удалось добиться 100 % гибели всех семян. Аналогичные данные характерны для действия ионизирующей радиации на семена [7].

Колебания всхожести гречихи при ИД 23 МПа указывало на их переход в нестабильное состояние, а дальнейшее снижение амплитуды этих колебаний свидетельствовало о переходе в качественно иное состояние – стресс [14].

Для выявления причин снижения всхожести было проведено исследование флуоресценции при комнатной температуре (ФКТ) семян гречихи.

Коэффициент корреляции между всхожестью и ФКТ составляет  $-0,94 \div -0,98$  [17]. В партиях выделяют 3 фракции по мере возрастания ФКТ (I – семена, из которых вырастают нормальные проростки, II – семена, из которых вырастают проростки с морфологическими дефектами, III – преимущественно мертвые семена). Величина ФКТ обратно пропорциональна влажности семян (табл. 1).

Таблица 1

## Соответствие ФКТ и влажности семян гречихи

Интервал по ФКТ	5-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	свыше 70
Влажность, %	7,50 ÷ 6,65	6,61 ÷ 6,56	6,55 ÷ 6,30	6,26 ÷ 6,18	6,15 ÷ 5,14	5,10 ÷ 4,50	4,65 ÷ 4,23	4,24 ÷ 4,17

Результаты исследования влияния ИД на ФКТ семян гречихи приведены на рис. 3. Распределение в контроле (рис. 3, кривая 1) имело вид кривой с двумя максимумами (5...10 и 31...40 отн. ед.), которым соответствовали семена I и II фракций.

Распределение при ИД 11 МПа (рис. 3, кривая 2) по  $\chi^2$  соответствовало контролю, однако в этом варианте несколько уменьшилось количество семян II фракции. Показано [17], что увеличить всхожесть можно только за счет живых семян, присутствующих в партии, но не мертвых. В частности, это могут быть семена, образующие дефектные проростки, не считающиеся всхожими по стандартам.

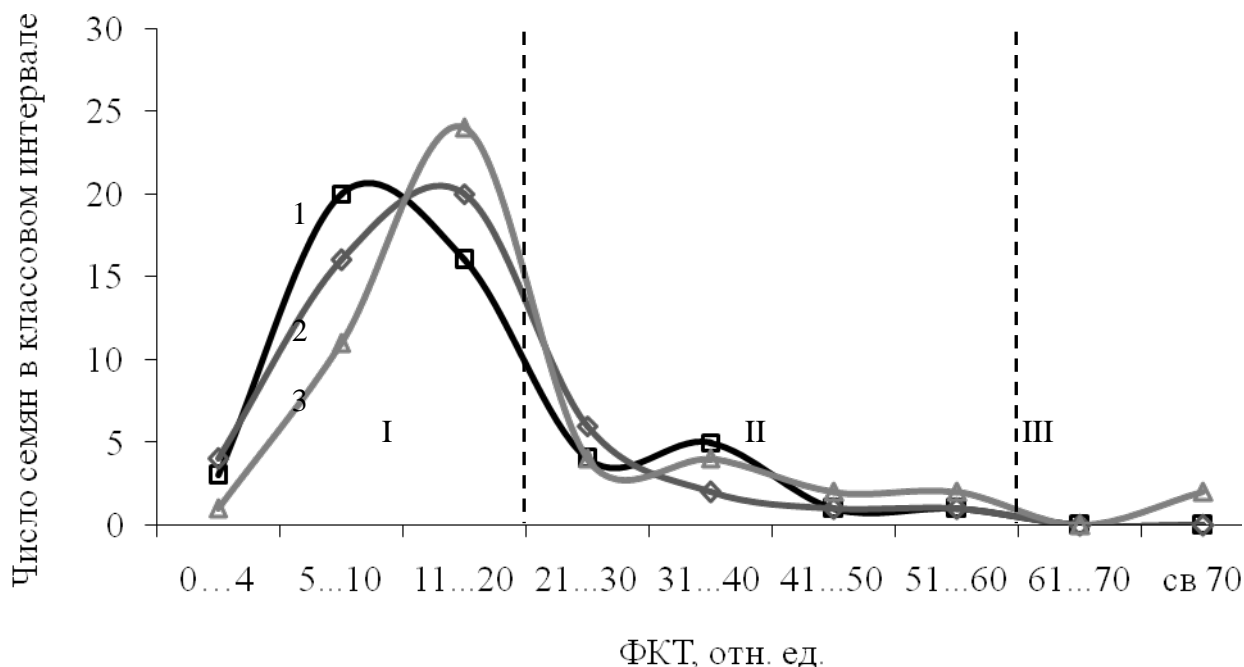


Рис. 3. Распределение семян гречихи по ФКТ: 1 – контроль, 2 – 11 МПа, 3 – 29 МПа

Известно, что под действием большинства стимуляторов в дозах, увеличивающих всхожесть, часть семян фракции II переходила во фракцию I. Эти семена были названы «улучшенными» [17]. При действии ИД 11 МПа, действительно, был возможен подобный переход. На него указывали уменьшение количества семян II фракции и смещение вправо пика, соответствующего I фракции (рис. 3, кривая 2). Данное явление подтверждается незначительным увеличением всхожести семян при действии ИД 11 МПа (рис. 2), особенно выраженное, по наблюдениям, в партиях со сниженной всхожестью.

Распределение ФКТ семян, обработанных ИД 29 МПа (рис. 3, кривая 3) по критерию  $\chi^2$  отличалось от контроля, поскольку обнаружено смещение главных пиков вправо. Количество мертвых семян (ФКТ свыше 61 отн. ед.) в этом варианте увеличилось незначительно, следовательно, снижение всхожести было связано с переходом семян из фракции I во фракцию II, из семян которых вырастали морфологически дефектные проростки, причем способность этих семян к прорастанию зависела от степени благоприятности условий среды.

При старении семена перемещаются из фракции I во фракцию II, и затем во фракцию III, утрачивая всхожесть [17]. При действии ИД семена не теряли способности к прорастанию согласно изменениям ФКТ, следовательно, ИД не приводило к острой летальности. Однако рост зародышей и формирование проростка протекали иначе, чем в контроле (рис. 4). В контроле ФКТ и габитус проростка соответствовали. При ИД 11 МПа из части семян II фракции сформировались нормальные проростки (рис. 4). При ИД 29 МПа обнаружено торможение роста проростков не только во II фракции, но даже в I фракции. Несоответствие ФКТ и вида проростков – следствие активации роста проростков, образовавшихся из семян II фракции при ИД 11 МПа и торможения роста проростков этой же фракции при ИД 29 МПа. Следовательно, наиболее чувствительными к воздействию являлись семена II фракции, причем их реакция зависела от дозы воздействия и соответствовала сценариям гормезиса (общей стимуляции) при ИД 11 МПа и стресса при ИД 29 МПа.



Рис. 4. Внешний вид проростков в соответствии с ФКТ семян: 1 – контроль, 2 – ИД 11 МПа, 3 – ИД 29 МПа

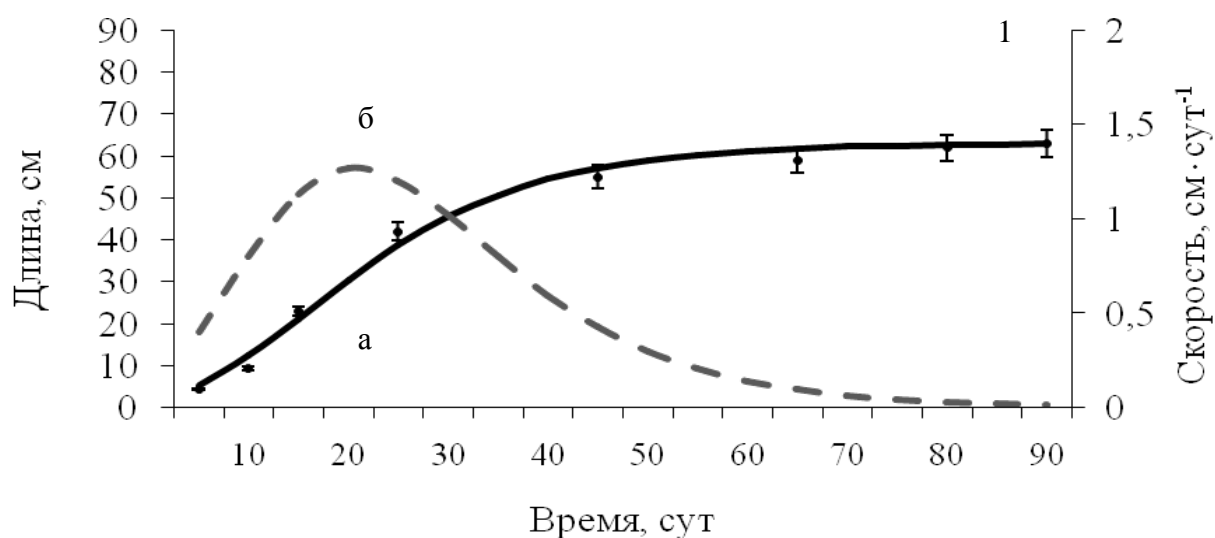
Изменение ФКТ и «улучшение» семян – явление преходящее, связанное с ускорением старения и накоплением повреждений [17]. Несоответствие ФКТ и внешнего вида проростков – следствие того, что при ИД развивается реакция, связанная с изменением ростовых процессов. Под действием фактора в значимых дозах организм переходит в кратковременное нестабильное состояние, после чего или возвращается на прежний уровень жизнедеятельности, или переходит в особое устойчивое состояние – стресс. Видимо, при ИД 11 МПа развитие событий происходило в целом по первому варианту, но для компенсации повреждений происходила активация роста, причем наибольшую чувствительность проявили семена II фракции, где эффект стимуляции выглядел особенно четко. При ИД 29 МПа у проростков происходил переход к стрессу, сопровождавшийся торможением роста,



который известен при различных воздействиях в стрессовых дозах [17;14]. Следовательно, изменение всхожести семян под влиянием ИД было связано с изменением состояния семян и ранними ростовыми процессами.

ИД оказало влияние на рост растений гречихи (рис. 5). Теоретические кривые 1 построены по эмпирическим данным, причем их соответствие находилось в пределах ошибки среднего арифметического значения (до 5 %). Теоретические кривые 2 рассчитаны как производные роста и характеризуют скорость роста растений.

На рис. 5 видно, что кривая роста была S-образной во всех вариантах опыта. Скорость роста изменялась как в ходе онтогенеза, так и в вариантах опыта. Наибольшая скорость роста обнаружена в фазу бутонизации, что характерно для гречихи. Отметим важную закономерность: высота растений и скорость роста при ИД 11 МПа (рис. 5, 2) были существенно выше, чем в контроле (рис. 5, 1), но были похожи по форме. При ИД 29 МПа (рис. 5, 3) скорость роста снижалась, но после достижения максимума затухала медленно, поэтому у кривой отсутствовало плато. Следовательно, действие ИД 11 МПа привело к активизации роста стебля и накоплению в нем ассимилятов – созданию резерва, пластические вещества которого по мере необходимости могут быть израсходованы. Напротив, при действии высокой дозы ИД питательные вещества экономно расходовались на рост стебля, но такой медленный рост продолжался в течение всего онтогенеза, за счет чего к завершению онтогенеза высота растений оказалась больше, чем в контроле.



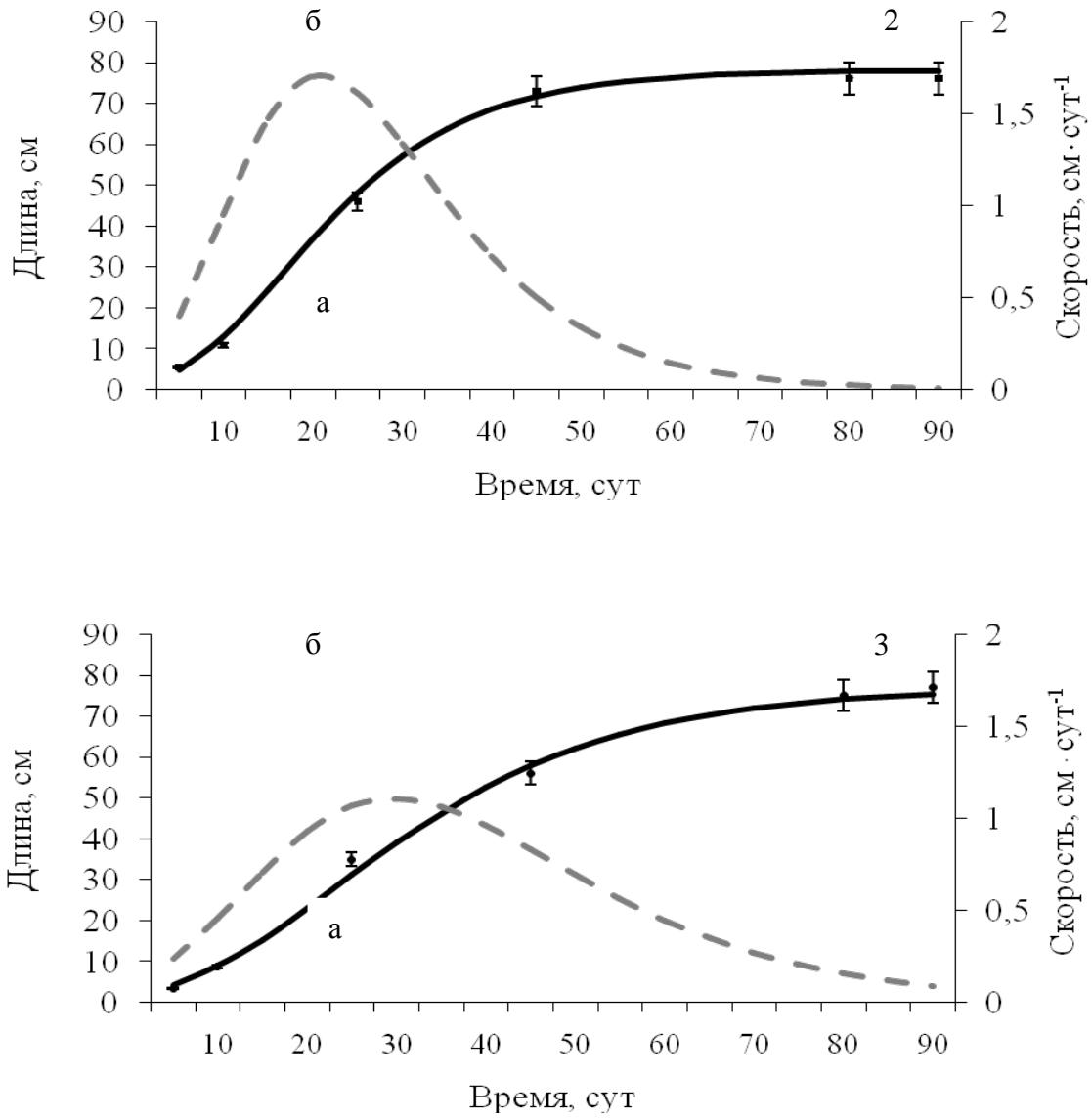


Рис. 5. Действие ИД на рост побега гречихи в длину: 1 – контроль, 2 – 11 МПа, 3 – 29 МПа; а – длина побега, б – скорость роста

Важным аспектом формирования урожая является накопление сухого вещества растением вследствие ассимиляции при фотосинтезе и диссимиляции при дыхании. В многочисленных работах показано влияние различных факторов на интенсивность дыхания и фотосинтеза.

Одним из ключевых признаков, отличающих виды растений с разным типом экологической стратегии, является ОСР [6]. Рудералы характеризуются высокими значениями ОСР. Известно, что мелкосемянные дикие формы имеют преимущество перед культурными по ОСР. Величина ОСР в оптимальных условиях позволяет прогнозировать будущий урожай растений.

Как видно из рис. 6, при ИД 11 МПа (рис. 6, 2) увеличение сухой массы растений гречихи происходило более интенсивно, чем в контроле (рис. 6, 1), а при ИД 29 МПа (рис. 6, 3) кривая была более пологой. Максимальная относительная скорость роста (ОСР) при ИД 11 МПа превышала контроль на 35 %, а при ИД 29 МПа – на 58 %, что могло быть одной из причин увеличения продуктивности растений.

Доля хозяйственного урожая в контроле составляла 20,35 %, при ИД 11 МПа – 20,36 %, при ИД 29 МПа – 43,16 %, следовательно, эти растения преимущественно перемещали ассимиляты в соцветия. ИД 11 МПа способствовало равномерному накоплению сухой массы, не изменялась нормальная динамика интегральных процессов – роста и распределения ассимилятов, но увеличилась их скорость, поэтому повышение урожайности было незначительным. Такую реакцию на воздействие называют гормезисом [16]. ИД 29 МПа привело к уменьшению общей сухой массы в течение онтогенеза, а увеличение массы соцветий и плодов было связано с медленным накоплением и перераспределением веществ в плоды. Исходя из изменений всхожести, эту зону можно назвать стрессовой.

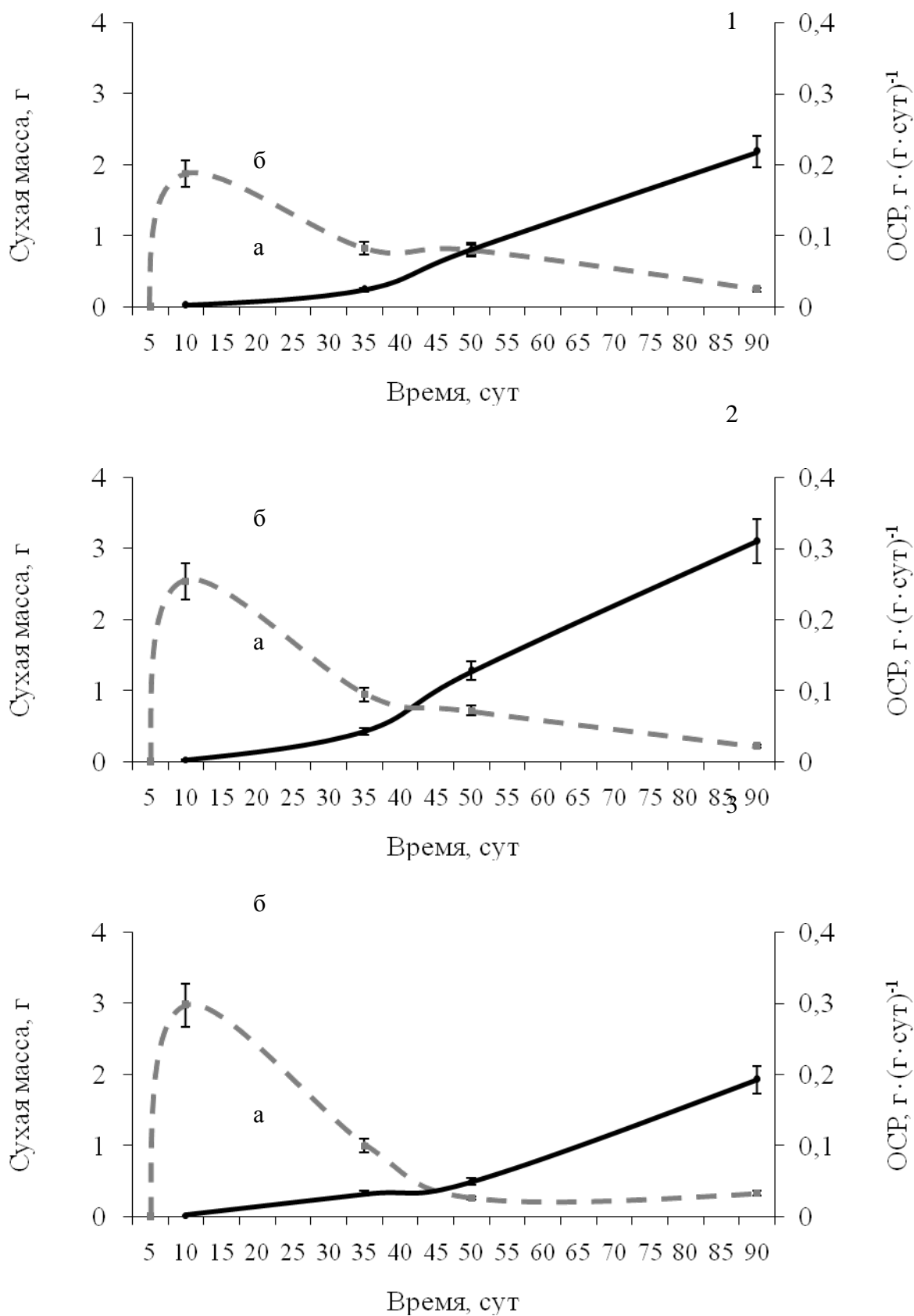


Рис. 6. Действие ИД на накопление сухой массы и относительную скорость роста (ОСР) гречихи: 1 – контроль; 2 – 11 МПа; 3 – 29 МПа; а – сухая масса; б – ОСР

В течение 15 лет выявлены особенности формирования урожая у растений после обработки семян ИД (рис. 7). Продуктивность растений на рис. 7 выражена как количество плодов в процентах от контроля, поскольку ее абсолютные значения различались в течение лет, что в большей степени зависело от погодных условий, качества семян и прочих факторов, а относительные значения, выраженные в процентах от контроля, лучше характеризовали влияние ИД.

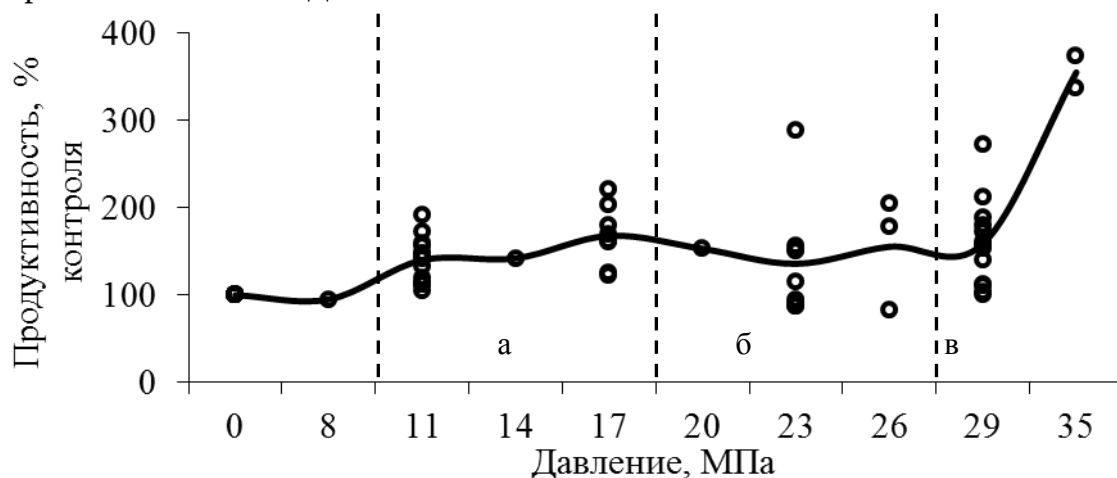


Рис. 7. Изменение продуктивности растений гречихи под влиянием ИД. Обозначения см. в тексте

Масса 1000 плодов изменялась незначительно, поэтому количество вызревших плодов на растении было пропорционально их массе. При ИД 8 МПа продуктивность не изменялась, при ИД 11–20 МПа увеличивалась на 15–60 %, при ИД 29–35 МПа возрастала в 1,5–3,5 раза. При ИД 23–26 МПа у продуктивности, как и всхожести, увеличивалась вариабельность, что характерно для перехода из одного стабильного состояния в другое [14].

При действии малых и больших ИД реализуются разные стратегии адаптации. У животных и растений существуют различные стратегии адаптации к стрессорам. Для растений общепринятой (хотя и не единственной) является концепция экологических «стратегий» Раменского-Грайма [15, 6] – одно из крупных обобщений экологии и физиологии растений. Различия между растениями определяются скоростью их роста, а рост – интегративный процесс, связанный с накоплением, перераспределением, расходом и запасанием питательных веществ. Изменения окружающей среды могут иметь периодический катастрофический характер (пожары, механические повреждения, поедание животными) – первый тип; или относительно постоянный неблагоприятный характер (водный дефицит, затенение и проч.) – второй тип.

Авторы [15] выделяют три группы растений, между которыми есть промежуточные формы или виды, проявляющие признаки нескольких групп:

1 – конкуренты (*Artemisia absinthium* L. – полынь горькая). Крупные растения с высокой скоростью роста. Образуют густой полог, формируют корневую систему с большой поверхностью. Обитают в местах со слабой вероятностью нарушений окружающей среды первого типа (вызывают частичное или полное уничтожение растений) и низкой интенсивностью факторов второго типа (снижают скорость роста, но не повреждают растения);

2 – рудералы (*Thlaspi arvense* L. – ярутка полевая). Быстрорастущие растения небольшого размера, быстрое проходящие фазы онтогенеза с образованием большой массы плодов и семян. Встречаются в местообитаниях с частыми катастрофами и относительно стабильными условиями между ними;

3 – стресс-толеранты (*Pyrola rotundifolia* L. – грушанка круглолистная). Медленно растущие растения небольшого размера. Обитают в неблагоприятных условиях с постоянно действующими факторами второго типа. Эти растения часто специализированы (засухоустойчивые, теневыносливые, галофиты) [15].



Во-первых, растения отдельных групп отличаются по интенсивности фотосинтеза (наибольшая – у конкурентов, промежуточная величина у рудералов, наименьшая – у стресс-толерантов).

Во-вторых, биологическая продуктивность определяется не только интенсивностью фотосинтеза, но и интенсивностью дыхания. Растения с высокой интенсивностью фотосинтеза (рудералы и конкуренты) тратят больше ассимилятов на дыхание, что закономерно, причем они отличаются также высокой скоростью роста. Стресс-толеранты осуществляют более экономный обмен веществ: мало ассимилируют, но и мало тратят и медленно растут. Зависимость скорости роста от интенсивности дыхания определяется потреблением энергии образовательными тканями – меристемами.

В третьих, растения по-разному распределяют ассимиляты. Наибольшую массу и поверхность листьев формируют конкуренты и рудералы, у них же большая часть пластических веществ остается в побеге, участвует в формировании стебля, а также генеративных органов, плодов и семян. Активность меристем у стресс-толерантов лимитируется невысокой интенсивностью дыхания, они, в частности, формируют мало цветков и плодов. У этих растений преобладает вегетативное размножение, более выгодное при постоянном действии неблагоприятных факторов, чем семенное размножение. У конкурентов основными потребителями являются меристемы, формирующие вегетативную массу, у рудералов – цветки и плоды, у стресс-толерантов – запасные ткани и части, специализированные для вегетативного размножения.

Не вызывает сомнения эволюционно сформированная программа стресс-реакции, поэтому можно предположить, что у ряда растений при действии отдельных доз возмущающих факторов могут наблюдаться изменения, сходные с адаптациями, характерными для видов, приспособленных к определенным условиям обитания. Если предположить, что в реакции на целостном уровне можно выделить некоторые типы, то они должны иметь сходство с экологическими стратегиями адаптации растений.

Поскольку дозовые зависимости физиологических процессов растений от величины ИД немонотонны, и можно выделить переходную область, следует считать реакцию растений гречихи на ИД 11 МПа и 29 МПа принципиально различными.

Реакция растений на ИД 11 МПа заключается в усилении вегетативного роста (рис. 5, 6). Следовательно, растения гречихи, обработанные ИД 11 МПа, по комплексу признаков напоминают растения-конкуренты, быстро захватывающие пространство за счет развития вегетативных органов.

Напротив, при ИД 29 МПа вегетативный рост заторможен (рис. 5, 6), а для сохранения вида растения формируют большую массу семян (рис. 7), подобно стресс-толерантам.

Таким образом, видны две принципиально различные стратегии повышения продуктивности растений под действием ИД. Слабые дозы (11 МПа) нелетальны, приводят к общему усилению жизнедеятельности и повышению продуктивности на 14-30% в разные годы. Доля хозяйственного урожая, т.е. процент накопленного в плодах сухого вещества от массы общего сухого вещества, соответствует контролю. Высокие дозы (29 МПа) приводят к гибели до 50 % семян (рис. 2), а у выживших растений, наряду с изменением метаболизма, в частности усилением дыхания, изменяются отношения между донорами и акцепторами. Растение накапливает меньше сухого вещества, а в фазе цветения и плодоношения мобилизует резервы для формирования урожая. Величина хозяйственного урожая возрастает при ИД 29 МПа более чем в два раза по сравнению с контролем. Видимо, этот феномен призван обеспечить выживание не отдельного растения, а вида, поэтому увеличение продуктивности является более существенным – до нескольких раз.

**Заключение.** В работе теоретически обосновано и экспериментально доказано, что ИД в интервале 11–29 МПа не приводит к острой летальности, определяемой по уровню ФКТ, и элиминации малопродуктивных особей, но способствует стимулированию физиологических процессов в семенах и растениях, ведущих к увеличению урожая.

Путем анализа и обобщения экспериментальных данных обнаружены немонотонные изменения интегральных характеристик организменного уровня организации – всхожести, роста, накопления ассимилятов, а также продуктивности растений, позволившие выявить в

дозовой зависимости зону общей стимуляции – гормезиса (11–20 МПа), переходную (20–26 МПа) и стрессовую (29–35 МПа) зоны.

На основе детального анализа экспериментальных данных показано, что при гормезисе при действии ИД 11–20 МПа происходит увеличение продуктивности растений на 15–25 % в результате активизации физиологических процессов без изменения динамики. В стрессовом состоянии под действием ИД 29–35 МПа обнаружено нарушение нормальной динамики физиологических процессов растений, приводящее к торможению роста и изменению донорно-акцепторных отношений с преимущественным оттоком ассимилятов в плоды, приводящее к 2–3-кратному увеличению продуктивности. Доказано, что увеличение вариабельности признаков на целостном уровне при ИД 20–26 МПа соответствует переходному состоянию от гормезиса к стрессу.

#### **Примечания:**

1. Эльпинер И.Е. Биофизика ультразвука. М.: Наука, 1973. 384 с.
2. Савин В.Н. Действие ионизирующего излучения на целостный растительный организм. М.: Энергоиздат, 1981. 120 с.
3. Borodin I. Using the Effect of Photoinduced Variability of Optical Properties of the Chlorophyll-containing Tissues for Diagnosing the Functional State of Plants / I. Borodin, A. Budagovskii, O. Budagovskaya, I. Budagovskii, Y. Sudnik // *Russian Agricultural Sciences*. 2008. Vol. 34, № 5. P. 357.
4. Кузин А.М. Идеи радиационного гормезиса в атомном веке. М.: Наука, 1995. 158 с.
5. Новицкий Ю.И. Реакция растений на магнитные поля // Реакция биологических систем на магнитные поля: под ред. Ю. А. Холодова М.: Наука, 1987. С. 117-130.
6. Патент RU № 2083073, 10.07.1997. Способ предпосевной обработки семян с.-х. культур. Э.С. Атрощенко [и др.]. Б.И. 1997. № 19.
7. Felix G. Sensing of Osmotic Pressure Changes in Tomato Cells / G. Felix, M. Regenass, T. Boller // *Plant Physiol*. 2000. Vol. 124, № 3. P. 1169–1180.
8. Fensom D.S. Tandem Moving Pressure Wave Mechanism for Phloem Translocation / D. S. Fensom, R. G. Tompson, C. D. Caldwell // *Fisiol.Rast. (Moscow)*. 1994. Vol. 41. P. 138-145 (Russ. J. Plant Physiol., Engl. transl.).
9. Afreen F. Pressure gradients along whole culms and leaf sheaths, and other aspects of humidity-induced gas transport in *Phragmites australis* / F. Afreen, S. M. A. Zobayed, J. Armstrong, W. Armstrong. *Journal of Experimental Botany*. 2007. 58. P. 1651-1662.
10. Nefedieva E.E. Influence of Impulse Pressure on Vascular Tissues and Productivity of Buckwheat Plants / E.E. Nefedieva, J.A. da Silva Teixeira // *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: advances and topical issues (1st Edition)* / Ed. J.A. Teixeira da Silva. England-Japan: Global Science Books, 2006. P. 44-51.
11. Kwiatkowska D. Flower primordium formation at the Arabidopsis shoot apex: quantitative analysis of surface geometry and growth // *Journal of Experimental Botany*. 2006. Vol. 57, No. 3. P. 571-580.
12. Нефедьева Е.Э. Давление как фактор регуляции у растений: моногр. / Е.Э. Нефедьева, В.И. Лысак. Волгоград: изд-во ВолгГТУ, 2009. 188 с.
13. Veselova T.V. Assessment of Individual Seed Vigor and Seed Lot Heterogeneity by Room Temperature Phosphorescence // *Seed Science and Technology*. 2002. Vol. 30, No. 1. P. 187-196.
14. Veselova T.V. Mathematical Modeling of Accelerated Seed Ageing / T.V. Veselova, V.A. Veselovskii, A.G. Kolupaev, E.A. Leonova, D.S. Chernavskii // *Biophysics*. 1999. Vol. 44, No. 3. P. 516-517.
15. Lane, D.A. 2001. HyperStat Online Textbook. Davidmlane.com. <http://davidmlane.com/hyperstat/index.html>.
16. P'yankov V.I. Assimilate Transport and Partitioning in Middle Ural Plants Differing in Their Ecological Strategies / P'yankov V.I., Yashkov M.Yu., Reshetova E.A., Gangardt A.A. // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2000. Vol. 47. № 1. P. 1-9.
17. Grime J.P. The C-S-R model of primary plant strategies-origins, implications and tests // Gottlieb LD, Jain S, eds. *Evolutionary plant biology*. London: Chapman & Hall, 1988. P.371-393.
18. Plant stress: a biophysical approach. / Veselovskii VA, Veselova TV, Chernavskii DS. // *FizioL Rasl. (Moscow)*. 1993. Vol. 40, P. 553-557 (Russ. J. Plant Physiol, Engl. Transl.).

**References:**

1. Afreen F. Pressure gradients along whole culms and leaf sheaths, and other aspects of humidity-induced gas transport in *Phragmites australis* / F. Afreen, S. M. A. Zobayed, J. Armstrong, W. Armstrong. *Journal of Experimental Botany*. 2007. 58. P. 1651-1662.
2. Borodin I., Budagovskii A., Budagovskaya O., Budagovskii I., Sudnik Y. Using the Effect of Photoinduced Variability of Optical Properties of the Chlorophyll-containing Tissues for Diagnosing the Functional State of Plants // *Russian Agricultural Sciences*. – 2008. – Vol. 34, No. 5. – P. 357.
3. El'piner I.E. *Biofizika ul'trazvuka*. M.: Nauka, 1973. 384 s.
4. Felix G. Sensing of Osmotic Pressure Changes in Tomato Cells / G. Felix, M. Regensass, T. Boller // *Plant Physiol*. 2000. Vol. 124, № 3. P. 1169–1180.
5. Fensom D.S. Tandem Moving Pressure Wave Mechanism for Phloem Translocation / D. S. Fensom, R. G. Tompson, C. D. Caldwell // *Fisiol.Rast. (Moscow)*. 1994. Vol. 41. P. 138-145 (Russ. J. Plant Physiol., Engl. transl.).
6. Grime J.P. The C-S-R model of primary plant strategies-origins, implications and tests // Gottlieb LD, Jain S, eds. *Evolutionary plant biology*. London: Chapman & Hall, 1988. P.371-393.
7. Kuzin A.M. *Idei radiatsionnogo gormezisa v atomnom veke*. M.: Nauka, 1995. 158 s.
8. Kwiatkowska D. Flower primordium formation at the *Arabidopsis* shoot apex: quantitative analysis of surface geometry and growth // *Journal of Experimental Botany*. 2006. Vol. 57, No. 3. P. 571-580.
9. Lane, D.A. 2001. *Hyper Stat Online Textbook*. Davidmlane.com. <http://davidmlane.com/hyperstat/index.html>.
10. Nefed'eva E.E. *Davlenie kak faktor regulyatsii u rastenii: monogr.* / E.E. Nefed'eva, V.I. Lysak. Volgograd: izd-vo VolgGTU, 2009. 188 s.
11. Nefedieva, E.E. Influence of Impulse Pressure on Vascular Tissues and Productivity of Buckwheat Plants / E.E. Nefedieva, J.A. da Silva Teixeira // *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: advances and topical issues (1<sup>st</sup> Edition)* / Ed. J.A. Teixeira da Silva. England Japan: Global Science Books, 2006. P. 44-51.
12. Novitskii Yu.I. *Reaktsiya rastenii na magnitnye polya* // *Reaktsiya biologicheskikh sistem na magnitnye polya : pod red. Yu. A. Kholodova* M.: Nauka, 1987. S. 117-130.
13. Patent RU № 2083073, 10.07.1997. *Sposob predposevnoi obrabotki semyan s.-kh. kul'tur*. E.S. Atroshchenko [i dr.]. B.I. 1997. № 19.
14. *Plant stress: a biophysical approach.* / Veselovskii VA, Veselova TV, Chernavskii DS. // *FizioL Rasl. (Moscow)*. 1993. Vol. 40, P. 553-557 (Russ. J. Plant Physiol, Engl. Transl.).
15. P'yankov V.I. *Assimilate Transport and Partitioning in Middle Ural Plants Differing in Their Ecological Strategies* / P'yankov V.I., Yashkov M.Yu., Reshetova E.A., Gangardt A.A. // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2000. Vol. 47. № 1. P. 1-9.
16. Savin V.N. *Deistvie ioniziruyushchego izlucheniya na tselostnyi rastitel'nyi organizm*. M.: Energoizdat, 1981. 120 s.
17. Veselova T.V. *Assessment of Individual Seed Vigor and Seed Lot Heterogeneity by Room Temperature Phosphorescence* // *Seed Science and Technilogy*. 2002. Vol. 30, No. 1. P. 187-196.
18. Veselova T.V. *Mathematical Modeling of Accelerated Seed Ageing* / T.V. Veselova, V.A. Veselovskii, A.G. Kolupaev, E.A. Leonova, D.S. Chernavskii // *Biophysics*. 1999. Vol. 44, No. 3. P. 516-517.

УДК 581.1:631.531.027.3:631.559:581.143

**Влияние импульсного давления на качество семян и урожай растений гречихи (*Fagopyrum esculentum Moench.*)**

<sup>1</sup> Елена Эдуардовна Нефедьева

<sup>2</sup> Татьяна Владимировна Веселова

<sup>3</sup> Владимир Александрович Веселовский

<sup>4</sup> Владимир Ильич Лысак

<sup>1</sup> Волгоградский государственный технический университет, Россия

доктор биологических наук, доцент

400005, Волгоград, пр. им. Ленина, 28

E-mail: nefedieva@rambler.ru

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия

Старший научный сотрудник кафедры биофизики, доктор биологических наук

119991, Москва, ГСП-2, Воробьевы горы.

<sup>3</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия

Ведущий научный сотрудник кафедры биофизики, доктор биологических наук

119991, Москва, ГСП-2, Воробьевы горы.

<sup>4</sup> Волгоградский государственный технический университет, Россия

Член-корреспондент РАН, профессор, доктор технических наук

400005, Волгоград, пр. им. Ленина, 28.

E-mail: lysak@vstu.ru.

**Аннотация.** Предложен метод предпосевной обработки семян ИД, отличающийся высокой интенсивностью и точностью дозирования. ИД в интервале 3–35 МПа не приводит к острой летальности, определяемой по уровню флуоресценции при комнатной температуре, и элиминации малопродуктивных особей, но способствует стимулированию физиологических процессов в семенах и растениях, ведущих к увеличению урожая. Обнаружены немонотонные изменения всхожести, роста, распределения веществ и продуктивности растений, позволившие выявить в дозовой зависимости зону общей стимуляции – гормезиса (3–20 МПа), переходную (20–26 МПа) и стрессовую (29–35 МПа) зоны.

**Ключевые слова:** *Fagopyrum esculentum* Moench.; стресс у растений; флуоресценция при комнатной температуре; прорастание семян; рост.

ISSN: 2310-6255

Founder: Academic Publishing House *Researcher*

DOI: 10.13187/issn.2310-6255

Has been issued since 2013.

**European Journal of Molecular Biotechnology**



UDC 616.72-018.3 : 577.3

## **Growth Factor Technologies in Cartilage Tissue Engineering (Review)**

Valery V. Novochadov

Volgograd State University, Russian Federation  
Universitetskiy Avenue 100, Volgograd city, 400062  
MD, Professor  
E-mail: novovv@rambler.ru

**Abstract.** The article presents a systematic review of literature analyzing the prevalence, base technologies, and perspective directions of growth factor usage in cartilage tissue engineering. The main attention is given to problems of combinations of growth factors in modern scaffolds for cellular settlement and options for mechanical and physical-chemical stimulation of chondrogenesis, including the use of bioreactors.

**Keywords:** cartilage; tissue engineering; scaffolds; transforming growth factor  $\beta$ ; bone morphogenetic proteins; insulin-like growth factor-1; platelet-derived growth factor.

**Introduction.** The restoration of damaged and lost tissue in articular cartilage refers to serious problems of modern regenerative medicine. This is based on well defined complex of biological and social reasons [1, 2]: initially low capacity of the articular cartilage to regeneration (1); the increase of duration and quality of life resulting in rapid growth of the elderly person number with the need for an active lifestyle (2); the «traumatic» epidemic due to expansion of technologies in all spheres of professional activity and everyday life, as well as calls to extremism (3). As a result, we have a huge volume of recovery procedures on the joints – more than 6 million a year in the USA alone, about the same in the EU, about 250 thousand in Russia [3].

In current situation, the classical approaches, based on autologous chondrocyte transplantation (ACT) or the stimulation of regenerating potential of own cartilage, cannot satisfy the experts. These methods have a number of serious limitations and impairments, and they do not provide an adequate restoration of joint function for a long time [2, 4, 5]. The new «gold standard» in this area aims to become the tissue engineering. To realize this approach anyone must perform the selection, managed proliferation, and differentiation of the most promising cellular pool for tissue reconstruction, and develop the design of the most effective conditions for the subsequent remodeling of the implant into authentic tissue with valuable functional abilities [4, 6, 7].

Despite certain difficulties in situ, and the relatively high cost, the use of growth factors as stimulators for remodeling tissue-engineering constructs is considered to be one of the key moments of providing clinical success of cartilage tissue engineering [8, 9]. Based on the systematization of current world literature we considered it appropriate to conduct a comparative analysis of the growth factors usage in tissue-engineered technologies for the articular cartilage restoration and show the main trends in development of this direction of regenerative biomedicine.

**Materials and Methods.** The main sources for systematization and synthesis of information, were accepted from the open database Pubmedcentral (NCBI, NIH, USA), mainly for the period of the last five years. In some cases we used the key monographs on the problem, data from resource Elibrary.ru (Russia), as well as the results of our research in collaboration with prof. D.A. Malanin



(Volgograd State Medical University, Russia). In the end, we tested and annotated research on the application of transforming growth factor (TGF 1, TGF (2), bone morphogenetic protein (BMP-2, BMP-7), basic fibroblast growth factor (FGF-2), insulin-like growth factor (IGF-1), platelet-derived growth factor (PDGF), and some other signal molecules.

Concepts and common approaches to cartilage tissue engineering. Modern tissue engineering (in conjunction with cellular technologies in regenerative medicine), is the interdisciplinary scientific area, which has behind it a little more than 20 years of development. It is based on the principles, methods, advanced achievements of engineering, materials science, chemistry, biology, and bioinformatics to restore, support, and enhancing the functions of damaged tissues by applying biomimetic agents in it [9, 10].

Fundamental work in cartilage tissue engineering belong J.Vacanti and colleagues from Boston (USA), who grow the chondrocytes on polylactide scaffold for the closure of osteochondral defects in flopping joint of pigeons [11]. The ability to organotypical reimbursement of large defects, particularly of difficult shape and varying in depth of the lesion, are the most valuable for the Clinicians using the tissue engineering approaches. This approach can provide earlier, reliable and lasting recovery of the articular surface [2, 7]

The concept of cartilage tissue engineering is based on the idea about the healing of cartilage defects to be constructed on the principles of ensuring sufficient number of phenotypically complete chondrocytes, capable of remodeling temporary artificial media (scaffold) to a natural matrix of hyaline cartilage. Optimal management of this process should combine the stimuli including of the structural properties of scaffold, signalling molecules, and physical and chemical impacts [7, 8].

Ultimately, we need to correctly seed the active chondrocytes into three-dimensional structures and gradually replace scaffold matter with natural cartilage matrix. Such implants (tissue engineering construct) may be precultured in a bioreactor before setting into a joint (fig. 1).

To compare and discuss in detail different sources of cells for cartilage tissue engineering is not a goal of this review, therefore, we confine ourselves to the facts, which are crucial for understanding the action of growth factors to cells in tissue-engineered constructs.

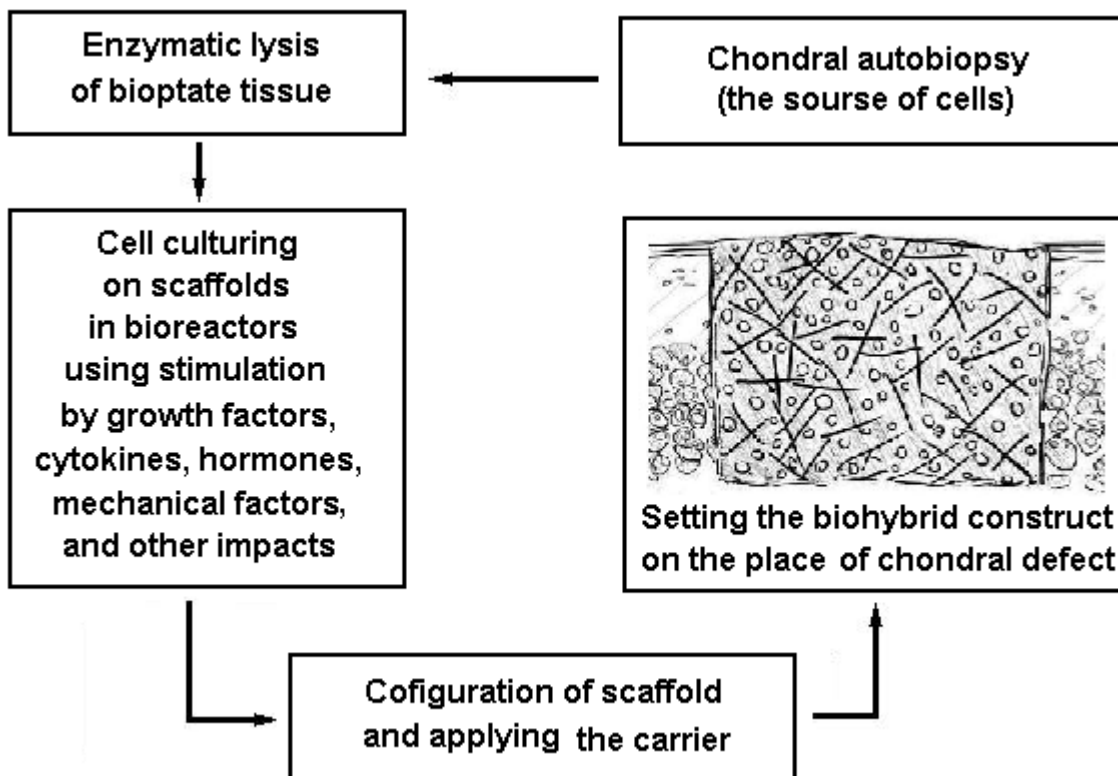


Fig. 1. Common scheme of tissue engineering, shown on the example of autologous chondrocyte pre-culturing in vitro

To date, of the many cell sources for cartilage tissue engineering, the ACI technology was mostly used in clinical practice. It based on transfer of own chondrocytes from the same joint or other chondral tissues of person to place of chondral defect [2, 12]. The ability to product collagen type II, proteoglycans, sulfated glycosaminoglycans, matrix metalloproteinases (MMP) and their tissue inhibitors (TIMP) seems to be a key phenotypic signs of chondrocytes that determined their successful participation in the tissue-engineered constructs. Unfortunately, there are a number of objective limitations, as a relatively small number of chondrocytes in donor material (about 5% in the volume of tissue), fast dedifferentiation with the production of collagen type I, integrins and other signal molecules (SHC, Erk1/2), typical connective tissue [12, 13]. Just to prevent this phenomenon one applies the main components of bioengineering technologies: the use of growth factors, scaffolds, and physico-chemical stimuli in a bioreactor or in vivo [2, 14].

With the same purpose a various stem cells derived from embryonic tissue, autologous mesenchymal tissues (MeSC), like bone marrow, synovial membrane, periosteum, fat, muscles, connective tissue, can be directed to chondrogenic differentiation [8, 15, 16]. The data about transdifferentiation of some mature cells of mesodermal origin (fibroblasts, adipocytes) into chongral phenotype due to culturing in the three-dimensional bioactive scaffolds were published [9, 17].

The key moment for the use of stem cells is their ability to be directed on chondral way of differentiation under the action of TGF-1, some other growth factors (BMP-2, FGF, IGF-1, PDGF) or protein components of synovial fluid [6, 9]. At the present time, the convincing results of cartilage matrix production by seated stem cells after differentiation were shown at use of practically all known scaffolds for cartilage tissue engineering [7].

Three-dimensional matrices (scaffolds) for cartilage tissue engineering must have biomimetic properties, it has to be biocompatible, have adequate physical and chemical characteristics and, ideally, completely replaced by auto-self chongral tissues in time. Extracellular matrix (ECM) of cartilage is difficult three-dimensional network for the growth, proliferation and differentiation of cells with nanofibers amd nanopores, which formed different local microenvironment [6, 8]. The three-dimentional porous structure of acellular scaffolds is required by the metabolic needs in the neoformed tissue [7, 18]. The attention to cartilage ECM properties was actualized, once molecular signaling pathways between the mechanical effects on the cells and regulation of their differentiation with the participation of TGF- $\beta$  had been disclosed. This led to the development of technologies that met the chemical signaling management in cells due to the variation of ECM mechanical properties [19].

Scaffolds can be used for the culturing of a complete composite in bioreactors, but this approach refers to very expensive technologies, still having no broad prospects in the real sector of biomedicine. The more useful technology for scaffolds application concludes in settlement by the cells immediately before implantation, or during it [20]. Both these approaches are combined by the mechanism of the cartilage formation. It starts from the migration and setting stem and progenitor cells in scaffold matter, subsequent differentiation and synthesis of matrix de novo, as well as partial biodegradation of temporary matrix followed this.

Today, a wide range of materials used for the fabrication of scaffolds in cartilage tissue engineering, they can be divided into natural and synthetic polymers, and their hybrids. Accoring to the structural properties all scaffolds one may distinguish hydrogels, sponges and porous [6, 21, 22]. The most widely used products, annotated according to the materials of recent surveys in this area, are presented in table. 1.

Although the use of nanomaterials for scaffolds fabrication is, rather, in their infancy, they have already recognized by almost ideal imitators of cartilage ECM. Nanofibrous or nanoporous structures are formed using the procedures of electrospinning, phase separation, freeze-drying, chemical corrosion or 3D printing [7, 23]. Nanofibres are very similar in structure to most of molecules in cartilage ECM (matrix proteins and proteoglycans), therefore, they have the ability to improve the adhesion, proliferation and differentiation in implant.

To optimize these properties, several methods have been proposed, including the accession of functional groups (thiolate, acrylate, and tyramine) and the use of composites (collagen-polyacrylamide, alginate-polyacrylamide, agarose-polyethylene glycol etc) [20].

General characteristics of the growth factors in cartilage tissue engineering. Hormones and growth factors regulating the adhesion and aggregation of chondrocytes, their growth and

metabolism, were well researched since the late 60th and 70th. The use of growth factors in cartilage tissue engineering coincided with the development of scaffold technologies. As the technologies applied for different scaffolds and molecular stimulators are unique in themselves, it is impossible to imagine any complete list of these methods.

All types of connective tissue, including cartilage, are regulated by fairly stable set of growth factors, and other mediators for differentiation of cells and intercellular signaling.

Table

**Characteristics of the main materials for the scaffolds fabrication in cartilage tissue engineering**

Material	Application for tissue engineering of cartilage	
	Cells	Clinical application
Natural polysaccharides [21, 24-27]*		
Alginate, agarose	Chondrocytes MeSC, embryonic stem cells	Cartipatch® (TBF Banque de tissues, France)
Hyaluronate		HyalograftC (Fidia Advanced Biopolymers, Italy) - benzyl ether
Chitosan		BST-CarGel (Bio-Orthopaedics, Canada)
The natural proteins [6, 10, 23, 28]*		
Collagen	Autologous chondrocytes, MeSC	MACI® (Genzyme Biosurgery, США) ChondroGide (Geistlich Biomaterials, Switzerland). Novocart 3D (TETEC AG, Germany) - copolymer with chitosan CaReS® (Ars Arthro®, Germany) Sphero®Gel (Russia) - copolymer with hexosamines и uronic acid
Fibrin	Autologous chondrocytes	Tissuecol® (Baxter International Inc.)
Synthetic materials [6, 8, 24, 25]*		
Polyorganic acid and its copolymers	Almost all sources of cells	BioSeedC (Biotissue Technologies, Freiburg, Германия) - copolymer with fibrin
Polycaprolactone and polyethylene glycols		Experiments in vivo
Nanostructured materials [7, 20, 23, 29]*		
Modified polymers: gels, nanofibers or nanoporous sponges	Autologous chondrocytes, MeSC	Experiments in vivo

\* - the only elected final reports and reviews.

They collectively regulate cell proliferation, adhesion, chemotaxis, differentiation, and ECM synthesis. Growth factors are used for stimulation of transplanted chondrocytes, and (less frequently) to manage auto-self cells when acellular scaffold technologies have been applied (Fig. 2).



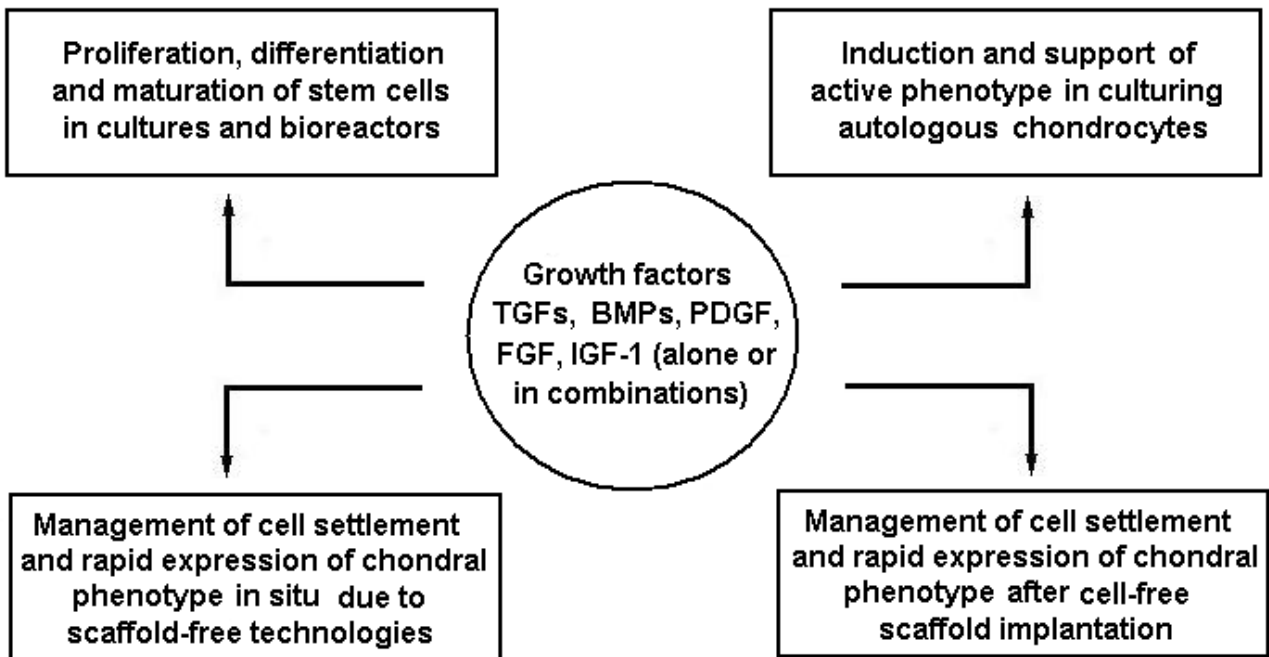


Fig. 2. Common scheme of growth factor application due to cartilage tissue engineering

General effect we achieve applying growth factors in tissue engineering, as in cell culturing for ACT, to induce and support phenotypic expression on chondral phenotype. For chondrocytes it looks like a rise of anabolic activity, an increase in the size, intensive synthesis of cartilage ECM components, and successful adhesion of cells in lamellar or three-dimensional structures [30, 31]. Transforming growth factor 1 $\beta$ , TGF 2 [32, 33, 34], BMP-2 and BMP-7 [31, 35, 36], FGF-2 [37], IGF-1 [30, 38], and PDGF [30, 39, 40] have been successfully used for chondral differentiation of MeSC, as well as for redifferentiation of autologous chondrocytes. Vascular endothelial growth factor VEGF, epidermal growth factor EGF, and hepatic growth factor HGF were investigated, but their application to the stimulation of chondrogenesis was proved unsuccessful [31].

To stimulate a culture, as a rule, it is applied not alone stimulating factor, and their combination with the optimal effect, of TGF-1 and IGF-1, TGF-1 and BMP-2, for example [41]. In vitro a variety of microspheres and microparticles have used to delivery growth factors to cells. In vivo the use of alone growth factor are more efficient, and it may be delivered as a part of hydrogels of polyethylene glycols, polilactide or soluble fibrin [32]. These approaches provide dose- and time-controlled release of growth factors in the culture medium.

From the beginning a few patterns was discovered. First, the effects of growth factors pre-administrated in a cultural medium are better than the same during their direct application in the place of transplantation. Secondly, pre-incubation with by growth factors in bulk cultures (semi-liquid and gel environment) is more effective, in comparison with their influence on single-layer cultures of chondrocytes. In addition, very low concentrations of growth factors are sufficient, the order of a few nmol/L. Any attempts to increase these concentrations in the culture medium not only do not lead to rise of chondral phenotype, but they even depress it, contributing to the formation of connective tissue matrix or cell death [15, 31].

Transforming growth factor superfamily. TGF- $\beta$  is the most studied factor used in cartilage tissue engineering. It increases the phenotypic expression of chondral cells, chondrogenic differentiation of MeSC, resulting in production of cartilage ECM macromolecules [31, 33].

Proinflammatory cytokines are strong natural antagonists of TGF- $\beta$ , therefore, in cases of their high content in tissues of active arthritis the adequate chondrogenic stimulation with TGF- $\beta$  is not expected. Approximately two-fold increase of density and elastic modulus of the matrix was shown in scaffold-free constructs, administrated by local TGF-1-containing gel, in comparison to healing without growth factor application. TGF-1 and TGF- $\beta$ 3 were successfully used in conjunction with mechanical stimuli of chondrogenesis [33, 42].

Some other activation mechanisms of TGF- $\beta$  are also interest. Metalloproteinase ADAMTS1 and Granzyme B have recently been described as new mediators for the TGF- $\beta$  activation. Granzyme B requires the presence of small amounts of leucine-rich proteoglycans (biglycan or decorin) for the liberation of TGF- $\beta$  [43] while ADAMTS1 needed thrombospondin 1 type. This activation goes through non-proteolytic displacement mechanism [19]. Today TGF- $\beta$  is the only growth factor, which is connected through the activation of mitogen-activated protein kinases with other molecular ways of chondrogenic stimulation.

BMP are also part of the TGF superfamily. Increased synthesis of ECM and proliferation of cells were recorded using BMP-2, BMP-4, BMP-7 BMP-12, and BMP-13, it was established for BMP-2 and BMP-7 to be maximally efficient [35]. In the culture in vitro the activity of BMP-7 gave it possibility to resist the catabolic effects of interleukin 1, fibronectin, or collagen fragments. This gives the possibility of BMP-7 stimulate healing of cartilage defects in vivo. As TGF- $\beta$ , BMPs were also investigated in combination with the use of mechanical forces for induction of chondrogenesis [34, 44].

In the work by Che et al. [36] have been analyzed the results of BMP-7 application for cartilage tissue engineering on rabbits with full-thickness defects in articular cartilage. About  $5 \times 10^6$  chondrocytes with BMP-7 transfection were placed in a sterile collagen-fibrin gel and were grown within 14 days. At 12 weeks after implantation the surface of the neofomed cartilage did not differ macroscopically from the surrounding tissues and did not have visible borders with them, unlike zone of spontaneous regeneration or replacement only by gel scaffolds. Immune histochemical study has revealed clear expression of BMP-7 and its m-RNA in chondrocytes of implants from experimental group. Tissue regenerates contained significantly more specific glycosaminoglycans and DNA. Aggregates of chondrocytes resembling isogenic groups in native cartilage were formed. Data of semiquantitative analysis on O'Driscoll scale testified to the relatively higher density of chondrocytes, the regularity of the articular surface, and better integration with the surrounding tissues.

The use of platelet-derived growth factor (PDGF) is of interest because platelet-rich plasma of the same patient may be an available source of it. Platelets contain two types PDGF (1 and 2), differing by their molecular masses, both have a positive impact on the regeneration of bone and cartilage tissues [30, 45]. Purified PDGF increases migration of chondrocytes and expression of the surface zone protein (lubricin), but usually unstable fibrocartilage is formed after remodeling, so the application of PDGF alone to cartilage tissue engineering have recognized as ineffective [46].

The efficiency of platelet-rich plasma application as a source of PDGF, as well as proof of his participation in the chondroreparation was published by Kon et al. [40]. The study summarizes the treatment of 100 patients with osteoarthritis (115 knee joints). Platelet-rich plasma obtained from 150 mL of venous blood of the same patient used to stimulation of chondrogegnesis by intraarticular instillations. The results of 91patients (57 men and 34 women) from this group were fully traced within 12 months. Distribution by severity of osteoarthritis (Kellgren) was as 0 from 58 knee joints, I-III from 33 jonts, and IV from 24 ones. The authors do not describe any adverse effects after this procedure, except for a slight swelling in the joints, and single cases of weak pain within 2-3 days after the injection. About 80% (73 of 91) patients were satisfied with the treatment results. The IKDS indicators have shifted in the direction to normal and subnormal data more than 70% of patients, the average values on a IKDS scale increased with  $40.5 \pm 10.4$  to  $62.5 \pm 18.6$  to 6 months, and  $60.6 \pm 18.9$  to the year of observation. Similar data were obtained using a Visual Analogue Scale.

Other growth factors. IGF-1 is an important anabolic factor for chondrocytes; it is able to potentiate the action of many other growth factors in respect of these cells. The level of IGF-1 increases in vivo on the place of cartilage defect immediately after the injury that became as the primary basis for discussion about its participation in the healing of cartilage. Growth factor IGF-I, as it was shown, allows to reduce lesion of the cartilage at the loss of the ECM volume. The application of IGF-I was accompanied by the increase in production of collagen and proteoglycans by chondrocytes, but its effectiveness was sharply different between zones of cartilage [2, 30, 31].

The new factor described like factor of growth and differentiation (GDF-5) is promising, because it can stimulate chondrogenesis at an early stage and be used both separately and in combination with gene therapy [11].

The use of mechanical stimuli and bioreactors. Growth factors have been successfully used in combination with mechanical and chemical impacts, such as drifting, compression, and variable hydrostatic over-pressure. So, sharing, BMP-2 and IGF-I applied together have increased the functional properties of tissue-engineered construct [31]. The mechanical drifting, combined with BMP-2 in the culture of dedifferentiated chondrocytes, led to expression of chondroblastic genes and synthesis of relevant proteins [47]. TGF- $\beta$ 3 combined with the immediate compression [33], as TGF-1 with hydrostatic water loads [31] increased ECM construction to the values in the normal cartilage; the growth factor and mechanical stimulation had a synergistic effect.

The main task of bioreactors is the ensuring delivery of nutrients and removing waste products from cell culture, and also the required safety in the growth and phenotypic differentiation, including the necessary hydrodynamic loads. In addition to high productivity, each bioreactor should control and maintain pH, temperature, pressure, and concentration of necessary nutrients in the cell culture due to whole operating cycle. According to their structure bioreactors for cartilage tissue engineering can be arranged in the form of parallel plates or concentrically placed cylinders, with rotating walls [47, 48, 49]. These structures are designed to provide the maximal square for the diffusion from perfused medium into scaffold matter and back. In comparison with traditional grow containers, bioreactors can minimize the necessary concentrations of growth factors, nutrients and cell-protecting agents.

Although the properties of cartilaginous structures grown in bioreactors are higher than tissue construct cultured statically, they have certain difficulties in engraftment after implantation *in vivo*. Apparently, a cartilage with a high content of aggrecanes is not only resistant to vascular invasion, but it disrupts remodeling in the subchondral bone [48].

Discussion. Despite the fact that autologous chondroplasty is the «gold standard» to recover damaged cartilage today, most specialists in regenerative medicine assume about tissue engineering to become the leader in this field in the nearest decade [3, 7]. Today the spectrum of cell sources and materials for the fabrication of its temporary media (scaffolds) were well outlined.

The research vector in cell-based technologies for cartilage tissue engineering aims to the gradual transition from the low differentiated stem cells to more mature sources, with the possibility of pointwise change the gene expression to induct chondral phenotype. The work of researchers and developers in this area are focused on optimizing the conditions for the cell culturing (1), management mechanisms of their chondrogenic differentiation including growth factors (2), remodeling of biomimetic structures in authentic cartilage (3), and getting a good evidence in clinical trials (4).

Now it is established, and clinically used the sufficient arsenal of materials with high biocompatibility and mechanical properties. They are more similar to own cartilage ECM and may stimulate its formation *in vivo*. The use of nanostructured materials and composites, already approved for the fabrication of scaffolds in classical micro-size structure, open new additional opportunities. Next tasks consist in the creation of “smart” biologically functional polymer structures, capable to control the behavior of cells due to all stages of remodeling tissue-engineered constructs [50]. At the same time Iwasa et al. [21] based on the analysis of refereed literature sources of past five years came to a conclusion about the absence of evidence-based arguments to give preference methods of tissue engineering and bioengineering before classical ACT technique or simple cell-free scaffold implantation. We see, near future will show a real place of these innovative technologies in the restoration of cartilage lesions.

The key problem is to ensure a coherent complete remodeling this constructs into native-like cartilage, that required predictable control impacts on the processes of settlement, proliferation, differentiation and adequate phenotypic expression of cells in the scaffold matter remodeling in autologous cartilage ECM. Fundamentally three control moments should be allocated: the structure of scaffolds (1), the use of growth factors (2) and mechanical stimulation (3), which shall be used only in the complex [4, 29].

Key-points of this development are concentrated around a further understanding the molecular biology and pathophysiology of the cartilage, use of nanotechnology in the scaffold fabrication with preset functions of management, problems of parallel control of the various molecular regulatory pathways. The application of several growth factors, as well as growth factors with non-chemical stimuli remains poorly understood area of research for cartilage tissue

engineering. Technical and legal problems of tissue engineering in connection with the advent of new technological trends are still a problem and needs to discuss.

In the nearest future the whole-cycle development of tissue engineered constructs de novo based on bioinformatics analysis will come one of the promising approaches to achieve significant progress in the optimal control of the cell population and their subsequent phenotypic expression on chondral phenotype. To realize this approach, one need to create consistently a database of cartilage metabolomics mapping (1); hold a virtual simulation of biomimetic cartilage structures on the basis of nanomaterials with necessary biocompatibility, biodegradation and chondroinduction (2), develop the technologies to fabricate this biohybrid scaffold (3), and test its capabilities in model experiments (4) and in vivo (5). Eventually this can lead to the creation of new tissue-engineered solutions allowing to successfully remodel biohybrid constructs in functionally complete cartilage.

**Conclusion and perspectives.** Tissue engineering of cartilage is certainly perspective field in regenerative biomedicine; its short progressive development already returned many thousands of people to active life and movement. This practical field of molecular biotechnology deserves to subsequent steps of its development, was not less rapidly and successfully, based on the key findings in molecular biology and epigenetics of cartilage. The whole-cycle development of new three-dimensional and real-time-managed structures, fully remodeling within a few weeks after implantation in natural hyaline cartilage being functionally complete and stable to subsequent injuries, are presented the most successful in this way.

#### References:

1. Becerra J., Andrades J.A., Guerado E., et al. (2010) Articular cartilage: structure and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 16(6), pp. 617-627.
2. van Osch G.J., Brittberg M., Dennis J.E., et al. (2009) Cartilage repair: past and future – lessons for regenerative medicine *J. Cell Mol. Med.* 13 (5), pp. 792–810.
3. Malan D.A., Pisarev V.B., Novochadov V.V. (2010) Restoration of Cartilage Lesions in a Knee Joint: Monograph. Volgograd: Volgograd Scientific Publishing, 518 pp. [in Rus.]
4. Clair B.L., Johnson A.R., Howard T. (2009) Cartilage repair: current and emerging options in treatment *Foot Ankle Specialist.* 2 (4), pp. 179–188.
5. Benthien J.P., Schwaninger M., Behrens P. (2011) We do not have evidence based methods for the treatment of cartilage defects in the knee. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 19 (4), pp. 543-552.
6. Zhang L., Hu J., Athanasiou K.A. (2009) The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 37 (1-2), pp. 1–57.
7. de Isla N., C. Huseltein, N. Jessel, et al. (2010) Introduction to tissue engineering and application for cartilage engineering. *Biomed. Mater. Eng.* 20 (3), pp. 127-133.
8. Kock L., van Donkelaar C.C., Ito K. (2012) Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell Tissue Res.* 347(3), pp. 613-627.
9. Discher D.E., Mooney D.J., Zandstra P.W. (2009) Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science.* 324, pp. 1673–1677.
10. Tetteh E.S., Bajaj S., Ghodadra N.S. (2012) Basic science and surgical treatment options for articular cartilage injuries of the knee. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.* 42(3), pp. 243-253.
11. Vacanti J.P. (2007) Editorial: tissue engineering: a 20-year personal perspective. *Tissue Eng.* 13 (2). - P. 231 -232.
12. Lin Z., Willers C., Xu J.A., et al. (2006) The chondrocyte: biology and clinical application // *Tissue Eng.* 12, pp. 1971–1984.
13. Krishnan S.P., Skinner J.A., Bartlett W., et al. (2006) Who is the ideal candidate for autologous chondrocyte implantation? *J. Bone Joint Surg. Br.* 88 (1), pp. 61-64.
14. Kim I.I. (2006) Selection and culturing of chondrocytes obtained from different sources *Cell Transplant. Tissue Eng.* [Kletochnaya Transplantologiya i Tkanevaya Inzheneriya]. 4 (6), pp. 48-50. [in Rus.]
15. Koga H., Engebretsen L., Brinchmann J.E., et al. (2009) Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 17 (11), pp. 1289-1297.
16. Bajada S., Mazakova I., Richardson J.B., Ashammakhi N. (2008) Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2 (4). P. 69–183.

17. Deev R.V., Isaev A.A., Kochish A.Yu., Tikhilov R.M. (2007) Cell technologies in traumatology and orthopedics: ways of development *Traumatol. Ortop. Rus.* [Travmatologiya i Ortopediya Rossii]. 4(46), pp. 3-12. [in Rus.]
18. Liu J.P., Song H., Zhang L.L., et al. (2010) Self-assembly-peptide hydrogels as tissue-engineering scaffolds for three-dimensional culture of chondrocytes in vitro. *Macromol Biosci.* 10, pp. 1164–1170.
19. Hubmacher D., Apte S.S. (2013) The biology of the extracellular matrix: novel insights *Curr. Opin. Rheumatol.* 25 (1), pp. 65–70.
20. Lu T., Li Y., Chen T. (2013) Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering *Int. J. Nanomedicine.* (8), pp. 337–350.
21. Iwasa J., Engebretsen L., Shima Y., et al. (2009) Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 17, pp. 561–577.
22. O'Brien FJ. (2011) Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Mater. Today.* 14, pp. 88–95.
23. Wimpenny, I. N. Ashammakhi, Y. Yang (2012) Chondrogenic potential of electrospun nanofibres for cartilage tissue engineering *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 6, pp. 536–549.
24. Chen J.P. Li S.F., Chiang Y.P. (2010) Bioactive collagen-grafted poly-L-lactic acid nanofibrous membrane for cartilage tissue engineering *J. Nanosci. Nanotechnol.* 10 (8), pp. 5393-5398.
25. Ma P.X. (2008) Biomimetic materials for tissue engineering *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, pp. 184–198.
26. Muzzarelli R.A. (2011) Biomedical exploitation of chitin and chitosan via mechano-chemical disassembly, electrospinning, dissolution in imidazolium ionic liquids, and supercritical drying *Mar. Drugs.* 9 (9), pp. 1510-1533.
27. Filardo G., Kon E., Roffi A., et al. (2013) Scaffold-based repair for cartilage healing: a systematic review and technical note *Arthroscopy.* 29(1), pp. 174-186.
28. Brittberg M. (2010) Cell carriers as the next generation of cell therapy for cartilage repair: a review of the matrix-induced autologous chondrocyte implantation procedure. *Am J Sports Med.* 38(6), pp. 1259-1271.
29. Novochadov V.V. (2013) The control of the cell settlement and scaffold remodeling in cartilage tissue engineering: a review *Herold Volgograd State Univ. 11: Natural Sciences [Vestnik Volgogradskogo Gosudarstvennogo Universiteta. 11: Estestvennye Nauki].* (1), pp. 19-28. [in Rus.]
30. Schmidt M.B., Chen E.N., Lynch S.E. (2006) A review of the effects of insuline-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair // *Osteoarthr. Cartil.* 14 (3), pp. 403-412.
31. Elder B.D., Athanasiou K.A. (2009) Systematic assessment of growth factor treatment on biochemical and biomechanical properties of engineered articular cartilage constructs *Osteoarthritis Cartilage.* 17 (1), pp. 114–123.
32. DeFail A.J., Chu C.R., Izzo N., Marra K.G. (2006) Controlled release of bioactive TGF- $\beta$ 1 from microspheres embedded within biodegradable hydrogels. *Biomaterials.* 27, pp. 1579–1585.
33. Lima E.G., Bian L., Ng K., et al. (2007) The beneficial effect of delayed compressive loading on tissue-engineered cartilage constructs cultured with TGF- $\beta$ 3 *Osteoarthritis Cartil.* 15 (9), pp. 1025–1033.
34. Doyle J.J., Gerber E.E., Dietz H.C. (2012) Matrix-dependent perturbation of TGF $\beta$  signaling and disease. *FEBS Lett.* 586, pp. 2003–2015.
35. Pecina M., Jelic M., Martinovic S., et al. (2002) Articular cartilage repair: the role of bone morphogenetic proteins. *Int Orthop.* 26(3), pp. 131–136.
36. Che J.H., Zhang Z.R., Li G.L., et al. (2010) Application of tissue-engineered cartilage with BMP-7 gene to repair knee joint cartilage injury in rabbits *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 18 (2), pp. 496-503.
37. Veilleux N., Spector M. (2005) Effects of FGF-2 and IGF-1 on adult canine articular chondrocytes in type II collagen-glycosaminoglycan scaffolds in vitro *Osteoarthritis Cartil.* 13, pp. 278–286.
38. Natoli R.M., Athanasiou K.A. (2008) P188 reduces cell death and IGF-I reduces GAG release following single-impact loading of articular cartilage *J. Biomech. Eng.* 130(4), e041012.
39. Dhollander AA, De Neve F, Almqvist KF, et al. (2011) Autologous matrix-induced chondrogenesis combined with platelet-rich plasma gel: technical description and a five pilot patients report. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 19(4), pp. 53642.

40. Kon E., Buda R., Filardo G., et al. (2010) Platelet-rich plasma: intraarticular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 18, pp. 472-479.
41. Holland T.A., Bodde E.W.H., Cuijpers V.M.J.I., et al. (2007) Degradable hydrogel scaffolds for in vivo delivery of single and dual growth factors in cartilage repair. *Osteoarthritis Cartil.* 15, pp. 187–197.
42. Campbell J.J., Lee D.A., Bader D.L. (2006) Dynamic compressive strain influences chondrogenic gene expression in human mesenchymal stem cells. *Biorheology.* 43(3–4), pp. 455–470.
43. Boivin WA, Shackleford M, Vanden Hoek A, et al. (2012) Granzyme B cleaves decorin, biglycan and soluble betaglycan, releasing active transforming growth factor-beta1. *PLoS One.* 7, e33163.
44. Ando K., Imai S., Isoya E., et al. (2009) Effect of dynamic compressive loading and its combination with a growth factor on the chondrocytic phenotype of 3-dimensional scaffold-embedded chondrocytes. *Acta Orthop.* 80(6), pp. 724–733.
45. Anitua E., Andia I., Ardanza B., et al. (2004) Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration *Thromb. Haemost.* 91, pp. 4-15.
46. Khalafi A., Schmid T.M., Neu C., Reddi A.H. (2007) Increased accumulation of superficial zone protein (SZP) in articular cartilage in response to bone morphogenetic protein-7 and growth factors. *J. Orthop. Res.* 25(3), pp. 293–303.
47. Chen H.C., Sung L.Y., Lo W.H., et al. (2008) Combination of baculovirus-expressed BMP-2 and rotating-shaft bioreactor culture synergistically enhances cartilage formation *Gene Ther.* 15 (4), pp. 309–317.
48. Bueno E.M., Bilgen B., Barabino G.A. (2005) Wavy-walled bioreactor supports increased cell proliferation and matrix deposition in engineered cartilage constructs *Tissue Eng.* 11, pp. 1699–1709.
49. Li W.J., Jiang Y.J., Tuan R.S. (2008) Cell-nanofiber-based cartilage tissue engineering using improved cell seeding, growth factor, and bioreactor technologies *Tissue Eng Part A.* 14 (5), pp. 639–648.
50. Korzhikov V.A., Vlakh E.G., Tennikova T.B. (2012) Polymers in orthopedic surgery and tissue engineering: structural materials for “smart” surface biofunctionalization *Polymer Sci. [Vysokomolekulyarnye soedineniya].* 54 (8), pp. 1203-1208. [in Rus.]

УДК 616.72-018.3 : 577.3

### **Использование факторов роста в тканевой инженерии суставного хряща (обзор литературы)**

Валерий Валерьевич Новочадов

Волгоградский государственный университет, Россия  
400062, г. Волгоград, пр. Университетский, 100  
Доктор медицинских наук, профессор  
E-mail: novovv@rambler.ru

**Аннотация.** В статье представлен систематизированный обзор, анализирующий распространенность, основные технологии и перспективные направления использования факторов роста в тканевой инженерии суставного хряща. Наибольшее внимание уделено проблемам сочетания факторов роста между собой, с современными скаффолдами для клеточного заселения и вариантами механической и физико-химической стимуляции хондрогенеза, в том числе – в условиях использования биореакторов.

**Ключевые слова:** суставной хрящ; тканевая инженерия; скаффолды; трансформирующий фактор ростаβ ; костные морфогенетические белки; инсулиноподобный фактор роста-1; тромбоцитарный фактор роста.

ISSN: 2310-6255

Founder: Academic Publishing House *Researcher*

DOI: 10.13187/issn.2310-6255

Has been issued since 2013.



**European Journal of Molecular Biotechnology**

UDC 581.1:631.531.027.3:631.559:581.143

**Influence of Pulse Pressure on the State of Biopolymers and the Probability of Hydrolysis of Starch in Seeds**

<sup>1</sup> Violetta Pavlova

<sup>2</sup> Ekaterina Vasichkina

<sup>3</sup> Elena Nefed'eva

<sup>4</sup> Vladimir Lysak

<sup>1</sup> Volgograd State Technical University, Russian Federation  
400005, Volgograd, Lenin avenue, 28

Post-graduate student

E-mail: Violetta\_Mir@mail.ru

<sup>2</sup> Volgograd State Technical University, Russian Federation  
400005, Volgograd, Lenin avenue, 28

Post-graduate student

E-mail: vasichkinaev@yandex.ru

<sup>3</sup> Volgograd State Technical University, Russian Federation  
400005, Volgograd, Lenin avenue, 28

Professor, D. Sc. (Biology)

E-mail: nefedieva@rambler.ru

<sup>4</sup> Volgograd State Technical University, Russian Federation  
400005, Volgograd, Lenin avenue, 28

Professor, D. Sc. (Engineering)

E-mail: lysak@vstu.ru

**Abstract.** Damage of seeds which leads to destruction of the crystal lattice and the phase transition of polymers is formed under the pulse pressure (PP) treatment. Biopolymers such as starch compressed under specific conditions can be changed from crystalline to a glassy state; this transition is known to extend the life of seeds. The aging of seeds is involved in the enzymatic glycosylation of proteins and nucleic acids. Reducing sugars which have been produced in seeds by non-enzymatic hydrolysis enter into reaction of glycosylation with proteins and amino acids actively.

The authors studied the water absorption by seeds of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench., cultivar Saulyk) treated by PP. The values of PP which were used to treat had an influence on water absorption during the first hours of imbibition. When water content was 60%, hydrolysis of reserve substances could begin, so water potential was created by osmotically active molecules. Gibbs energy calculation by method of groups' contribution indicated the reduction in probability of starch hydrolysis in plant seeds during transition from the crystalline to the glassy state.

**Keywords:** pulse pressure; biopolymer; destruction; starch; buckwheat; hydrolysis.

**Введение.** В качестве фактора, действующего на растения, было выбрано импульсное давление (ИД), создаваемое прохождением ударной волны. ИД в интервале 3–35 МПа способствует стимулированию физиологических процессов в семенах и растениях, ведущих к



увеличению урожая, и отбору устойчивых к данному воздействию форм (в дозах, снижающих всхожесть) [1].

У организмов в состоянии покоя (воздушно-сухие семена, пыльца, споры) физические воздействия оставляют скрытые (потенциальные) повреждения, которые реализуются во время перехода клеток в жизнедеятельное состояние [2]. Аналогично в семени при обработке ИД образуются повреждения, которые развиваются в дальнейшем при хранении. Эти эффекты могут быть связаны с дроблением, появлением трещин, которые будут продолжать расти в процессе хранения, разрушением кристаллической решетки или фазовыми переходами полимеров.

Полимеры (и, в частности, биополимеры в семенах) могут находиться в различных фазово-агрегатных состояниях. Для полимеров характерны кристаллическое, и аморфное состояния, причем к последнему относятся стеклообразное, высокоэластическое, вязкотекучее состояния. Переходы между тремя последними состояниями называют релаксационными. Их температуры существенно зависят от скорости деформации полимера и могут смещаться на десятки градусов [3]. Переходы из одного состояния в другое зависят от температуры и давления. При всестороннем сжатии полимера при некотором давлении  $P_{ст}$  (давлении стеклования) полимер переходит в стеклообразное состояние. Известно, что переход биополимеров в стеклообразное состояние продляет жизнь семян [4].

Крахмал в семенах может находиться в кристаллическом или аморфном (стеклообразном) состоянии. Быстрое ухудшение состояния семян связывают с ослаблением стеклообразного состояния, быстрым гидролизом углеводов и множеством окислительных процессов [4, 5].

Старение семян [6], как и животных и человека [7], сопряжено с процессом неферментативного гликозилирования белков и нуклеиновых кислот (реакция Амадори-Мейяра).

Нуклеиновые кислоты и белки могут быть модифицированы с помощью присоединения сахаров к их свободным аминогруппам, что ведет к структурной и функциональной перестройке молекул. Глюкоза как альдогексоза способна без участия ферментов модифицировать белки в условиях *in vivo* [8].

Процесс неферментативного гликозилирования включает два этапа. Вначале происходит обратимое образование начальных продуктов за счет связывания глюкозы со свободными аминогруппами с образованием оснований Шиффа и последующим их превращением в более стабильные продукты Амадори. Затем происходит необратимое образование промежуточных карбонильных соединений и конечных продуктов глубокого гликозилирования (AGE – advanced glycosylation endproducts). Конечные продукты реакции Мейяра труднорастворимы, устойчивы к протеолитическому расщеплению, весьма активны химически и способны образовывать внутримолекулярные сшивки, ковалентно связывать белки, а также некоторые другие вещества, имеющие свободные аминогруппы (ДНК, некоторые липиды), химически инактивировать окись азота (NO) [7, 8].

Старение семян сопряжено со снижением содержания в них воды [6]. Можно предположить, что снижение содержания воды в семенах происходит во время гидролиза олигосахаридов при хранении [4]. При гидролизе полисахаридов происходит перераспределение воды: часть связанной воды включается в структуру продуктов. В частности, при полном гидролизе крахмала (процесс термодинамически возможен при н.у., следовательно, может протекать неферментативно) по уравнению (1) в состав сухого вещества может включиться масса воды, составляющая 11,1 % от массы крахмала:



Помимо крахмала, гидролизу могут подвергаться другие полимерные вещества, возможно образование кристаллогидратов, не разрушающихся при температуре высушивания семян.

Расчеты [6] показали, что при гидролизе 50,07 мг/г олигосахаридов (вербаскозы, стахиозы, раффинозы и сахарозы) влажность семян должна снизиться на 0,4–0,5 %. Эта величина такого же порядка, что и снижение влажности при переходе из фракции нормальных семян I во фракцию семян II, из которых вырастают проростки с морфологическими дефектами. Поэтому можно предположить, что начало старения и уменьшение влажности семян вызваны гидролизом олигосахаридов, при котором



возрастает количество глюкозы. Измерение содержания глюкозы в порошке сухих семян термохемилюминесцентным методом и глюкометром в супернатанте гомогената порошка в дистиллированной воде показали, что семена фракции II содержат в 2–3 раза больше глюкозы, чем семена фракции I [6].

Возникшие в семенах при неферментативном гидролизе редуцирующие сахара активно вступают в реакции гликозилирования с белками и аминокислотами. Малое содержание восстанавливающих сахаров в сухих семенах является защитой от неферментативной amino-карбонильной реакции, которая активно протекает в области влажностей от 6 до 15 % [6].

Оценить возможность самопроизвольного протекания процесса гидролиза крахмала в семенах возможно с помощью изобарно-изотермического потенциала (энергия Гиббса).

**Материалы и методы.** В экспериментах использовали растения гречихи (*Fagopyrum esculentum* Moench.) сорта Саулык. Обработку семян с ИД проводили в соответствии со схемой (рис.1) [9]. На дно контейнера из нержавеющей стали (1) укладывали порошковые кассета (2) с семенами (3), закрытыми сетчатым материалом. Контейнер заполняли водой (4), закрепляли водостойкое взрывчатое вещество (5) с массой  $Q$  на расстоянии  $R$  от поверхности семян при помощи пластины (6). Производили детонацию с использованием электродетонатора (7).

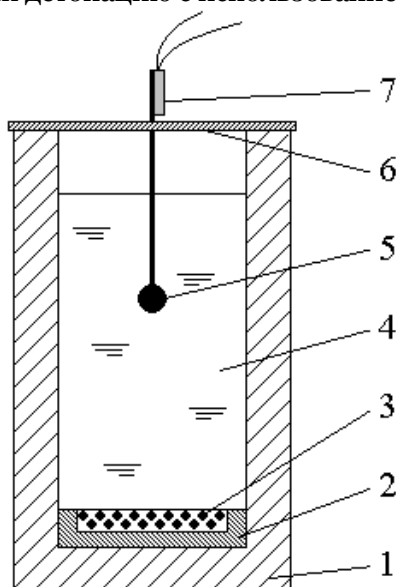


Рис. 1. Схема устройства для обработки семян ИД:

1 - контейнер; 2 - кассета с семенами (3); 4 - вода; 5 - взрывчатое вещество; 6 - пластина; 7 - электродетонатор

Контрольные семена известной массы помещали в воду на 2 часа, а опытные, также предварительно взвешенные, подвергали ударно-волновой обработке, после чего продолжали выдерживать в воде. Через 1 час и 2 часа все партии семян взвешивали и определяли содержание воды.

Расчет изобарно-изотермического потенциала производился по методу Ван Кревелена и Чермена [10]. Данный метод позволяет учитывать особенности фазового состояния полимера, подвергающегося гидролизу. При расчете было принято, что крахмал состоит на 100% из амилозы, а также то, что глюкоза, образующаяся в результате процесса гидролиза амилозы, находится в ациклическом состоянии.

**Обсуждение результатов.** В первые часы набухания вода поглощается в основном за счет матричного потенциала биополимеров, а также путем адсорбции на поверхности частиц. Только при достижении 60 %-ной оводненности начинается гидролиз запасных веществ, появляются осмотически активные молекулы, создающие водный потенциал [11]. Следовательно, поглощение воды в первые часы связано с состоянием биополимеров.

Предположим, что под действием ИД происходили следующие изменения состояния биополимеров: 1) разрыхление структуры и увеличение пространства между частицами; 2) рост имевшихся до воздействия микротрещин и разламывание частиц; 3) дополнительное увеличение адсорбирующей поверхности за счет разломов и микротрещин.

Через 1 час после действия ИД поглощение воды нарастало линейно (рис. 2), поскольку вода, видимо, поступала в промежутки между макрочастицами.

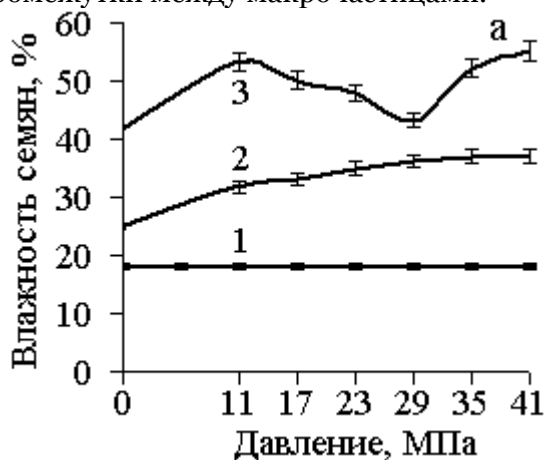


Рис. 2. Поглощение воды семенами гречихи в зависимости от ИД: а – сразу после обработки: 1 – сухие семена, 2 – 1 час, 3 – 24 час

Через 2 час обнаружены три экстремума на кривой зависимости поглощения воды от величины воздействующего ИД. Следовательно, на поглощение воды действовали, по крайней мере, три процесса, которые изменялись по-разному в зависимости от величины ИД. Отметим, что в это время поглощение и удержание воды связано с процессами адсорбции и взаимодействия гидрофильных группировок. Усиление поглощения воды при низких ИД (11–20 МПа) было связано с расширением промежутков между частицами и увеличением доступности гидрофильных групп для воды. Торможение поглощения воды при ИД 23–29 МПа могло быть вызвано смещением или разломом гидрофильных частиц. Эффект проявлялся не сразу, а в процессе набухания, когда биополимеры переходили в коллоидное состояние, формировали третичную и четвертичную структуру, активно включая гидрофильно-гидрофобные взаимодействия. ИД 35–41 МПа вызывали сильные изменения структуры, при которых большинство семян утрачивали способность к прорастанию, однако способствовали росту адсорбирующей поверхности и усилению поглощения воды через 1–2 час набухания. В дальнейшем, когда в процесс поглощения воды вовлекались осмотически активные продукты гидролиза, он останавливался.

В целях сравнения устойчивости к гидролизу амилозы, находящейся в аморфном (стеклообразном) и кристаллическом состоянии были проведены расчеты термодинамических функций для двух граничных состояний (амилоза полностью аморфная, амилоза полностью кристаллическая).

Для процесса гидролиза, при котором исходная амилоза находится в аморфном (стеклообразном) состоянии, получены следующие зависимости:

$$\Delta G_p^0 = \Delta H_p^0 - \Delta S_p^0 \cdot T \quad (2)$$

$$\Delta G_{p,ак}^0 = -76857 + 177,78 \cdot T \text{ Дж/моль} \quad (3)$$

$$\Delta H_p^0 = -76857 \text{ Дж/моль} \quad (4)$$

$$\Delta S_p^0 = -177,78 \text{ Дж/моль} \quad (5)$$

Для процесса гидролиза, при котором исходная амилоза находится в кристаллическом состоянии, получены следующие зависимости:

$$\Delta G_{p,кк}^0 = -68477 + 125,4 \cdot T \text{ Дж/моль} \quad (6)$$

$$\Delta H_p^0 = -68477 \text{ Дж/моль} \quad (7)$$

$$\Delta S_p^0 = -125,4 \text{ Дж/моль} \quad (8)$$

Так как при изменении температуры  $\Delta H_p^0$  и  $\Delta S_p^0$  меняются мало, то в первом приближении можно считать  $\Delta G_p^0$  линейной функцией от температуры. Для большинства полимеров экспериментальные величины изменения  $\Delta G_p^0$  от  $T$  в интервале 400–600 К практически всегда являются линейной функцией [12].

При  $T_{\text{пред}}$  система находится в равновесии, в ней не протекают процессы гидролиза и поликонденсации [12]. Определим температуру, при которой система будет находиться в равновесии  $\Delta G_p^0 = 0$ :

$$T_{\text{аморф,пред}} = \frac{\Delta H_p^0}{\Delta S_p^0} = \frac{-76857}{-177,78} = 432(K) = 159(^{\circ}C) \quad (9)$$

$$T_{\text{крист,пред}} = \frac{\Delta H_p^0}{\Delta S_p^0} = \frac{-68477}{-125,4} = 546(K) = 273(^{\circ}C) \quad (10)$$

Таким образом, крахмал, находящийся в кристаллическом состоянии реакционно способен на большем интервале температур и менее устойчив к гидролизу.

Рассчитаем  $\Delta G_p^0$  при температуре опыта  $T = 20^{\circ}C$ :

$$\Delta G_{\text{крист,р,293}}^0 = -68477 + 125,4 \cdot 293 = -31734,8 \text{ Дж/моль} \quad (11)$$

$$\Delta G_{\text{аморф,р,293}}^0 = -76857 + 177,78 \cdot 293 = -24767,46 \text{ Дж/моль} \quad (12)$$

Так как  $\Delta G_{\text{р,293}}^0 < 0$ , то в обеих системах возможно самопроизвольное протекание процесса гидролиза. Однако в системе, в которой амилоза находится в кристаллическом состоянии, химическое сродство выше, т.е. сильнее стремление системы к протеканию данного процесса и тем дальше система находится от состояния равновесия.

**Заключение.** Как видно из вышеизложенного, изменение состояния полимеров чрезвычайно сложно, однако оно зависит от параметров на фронте ударной волны – давления, температуры и скорости их изменения. Следовательно, оказывая влияние на параметры стеклообразного состояния биополимеров семян путем обработки ИД, мы способствуем изменениям биополимеров и параметров выхода из состояния покоя, вероятности протекания процессов их гидролиза. В результате развивается последствие ИД у проростков и взрослых растений.

#### Примечания:

1. Nefed'eva E.E. The Influence of Impulse Pressure on the Phytohormone Content, Growth and Crop Productivity of Buckwheat Plants (*Fagopyrum esculentum* Moench., cv. Aromat) / Nefed'eva E.E. // *Greenwich Journal of Science and Technology*. 2003. №3. P. 123-135.
2. Кузин А.М. Стимулирующее действие ионизирующего излучения на биологические процессы / А.М. Кузин. М.: Атомиздат, 1977. 133 с.
3. Бартенев Г.М. Физика полимеров / Г. М. Бартенев, С. Я. Френкель / Под ред. д-ра физ.-мат. наук А. М. Ельяшевича. Л.: Химия, 1990. 432 с.
4. Bernal-Lugo I. Changes in soluble carbohydrates during seed storage/ I. Bernal-Lugo, A.C. Leopold // *Plant Physiol*. 1992. V. 98. P. 1207-1210.
5. Bernal-Lugo I. Review article. The dynamics of seed mortality / I. Bernal-Lugo, A. Leopold // *Journal of Experimental Botany*. 1998. V. 49. P. 1455-1461.
6. Veselova T.V. Investigation of atypical germination changes during accelerated ageing of pea seeds/ T.V. Veselova, V.A.Veselovsky // *Seed Science and Technology*. 2003. V. 31. P. 517-530.
7. Анисимов, В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. Санкт-Петербург: Наука, 2003. 468 с.
8. Кудинов Ю. Г. Патологические последствия накопления конечных продуктов неферментативного гликозилирования при старении // *Пробл. старения и долголетия*. 1994.

Т. 4. С. 434-451.

9. Патент РФ № 2083073, 07.10.1997. Атрощенко Э.С., Хрянин В.Н., Атрощенко Е.Э., Теплов А.Д., Розен А.Е., Ионова А.Н. Способ предпосевной обработки семян сельскохозяйственных культур // Патент России № 2083073. 1997. Бюл. № 19.

10. Кревелин Д.В. Ван Свойства и химическое строение полимеров/ Д.В. Ван Кревелен. М.: Химия, 1976. 114 с.

11. Obroucheva, N.V. Vacuolar status and water relations in embryonic axes of recalcitrant *Aesculus hippocastanum* seeds during stratification and early germination/ N.V. Obroucheva, S.V. Lityagina, G.V. Novikova, I.A. Sin'kevich //AoB Plants. Pls 008. P. 1-14.

12. Духанин Г.П. Термодинамические расчеты химических реакций/Г.П. Духанин, В.А. Козловцев. Волгоград: ВолгГТУ, 2010. 96 с.

#### References:

1. Nefed'eva E.E. The Influence of Impulse Pressure on the Phytohormone Content, Growth and Crop Productivity of Buckwheat Plants (*Fagopyrum esculentum* Moench., cv. Aromat) / Nefed'eva E.E. // Greenwich Journal of Science and Technology. 2003. №3. P. 123-135.

2. Kuzin A.M. Stimuliruyushchee deistvie ioniziruyushchego izlucheniya na biologicheskie protsessy/ A.M. Kuzin. M.: Atomizdat, 1977. 133 s.

3. Bartenev G.M. Fizika polimerov / G. M. Bartenev, S. Ya. Frenkel' / Pod red. d-ra fiz.-mat. nauk A. M. El'yashevicha. L.: Khimiya, 1990. 432 s.

4. Bernal-Lugo I. Changes in soluble carbohydrates during seed storage/ I. Bernal-Lugo, A.C. Leopold //Plant Physiol. 1992. V. 98. P. 1207-1210.

5. Bernal-Lugo I. Review article. The dynamics of seed mortality / I. Bernal-Lugo, A. Leopold // Journal of Experimental Botany. 1998. V. 49. P.1455-1461.

6. Veselova T.V. Investigation of atypical germination changes during accelerated ageing of pea seeds/ T.V. Veselova, V.A.Veselovsky // Seed Science and Technology. 2003. V. 31. P. 517-530.

7. Anisimov V.N. Molekulyarnye i fiziologicheskie mekhanizmy stareniya. Sankt-Peterburg: Nauka. 2003 g. 468 s.

8. Kudinov Yu.G. Patologicheskie posledstviya nakopleniya konechnykh produktov nefermentativnogo glikozilirovaniya pri starenii // Probl. stareniya i dolgoletiya. 1994. T. 4. S. 434-451.

9. Patent RF № 2083073, 07.10.1997. Atroshchenko E.S., Khryanin V.N., Atroshchenko E.E., Teplov A.D., Rozen A.E., Ionova A.N. Sposob predposevnoi obrabotki semyan sel'skokhozyaistvennykh kul'tur// Patent Rossii № 2083073. 1997. Byul. № 19.

10. Krevelin D.V. Van Svoistva i khimicheskoe stroenie polimerov/ D.V. Van Krevelen. M.: Khimiya, 1976. 114 s.

11. Obroucheva N.V. Vacuolar status and water relations in embryonic axes of recalcitrant *Aesculus hippocastanum* seeds during stratification and early germination / N.V.Obroucheva, S.V. Lityagina, G.V. Novikova, I.A. Sin'kevich //AoB Plants. Pls 008. P. 1-14.

12. Dukhanin G.P. Termodinamicheskie raschety khimicheskikh reaktсии /G.P. Dukhanin, V.A. Kozlovcev. Volgograd: VolgGTU, 2010. 96 s.

УДК 581.1:631.531.027.3:631.559:581.143

### Влияние импульсного давления на состояние биополимеров и вероятность протекания процесса гидролиза крахмала в семенах

<sup>1</sup> Виолетта Александровна Павлова

<sup>2</sup> Екатерина Владимировна Васичкина

<sup>3</sup> Елена Эдуардовна Нефедьева

<sup>4</sup> Владимир Ильич Лысак

<sup>1</sup> Волгоградский государственный технический университет, Россия

400005, Волгоград, пр. им. Ленина, 28

Аспирант

E-mail: Violetta\_Mir@mail.ru

<sup>2</sup> Волгоградский государственный технический университет, Россия  
400005, Волгоград, пр. им. Ленина, 28

Аспирант

E-mail: vasichkinaev@yandex.ru

<sup>3</sup> Волгоградский государственный технический университет, Россия

Доктор биологических наук, доцент

400005, Волгоград, пр. им. Ленина, 28

E-mail: nefedieva@rambler.ru

<sup>4</sup> Волгоградский государственный технический университет, Россия

Член-корреспондент РАН, профессор, доктор технических наук

400005, Волгоград, пр. им. Ленина, 28

E-mail: lysak@vstu.ru

**Аннотация.** При обработке импульсным давлением в семенах образуются повреждения, которые приводят к разрушению кристаллической решетки и фазовым переходам полимеров. При сжатии в определенных условиях биополимеры (крахмал) могут переходить из кристаллического в стеклообразное состояние, что продляет жизнь семян. Старение семян сопряжено с процессом неферментативного гликозилирования белков и нуклеиновых кислот. Возникшие в семенах при неферментативном гидролизе редуцирующие сахара активно вступают в реакции гликозилирования с белками и аминокислотами.

Авторами изучено поглощение воды семенами гречихи (*Fagopyrum esculentum* Moench.) сорта Саулык, обработанными ИД. Величина ИД, использованного при обработке, влияла на поглощение воды в первые часы. При достижении 60%-ной оводненности начинался гидролиз запасных веществ, появлялись осмотически активные молекулы, создающие водный потенциал. Расчет энергии Гиббса методом групповых вкладов указывал на понижение вероятности протекания процесса гидролиза крахмала в семенах растений при переходе из кристаллического в стеклообразное состояние.

**Ключевые слова:** импульсное давление; биополимер; разрушение; крахмал; гречиха; гидролиз.