(cc) BY

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»
г. Ульяновск, Ульяновская область
Бармина Светлана Алексеевна
младший научный сотрудник
Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»
г. Ульяновск, Ульяновская область
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»
г. Ульяновск, Ульяновская область
Сихарулидзе Сергей Владимирович
пластический хирург, заведующий отделением
ГУЗ «Ульяновская областная клиническая больница»
г. Ульяновск, Ульяновская область

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОТИПОВ КОЖИ IN VITRO В АСПЕКТЕ РАЗРАБОТКИ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ЭКВИВАЛЕНТА КОЖИ

Аннотация*: разработаны и оптимизированы протоколы культивирования эпидермальных меланоцитов и кератиноцитов, дермальных фибробластов кожи с учётом уровня дифференцировки. Определен оптимальный состав пол-*

Content is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 license (CC-BY 4.0)

ных сред культивирования. Заложены клеточные линии эпидермальных меланоцитов и дермальных фибробластов в аспекте дальнейшего сокультивирования в рамках разработки эпидермального эквивалента кожи.

***Ключевые слова**: клеточные технологии, эквивалент кожи, сокультивирование, дермальные фибробласты, эпидермальные меланоциты, регенеративная медицина.*

Одна из наиболее распространенных травм среди всех возрастных групп населения – травмы кожного покрова различной этиологии. Каждый год количество пострадавших от ожогов во всем мире составляет около 2 млн человек. В России ежегодно регистрируют 800 тыс. обожженных, инвалидизация составляет 23%. Лечение повреждений кожного покрова сопряжено с повышенным риском возникновения патологических рубцов, развития инфекционных заболеваний, трофических язв и др., таким образом, процесс заживления раны является чрезвычайно сложным и, в случае хронических ран, – часто многофакторным [6]. На современном этапе в аспекте регенеративной/заместительной терапии для лечения повреждений кожного покрова различной этиологии активно внедряется практика применения клеточных и тканевых эквивалентов. Задача клеточных технологий заключается не только в трансплантации живых клеток в область дефекта, но и в восстановлении структуры и функции кожного покрова, в стимуляции регенеративных процессов и создании микроокружения для реализации потенциала собственных тканей и клеток.

Широкое использование в мире, в частности, для лечения дефектов кожи как безопасный и эффективный метод заживления ран получили дермальные фибробласты, поскольку они играют ключевую роль в процессах регуляции клеточных взаимодействий и поддержании гомеостаза кожи [1]. Однако для создания полноценного кожного эквивалента и увеличения жизнеспособности культивируемых клеток необходимо учитывать наличие нескольких эпидермальных цитотипов, которые в системе *in vivo* оказывают взаимные индук-

Содержимое доступно по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 license (CC-BY 4.0)

ции, определяя рост и дифференцировку посредством аутокринных и паракринных коммуникаций [2; 3; 4]. Сокультивирование гетерогенных клеточных линий предполагает разработку линий клеток с определенным уровнем дифференцировки, это в дальнейшем позволит получить устойчивую гетерогенную клеточную систему с морфофункциональными характеристиками максимально приближенными к системе *in vivo*.

В связи с этим целью исследования является отработка и оптимизация протокола культивирования клеточных линий фибробластов и гетерогенной клеточной линии меланоцит/кератиноциты, для последующего их сокультивирования.

Материалы и методы исследования.

Материалом для культивирования цитотипов кожи служили кожные лоскуты после проведения реконструктивной и пластической хирургии ГУЗ «Ульяновская областная клиническая больница». Кожные лоскуты погружались в транспортную среду и доставлялись в лабораторию клеточных технологий научно-исследовательского центра фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова».

Для получения культуры меланоцитов, кожный лоскут механически измельчали, полученный материал помещали в 0,25% раствор трипсина при температуре 37°С в CO_2 – инкубатор («Binder», Германия), с концентрацией CO_2 5%. Далее отделяли слой эпидермы от дермы, далее материал центрифугировали, затем сбрасывали супернатант и к полученной взвеси клеток приливали 5 мл готовой полной среды для культивирования [7].

Для получения культуры фибробластов биоптаты кожи механически измельчали до однородной массы и помещали в растворе коллагеназы I типа (ПанЭко, Россия), через два часа клеточную суспензию центрифугировали, супернатант сбрасывали, а к осадку добавляли полную среду культивирования RPMI – 1640 с глутамином (ПанЭко, Россия). Далее определение количества клеток к первичному посеву, а также количество клеток перед каждым пасса-

Content is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 license (CC-BY 4.0)

жем подсчитывали путём оценки жизнеспособности с использованием с предварительной селективной окраской трипановым синим. Подсчёт клеток и оценку жизнеспособности культуры осуществляли с использованием счётчика клеток («Bio – Rad TC10», Сингапур). Культивирование клеточных линий проводили в культуральных флаконах в CO_2 – инкубаторе при температуре 37ºС. Воздушная среда – 5% CO_2 и 95% воздуха. В эксперименте использовались суспензии с количеством жизнеспособных клеток <96%. Через 48 часов после инокуляции осуществляли замену среды. В дальнейшем среду меняли по мере необходимости.

Морфологическую оценку клеточных популяций и динамику формирования монослоя проводили с помощью инвертированного микроскопа («Axio Vert. A1», Carl Zeiss, Германия). Пересев осуществляли по мере формирования монослоя. Клетки снимали с поверхности флакона раствором трипсина/Версена в соотношении 1:1. Фотографирование препаратов проводили с помощью встроенной фотокамеры AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Германия).

Для изготовления постоянных цитологических препаратов и оценки морфологических характеристик линий, культивирование проводили в чашках Петри, на дне которых предварительно размещали покровные стекла, обработанные раствором желатина. Для определения морфологических характеристик клетки окрашивали гематоксилином Карацци и водно-спиртовым раствором эозина.

Оценку динамики числа живых и погибших клеток, а также анализ реализации путей и этапов/стадии программированной клеточной гибели (ПКГ) – апоптоз, клеточный некроз проводили по уровню иммунофлуоресценции на мультилазерной (мультиплексной) диагностической системе проточной цитофлуориметрии CyFlowSpace (Partec, Германия). Для анализа ПГК и оценки жизнеспособности культуры готовили суспензию клеток в PBS (Gibco, США), которую далее центрифугировали в течение 5 мин., осадок ресуспендировали в PBS. Процедуру повторяли три раза. К осадку добавляли 500 мкл 1X Binding

Содержимое доступно по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 license (CC-BY 4.0)

Buffer (связывающая жидкость), ресуспензировали. Полученную суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр CellTrics (Partec, Германия). К 100 мкл полученной суспензии добавляли по 5 мкл красителей. Осадок ресуспендировали и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин. К окрашенной суспензии приливали около 500 мкл проточной жидкости и анализировали на цитофлюориметре [5; 8].

Предварительно линии проходили ПЦР-анализ на исключение контаминации культуры: использовались праймеры к 25 возбудителям: *Chlamydia trachomatis, Mycoplasma pneumonia*, Ureaplasma sp., *Ureaplasma urealiticum, Mycoplasma hominis, Mycoplasma genitalium, Neiseria gonorrhoeae* T.1 и T.2, *Trichomonas vaginalis, Cytomegalovirus, Gardnerella vaginalis*, HSV-1, 2 (герпесвирус), HCV-6 (герпесвирус), HPV-16,18 (папилломавирус), Rubella (краснуха), *Candida albicans, Treponema pallidum, Toxoplasma gondii, Mycobacterium tubercolosis*, вирусам гепатита A (HAV), B(HBV), C(HCV), D(HDV), G(HDV), вирусу Эпштейн-Барра и др. ПЦР анализ проводили по конечной точке в режиме «реального времени» на амплификаторе qTOWER 2.2 (Analytik Jena, Германия).

Клеточные линии пополнили банк клеточных культур путем криоконсервации.

Собственные данные.

В процессе культивирования заложена клеточная линия фибробластов (рис. 1). Отмечено, что наибольшее количество клеток наблюдается на стадии формирования монослоя – на 4 пассаже, конфлюэнтность при этом достигает 95%.

По результатам проточной цитофлуориметрии выявлено (рис. 2), что преобладающий путь гибели фибробластов на 4 пассаже является аппоптоз – 4% клеток проявляют признаки ранней стадии активации апоптоза – аннексин *V*-позитивные, около 0,05% фибробластов с признаками эффекторной стадии

Content is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 license (CC-BY 4.0)

апоптоза и около 0,8% фибробластов которые погибают по пути клеточного некроза – PI – позитивные. Количество живых клеток составляет 95%.

Морфология фибробластов (рис. 3) характеризуется правильной веретеновидной формой, которая характерна для системы *in vivo*. Клетки имеют чётко оформленное овальной формы ядро, в котором 2–3 ядрышка. Морфология фибробластов более позднего пассажа характеризуется выраженными признаками старения – большое количество отростков, распластывание по субстрату, вакуолизация цитоплазмы.

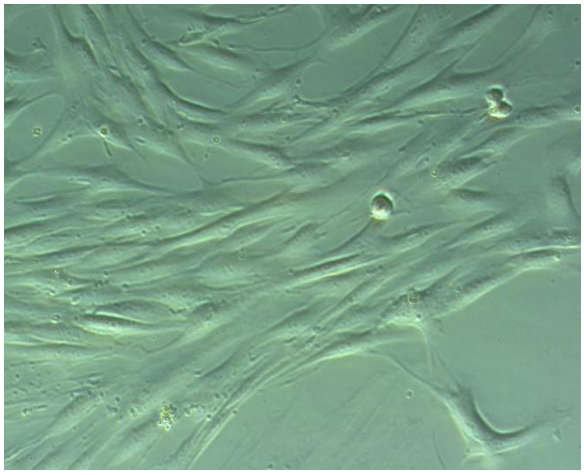

Рис. 1. Клеточная линия фибробластов. Формирование монослоя на 2 пассаже. Увеличение ок10хоб40

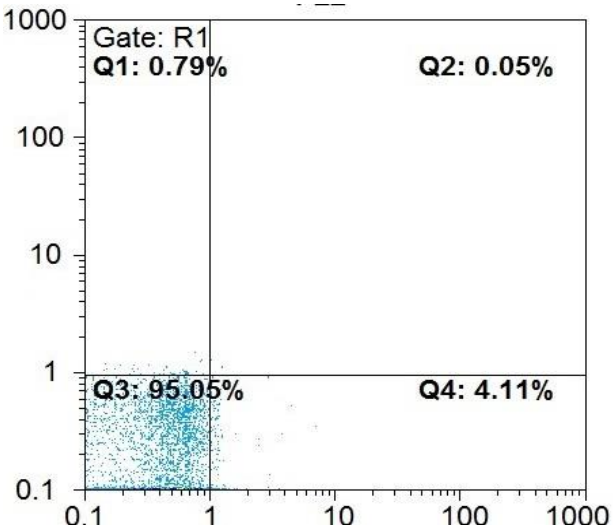

Рис. 2. Анализ путей программируемой клеточной гибели в культуре фибробластов, 4 пассажа

Содержимое доступно по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 license (CC-BY 4.0)

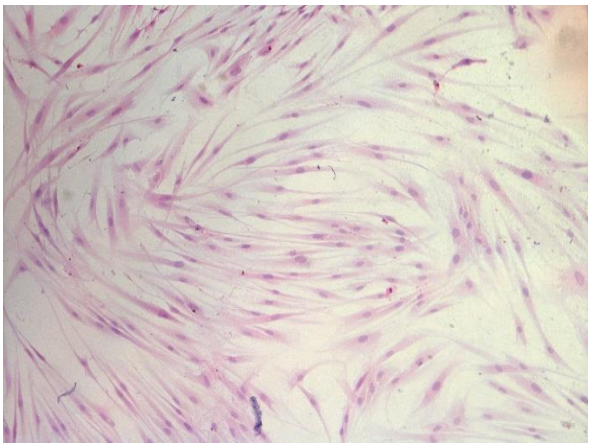

Рис. 3. Клеточная линия фибробластов. Формирование монослоя на 4 пассаже. Увеличение ок10хоб40. Окраска – гематоксилин-эозин

В процессе исследования отработан протокол совместного культивирования эпидермальных цитотипов кожи – кератиноциты и меланоциты (гетерогенная культура).

Отмечено, что наибольшее количество клеток, на стадии формирования монослоя, определяется уже на 3 пассаже (в отличие от клеточной линии фибробластов), конфлюэнтность достигает 70%, что объясняется более высокой специфичностью биологии данных популяций клеток в системе *in vitro* (рис. 4, 5).

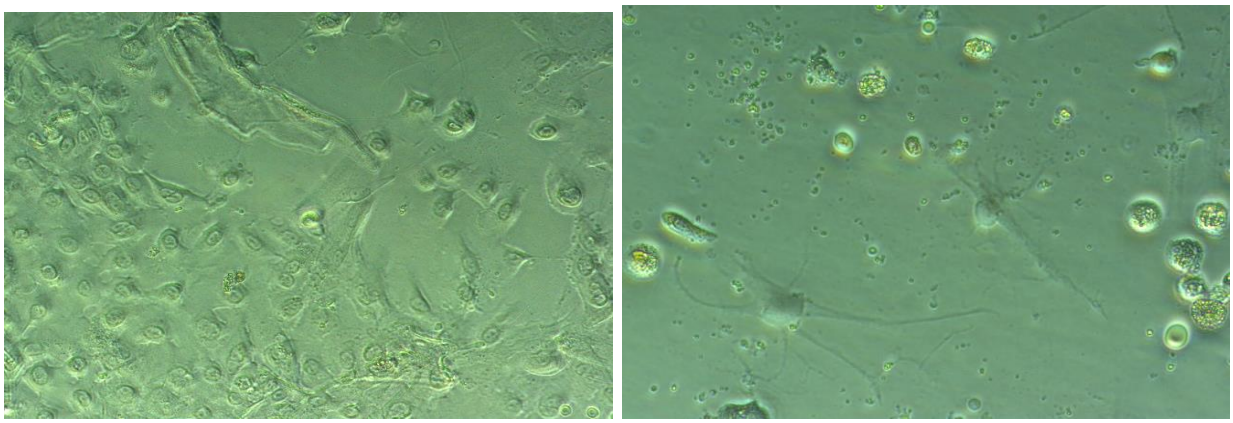

Рис. 4, 5. Гетерогенная клеточная культура меланоциты/кератиноциты, на 3 пассаже. Увеличение ок10хоб40

По результатам проточной цитофлуориметрии (рис. 6) определено, что в гетерогенной клеточной линии преобладающий путь гибели клеток на стадии формирования монослоя (3 пассаж), также является апоптоз:

Content is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 license (CC-BY 4.0)

Количество клеток с признаками ранней стадии активации апоптоза – аннексин *V*-позитивные – 25%.

Количество клеток на эффекторной стадии апоптоза – 1,6%.

Количество клеток, которые погибают по пути клеточного некроза – PI-позитивные – 0,8%.

Количество живых клеток составляет 73%.

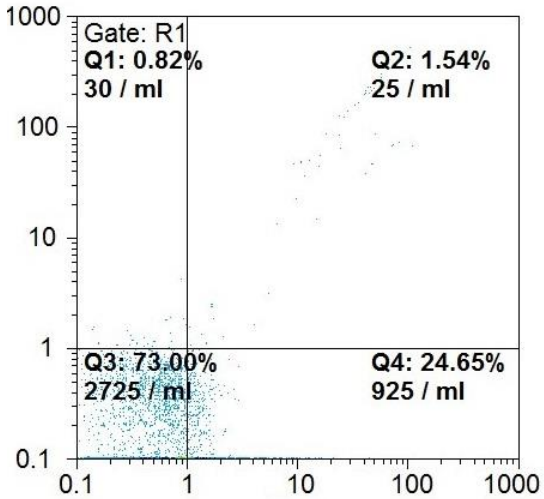

Рис. 6. Анализ путей программируемой клеточной гибели в гетерогенной культуре меланоциты/кератиноциты, 4 пассажа

Морфологический анализ показал (рис. 4, 5, 7), что морфология и размер клеток кератиноциты/меланоциты соответствуют таковым в тканевой структуре дермального пласта в системе *in vivo*, конфлюэнтность достигает 70%.

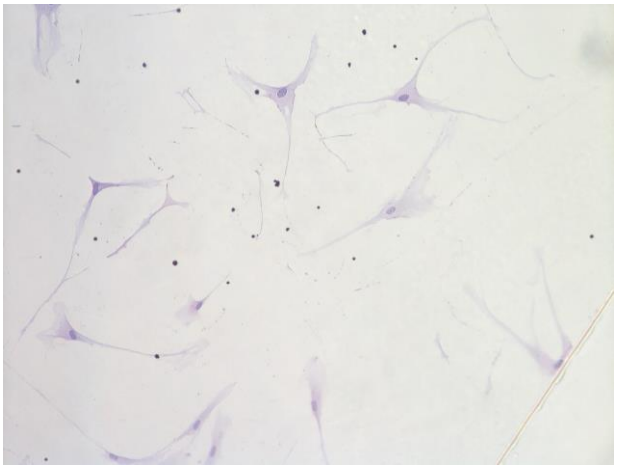

Рис. 7. Гетерогенная клеточная культура меланоциты/кератиноциты, на 3 пассаже. Увеличение ок10хоб40. Окраска гематоксилин-эозин

Содержимое доступно по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 license (CC-BY 4.0)

Кератиноциты округлой и полигональной формы, ядро округлое, в котором 2–3 ядрышка. Меланоциты звёздчатой, чаще трёхгранной отростчатой формы, ядро овальное либо округлое в котором от 3 до 5 ядрышек, цитоплазма содержит пигмент.

Таким образом, по результатам исследования, оптимизация протокола и состава полной среды культивирования обеспечили на этапе выделения из кожного лоскута к первому посеву добиться количества жизнеспособных клеток 95% для линии фибробластов и 70% для гетерогенной культуры – меланоциты/кератиноциты. Определено, что основной путь гибели клеток в системе *in vitro* – апоптоз. Анализ динамики показателей активации различных этапов программируемой клеточной гибели выявил, что отмечается увеличение количества клеток с реализацией позднего этапа апоптоза для фибробластов во втором и пятом пассаже, тогда как на четвёртом пассаже их количество снижается. Для сокультуры меланоциты/кератиноциты характерно снижение проявления позднего этапа аппоптоза на третьем и четвертом пассаже. Реализация раннего этапа увеличивается от третьего пассажа к шестому, отражая активный процесс гибели клеток. Анализ реализации программы клеточного некроза гетерогенной культуры отражает наличие максимального количества V^-негативных/PI^+ позитивных меланоцитов/кератиноцитов на четвёртом пассаже. Для линии фибробластов количество V^-негативных/PI^+ максимально на втором пассаже.

Также обращает на себя внимание, что в большей мере программа апоптоза, с активацией ранней стадии, реализуется в случае сокультивирования, отражая эффект взаимных индукций цитотипов, тогда как количество погибших по пути апоптоза фибробластов в монокультуре на порядок меньше.

Таким образом, совместное культивирование меланоцитов/кератиноцитов определяет меньшее количество клеток, погибших по пути некроза, как характерного признака старения клеточных культур, на ранних этапах культивирования, отражая более позднее наступление старения клеточной гетерогенной линии, в сравнении с монокультурой фибробластов.

Content is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 license (CC-BY 4.0)

Список литературы

1. Блинова М.И. Роль фибробластов в регенерации кожной ткани при заживлении ран / М.И. Блинова, М.Г. Хотин, Н.А. Михайлова // Гены и клетки. – 2017. – Т. XII, вып. №3. – С. 45.

2. Дермальные фибробласты для лечения дефектов кожи / В.Л. Зорин, А.И. Зорина, О.С. Петракова, В.Р. Черкасов // Гены & Клетки. – 2009. – Т. 4, №4. – С. 26–40.

3. Круглова Л.С. Гиперпигментация кожи: современные взгляды на этиологию и патогенез (часть 1) / Л.С. Круглова, Е.В. Иконникова // Российский журнал кожных и венерических болезней – 2017. – №20 (2). – С. 178–183.

4. Культуры клеток в заместительной терапии / Е.М. Петрчук, Н.В. Шалунова, Ю.В. Олефир [и др.] // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2017. – Т. 17, №4. – С. 197–206.

5. Современные методы исследования апоптотической гибели клеток (обзор) / Т.Ф. Сергеева, М.В. Ширманова, Е.В. Загайнова, К.А. Лукьянов // Современные технологии в медицине. – 2015. – Т. 7, №3. – С. 172–182.

6. Тканеинженерные конструкты кожи и использование стволовых клеток для создания кожных эквивалентов (обзор) / А.В. Мелешина, А.С. Быстрова, О.С. Роговая, Е.А. Воротеляк, А.В. Васильев, Е.В. Загайнова // Современные технологии в медицине. – 2017. – №9 (1). – С. 198–218.

7. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – 691 с.

8. Хайдуков С.В. / Подходы к стандартизации метода проточной цитометрии для иммунофенотипирования. Настройка цитометров и подготовка протоколов для анализа // Медицинская иммунология. – 2007. – Т. 9, №6. – С. 569–574.

Содержимое доступно по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 license (CC-BY 4.0)