

Фирсова Наталья Викторовна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник
Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический
университет им. И.Н. Ульянова»

Ачилов Атабег Батырович

магистрант, младший научный сотрудник
Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический
университет им. И.Н. Ульянова»

Антонова Елена Ивановна

д-р биол. наук, профессор, директор
Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический
университет им. И.Н. Ульянова»

Ленгесова Наталья Анатольевна

канд. биол. наук, доцент, старший научный сотрудник
Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический
университет им. И.Н. Ульянова»

Сихарулидзе Сергей Владимирович

пластический хирург
Многопрофильная больница «ВМ-клиник»
г. Ульяновск, Ульяновская область

DOI 10.31483/r-107064

ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ КЛЕТОК КОЖИ ЧЕЛОВЕКА В СИСТЕМЕ IN VITRO В КАЧЕСТВЕ ПОДГОТОВИТЕЛЬНОГО ЭТАПА ДЛЯ СЕПАРАЦИИ КЛЕТОК (ПИЛОТНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ)

Аннотация: авторами проведен пилотный эксперимент по иммунофенотипированию культивируемых клеток кожи человека с определением доли малодифференцированных клеток по отношению к зрелым. Полученные результаты определили целевую популяцию молодых малодифференцированных клеток кожи в составе сокультуры, которые далее с помощью магнитной сепарации могут быть выделены в чистую популяцию клеток и использованы в процессе создания тканевого эквивалента кожи благодаря своему высокому уровню пролиферативной активности, потенциалу для формирования адгезий с поверхностью скаффолдов и синтетической активности продуцировать факторы роста и другие компоненты межклеточного матрикса, которые будут больше способствовать заживлению раны.

Ключевые слова: культура клеток кожи, иммунофенотип, поверхностные маркеры, скаффолды, эквивалент кожи.

Создание тканевых эквивалентов кожи является актуальным направлением в области регенеративной медицины с целью использования в качестве клеточной трансплантологии лечения повреждения кожного покрова различной этиологии и в области фундаментальных исследований в аспекте изучения генетических и эпигенетических механизмов регуляции гомеостаза клеток кожи.

Одним из важных этапов создания тканевого эквивалента кожи является иммунофенотипирование клеток кожи человека в системе *in vitro* с определением уровня дифференцировки с позиции пролиферативного потенциала и уровня секреторной активности [6]. Иммунофенотипирование клеток кожи проводится методом проточной цитометрии, который основан на исследовании маркеров клеточной поверхности, с дальнейшим определением цитотипа клеточных дифферендов для последующего заселения на скаффолды при создании тканевого эквивалента. Таким образом формируются клеточные линии клеток кожи человека

(фибробласты, кератиноциты, меланоциты) для дальнейшей их паспортизации и ведения в культуре, как компонентов эквивалента кожи, что в значительной степени ускорит процесс создания функциональных тканевых эквивалентов, используемые в регенеративной медицине и фундаментальных научных исследованиях. Так, в частности с позиции функциональной характеристики клеток для определения малодифференцированных популяций клеток используется CD90, а для определения зрелых меланоцитов c-Kit [3; 6].

В связи с этим *целью* данной работы является анализ иммунофенотипа клеток кожи человека 5-го пассажа с использованием поверхностных маркеров дифференцировки клеток.

Материалы и методы. Для получения первичной культуры клеток использованы экспланты кожного биоптата, иссеченные из области груди (область ареола) после проведения пластической хирургии в Многопрофильной больнице «ВМ-клиник» города Ульяновска. Все манипуляции с фрагментами кожи и клеточным материалом проводились в асептических условиях ламинарного бокса MSC Advantage (Thermo Scientific, США) и боксированном помещении класса чистоты В. В качестве полных питательных сред использована RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с содержанием 15% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (ПанЭко, Россия). Формирование монослоя контролировали визуально на инвертированном микроскопе «Axio Vert. A1» (Zeiss, Германия).

Иммунофенотип клеток кожи человека определяли по экспрессии меток cKit⁻CD90⁺, cKit⁺CD90⁻ и cKit⁺CD90⁺ с определением доли малодифференцированных клеток по отношению к зрелой популяции. Данный анализ проводили на мультилазерной диагностической системе проточной цитофлуориметрии CyFlowSpace (Partec, Германия), сопряженной с программным обеспечением FlowMax того же производителя. Используются моноклональные антитела к проточной цитометрии CD90 и cKit (Beckman Coulter, США).

Результаты и их обсуждение. Клеточная линия клеток кожи человека 5-го пассажа представляет собой сокультуру фибробластов и меланоцитов, которые ха-

рактируются различными фенотипическими особенностями присущими для каждого цититипа. Так, фибробласты представляют собой вытянутые веретеновидные клетки. Меланоциты имели больший размер и несколько отростков (рис. 1).

Для более подробной характеристики исследуемой популяции проведена оценка иммуннофенотипа фибробластов и меланоцитов по исследуемым маркерам с целью выявления уровня дифференцировки. В данной работе использована суспензия клеток кожи человека 5го пассажа, содержащая 100 000 – 150 000 клеток. В результате проведенного исследования выявлено наличие четырех фракций клеток, идентифицированных по наличию анализированных поверхностных маркеров или их комбинаций (рис. 2).

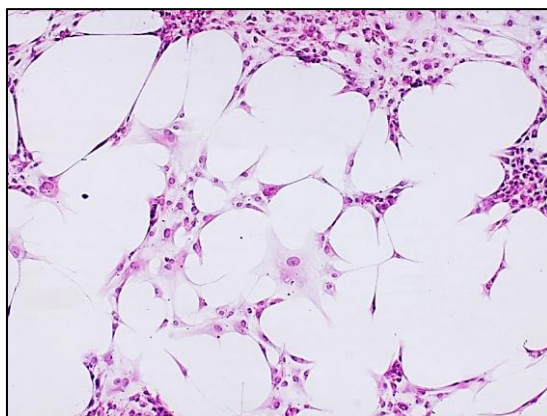


Рис. 1. Культура клеток кожи. 5 пассаж. Витальный препарат, окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: ок 10 х об 20.

Клетки с иммуннофенотипом $sKit^-CD90^+$ составляли 39,4% (Q1) от общей популяции, клетки с двойным мечением $sKit^+CD90^{+-}$ 34,1% (Q2) и клетки с иммуннофенотипом $sKit^+CD90^-$ – 17,1% (Q4). Клетки с отсутствием экспрессии CD90 и $sKit$ (9,4% от общего количества) локализованы в «серой зоне» (Q3) и не участвуют в обсуждении.

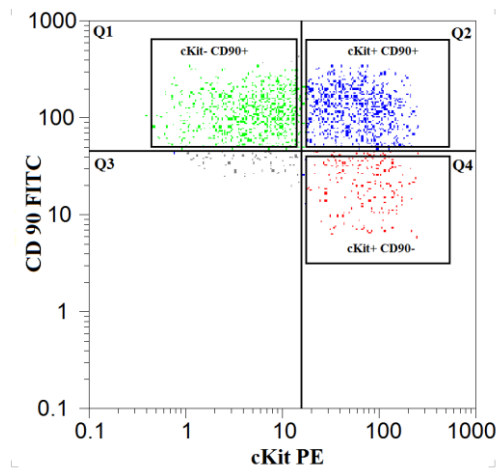


Рис. 2. Иммунофенотипирование клеток кожи человека.

Таким образом, сокультура 5-го пассажа в большей части представлена молодыми малодифференцированными клетками ($cKit^-CD90^+$), которые более предпочтительны для заселения на скаффолды в процессе создания тканевого эквивалента кожи благодаря своему высокому уровню пролиферативной активности, потенциалу для формирования адгезий с поверхностью скаффолдов и синтетической активности продуцировать факторы роста и другие компоненты межклеточного матрикса, которые будут больше способствовать заживлению раны [2; 4; 5].

Ранее нами проведен анализ содержания клеток с иммунофенотипом $CD90^+$ в суспензии культивируемых клеток кожи 3-го пассажа при исследовании их биосовместимости со скаффолдами [1], однако использование двойного окрашивания с маркером ранней дифференцировки клеток кожи $cKit$ позволяет исключить отнесение клеток с фенотипом $CD90^+$ к популяции клеток $cKit^+CD90^+$, которые характеризуются более высоким уровнем дифференцировки.

Полученные в нашей работе результаты иммунофенотипирования популяций меланоцитов разной стадии дифференцировки ($cKit^+CD90^+$ и $cKit^+CD90^-$) демонстрируют высокий процент содержания данной популяции клеток в культуре клеток 5го пассажа (около 50%) и могут быть использованы для получения чистой культуры меланоцитов после проведения сепарации. Однако при создании

тканевого эквивалента кожи данная популяция зрелых клеток не рассматривается в связи с близостью конечной их точки развития в системе меланоцитарного дифферона.

Технология иммунофенотипирования, сепарации и повторного иммунофенотипирования для контролирования процесса получения целевой популяции клеток показала высокую эффективность с использованием первичной культуры клеток кожи человека (возраст до 16 лет) [6].

Таким образом, полученные в данном пилотном эксперименте предварительные результаты подтверждают возможность использования метода иммунофенотипирования клеток кожи человека поверхностными маркерами для выявления малодифференцированных клеток. Кроме этого, обнаруженное высокое содержание популяции малодифференцированных клеток (39,4%) на 5-ом пассаже характеризуют высокий биологический потенциал данной клеточной линии и дают основание рассматривать 5-й пассаж в качестве оптимального для дальнейшей работы срока культивирования.

Список литературы

1. Антонова Е.И. Клеточный цикл как критерий оценки биосовместимости фибробластов и скаффолдов в системе *in vitro* после воздействия УФ-облучения в аспекте создания эквивалента кожи / Е.И. Антонова, Н.В. Фирсова, М.Р. Киямова [и др.] // Международный научно-исследовательский журнал. – 2022. – №9 (123). – DOI 10.23670/IRJ.2022.123.10.

2. Барановский Ю.Г. Применение дермальных фибробластов для ускорения регенерации хронических раневых дефектов кожи / Ю.Г. Барановский, Ф.Н. Ильченко, Е.Ю. Шаповалова // Вестник медицинского института. – 2019. – №5. – С. 110–116.

3. Duan Y. c-KIT and CD90 are useful markers for predicting prognosis in patients with melanoma / Y. Duan, X. Luo, S. Zhao [et al.] // Oncology Letters. – 2019. – №17 (3). – P. 2598–2606.

4. Glud A.N. The use of neural crest-derived stem cells for tissue engineering of skin and skeletal muscle / A.N. Glud, M.A. Hedegaard, R.K. Berge [et al.] // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2019. – №146. – P. 77–91.

5. Kock L. Tissue engineering of functional skin substitutes / L. Kock, T.H. van Kuppevelt // *Matrix Biology*. – 2019. – №75–76. – P. 314–325.

6. Michalak-Micka K. Characterization of a melanocyte progenitor population in human interfollicular epidermis / K. Michalak-Micka., V.L. Buchler, N. Zapiorkowska-Blumer [et al.] // *Cell reports*. – 2022. – 38 (9). 110419. – DOI: 10.1016/j.celrep.2022.110419.