

*Гилевич И.В., Порханов В.А.***СВОЙСТВА ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ТРАХЕИ, ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ СИНТЕТИЧЕСКОГО КАРКАСА И АУТОЛОГИЧНЫХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА**

ГБУЗ «Научно-Исследовательский институт – Краевая Клиническая больница №1 им. С.В. Очаповского»,

г. Краснодар, Российская Федерация

Резюме. Одним из самых перспективных методов в регенеративной медицине является создание сложных трехмерных конструкций, включающих клетки и каркасы. Разрабатываемые каркасы должны обладать определенными свойствами, одним из которых является биосовместимость. Материалами для изучения служили образцы 6 тканеинженерных конструкций трахеи, полученных на основе синтетического каркаса, засеянного аутологичными мононуклеарными клетками, выделенными из костного мозга пациентов. МТТ-тест выявил жизнеспособность клеток, засеянных на каркас. Тест на дифференциальное окрашивание живых и мертвых клеток позволил визуализировать более 70% живых клеток. С помощью гистологического и иммуногистохимического методов исследования было установлено, что мононуклеарные клетки адгезируют на поверхности синтетического 3D-каркаса, обладают пролиферативной активностью (маркер Ki-67). Таким образом, было показано, что тканеинженерная конструкция трахеи биосовместима с аутологичными мононуклеарными клетками пациента.

Ключевые слова: тканеинженерная конструкция трахеи, синтетический каркас, мононуклеарные клетки, биосовместимость

Введение

Разработка каркасов для тканеинженерных конструкций органов является одной из бурно развивающихся областей регенеративной медицины. К создаваемым каркасам предъявляется ряд требований, наиболее важным из которых является биосовместимость [1, 2, 3]. Основными характеристиками биологически совместимых каркасов должны быть: отсутствие цитотоксичности, сохранение жизнеспособности клеток, поддержание адгезии, фиксации, пролиферации и дифференцировки, помещенных на ее поверхность клеток, отсутствие воспалительной реакции на материал и иммунного ответа [3].

Целью настоящей работы было выявление биосовместимости синтетического каркаса трахеи, засеянного аутологичными мононуклеарными клетками, выделенными из костного мозга пациентов, с помощью анализа жизнеспособности, функциональной и метаболической активности клеток.

Материалы и методы

В работе были использованы образцы 6 тканеинженерных конструкций трахеи. Для получения трехмерной конструкции использовали выделенные автоматическим способом (Serax2, Biosafe, Швейцария) из костного мозга пациентов аутологичные мононуклеарные клетки пациентов и синтетический 3D-каркас (Harvard Apparatus, США), созданный с помощью электроспиннинга. Синтетический 3D-каркас предварительно фиксировали в биореакторе (Harvard Apparatus, США), специально разработанном для выращивания полых органов, затем на каркас наносили выделенную фракцию мононуклеарных клеток.

В биореактор добавляли питательную среду, состоящую из раствора DMEM (Gibco, США) и 10% аутологичной сыворотки пациента. Биореактор устанавливали на 72 часа в CO₂-инкубатор.

Все исследования, включая забор костного мозга у пациентов, проводились на базе Краевой клинической больницы №1, после одобрения локальным этическим комитетом (протокол №45).

Для оценки жизнеспособности клеток на каркасе был выполнен колориметрический метод исследования с помощью МТТ-реактива (Trevigen's TACS® MTT Cell Proliferation Assay) по модифицированному протоколу исследования [4]. Для проведения МТТ-теста были взяты образцы культивируемой тканеинженер-

ной конструкции трахеи размером 0,5x0,5 см², помещены в 24-луночный планшет, была добавлена питательная среда объемом 500 мкл. В каждую из лунок добавляли реагент МТТ объемом 50 мкл, инкубировали 1 час при температуре 37°C, добавляли по 500 мкл 10% раствора додецилсульфата натрия (SDS) в 0.01 М HCl и инкубировали в течение 1 часа. Затем среду из исследуемых образцов переносили в другой 96-луночный планшет. В качестве негативного контроля были использованы образцы каркаса без клеток и питательная среда, для позитивного контроля были использованы мононуклеарные клетки, культивируемые в течение 48 часов в питательной среде (DMEM + 10% аутологичная сыворотка) в 96-луночном планшете, засеянные с плотностью 1x10⁴/мл. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 450 нм на спектрофотометре (SpectraMax 250, Molecular Devices, США).

Дифференциальное окрашивание живых и мертвых клеток на синтетическом каркасе трахеи после 72 часов культивирования производилось с использованием набора LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes, США). Материалом исследования служили образцы тканеинженерной конструкции, отделенные стерильным скальпелем от дистальной части фиксированного каркаса в биореакторе, размером 0,5x0,5 см². Исследование проводили согласно инструкции производителя.

Для морфологической оценки часть образцов тканеинженерной конструкции трахеи после фиксации в 10% нейтральном забуференном формалине и гистологической проводки были заключены в парафин. Полученные парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) флуорофором (Sigma-Aldrich, США).

Имуногистохимический анализ проводили для определения пролиферативной активности засеянных на каркас мононуклеарных клеток по экспрессии антигена Ki-67. Для этой цели была использована система детекции с флуоресцентными вторичными антителами anti-Ki67 antibody (ab16667 Abcam, Англия) по протоколу фирмы-изготовителя.

Статистический анализ выполняли с помощью программы GraphPad Prism, использовали t-критерия Стьюдента для парных сравнений, выражаемый в виде значений достоверности различия — «р», где р<0,05 считалось статистически достоверным.

Результаты и обсуждение

Для определения биологической совместимости синтетического каркаса, засеянного аутологичными мононуклеарными клетками костного мозга пациентов, были исследованы *in vitro* жизнеспособность и метаболическая активность клеток на каркасе, проведено гистологическое исследование образцов тканеинженерной конструкции трахеи, исследование пролиферативной активности клеток на каркасе.

В серии экспериментов, проводимых после трех суток культивирования тканеинженерной конструкции трахеи, была проанализирована жизнеспособность клеток, засеянных на синтетический трахейный каркас, с помощью МТТ-теста.

Значения оптической плотности, измеренные в лунках, содержащих образцы тканеинженерной конструкции трахеи, были сопоставимы со значениями оптической плотностью лунок, содержащих культивированные 72 ч. мононуклеарные клетки (позитивный контроль) и значительно превосходили значения оптической плотности в образцах синтетического каркаса без клеток (негативный контроль). Результат МТТ-теста образцов тканеинженерной конструкции трахеи представлены на рисунке 1.

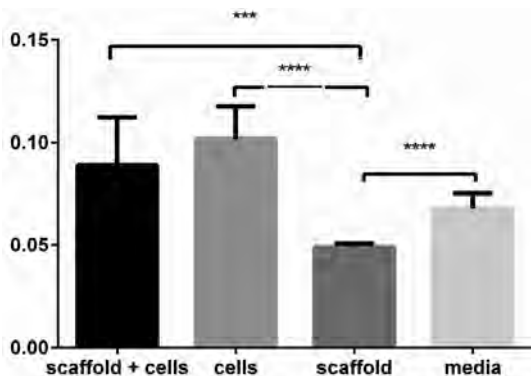


Рис 1. Оценка жизнеспособности МНК на синтетическом каркасе трахеи до имплантации МТТ-тест

** — $P < 0,01$, *** — $P < 0,001$, **** — $P < 0,0001$

Дифференциальное выявление живых (флуоресценция с кальцеином) и мертвых (флуоресценция с гомодимером этидия) клеток, позволило визуализировать более 70% живых клеток (флуоресцирующий зеленым цветом кальцеин), засеянных на синтетический каркас (рис. 2 А-Б).

Окраска гематоксилином и эозином препаратов тканеинженерной конструкции трахеи обнаружила хаотично расположенные волокна полимерного материала и клетки, которые были фиксированы между ними (рис. 2 В-Г). Патологические изменения структуры волокон, клеток не выявлялись.

Ядерный материал был изучен с помощью флуорофора DAPI (рис. 2 Д). В тканеинженерной конструкции ядра клеток активно флуоресцировали и выявлялись в большом количестве.

Обнаруженные клетки в графте обладали пролиферативной активностью, что доказывала флуоресценция клеточных ядер с антителами к маркеру пролиферации – Ki-67 (рис. 2Е).

На основании полученных результатов можно заключить, что тканеинженерная конструкция биосовместима с мононуклеарными клетками. Тем не менее, представляется необходимым продолжить изучение свойств тканеинженерной трахеи.

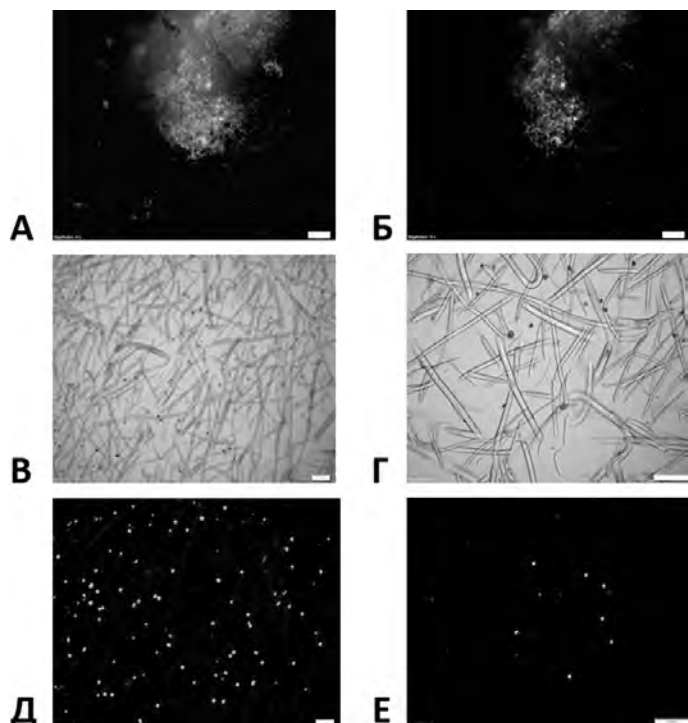


Рис 2. Синтетический каркас, засеянный аутологичными мононуклеарными клетками костного мозга. А, Б: Дифференциальное окрашивание живых и мертвых клеток на синтетическом каркасе. Ув. - x10. В, Г: Окрашка гематоксилин, эозин. Ув.: В – x20; Г – x40. Д: Окрашка флуорофором DAPI. Ув.– x20. Е: Иммуногистохимическая реакция с антителами Ki-67. Увеличение – x40.

Выводы

1. Полученные результаты МТТ-теста и дифференциальное окрашивание живых и мертвых клеток выявили жизнеспособные, метаболически активные клетки на синтетическом каркасе.

2. Морфологическое и иммуногистохимическое исследования показали, что клетки адгезируют на синтетическом каркасе и обладают пролиферативной активностью.

3. Тканеинженерная конструкция трахеи является биосовместимой с аутологичными мононуклеарными клетками костного мозга.

Работа выполнялась в рамках гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в Российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования от 19 октября 2011 г. №11.G34.31.0065.

ЛИТЕРАТУРА

1. Marahaini M., Thirumulu P., M., Ismail Ab R. Genotoxicity evaluation of dental restoration nanocomposite using comet assay and chromosome aberration test // *Nanotechnology*. – 2013. – Vol.24(1). – p. 015105 (13pp).

2. Baiguera S., Macchiarini P., Domenico R. Chorioallantoic membrane for in vivo investigation of tissue engineered construct biocompatibility // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2012. – Vol.100(5). – p.1425-1434.

3. Волова Т. Г. Шишацкая Е. И., Миронов П. В. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии // [Электронный ресурс]: электрон. учеб. пособие– Электрон. дан. (6 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2009.

4. Jungebluth P., Johannes C., Haag J.C., Lim M.L., Lemon G., Sjöqvist S., Gustafsson Y., Ajallouei F., Gilevich I., Simonson O.E., Grinnemo K.H., Corbascio M., Baiguera S., Gaudio C., Strömblad S., Macchiarini P. Verification of cell viability in bioengineered tissues and organs before clinical transplantation // *Biomaterials*. –2013. – Vol.34(16). – p. 4057 – 4067.

Авторская справка

Гилевич Ирина Валериевна
ГБУЗ «Научно-Исследовательский институт – Краевая Клиническая больница №1 им. С.В.Очаповского» министерства здравоохранения Краснодарского края
Врач
Российская Федерация, 350086, г. Краснодар, ул. 1 Мая, 167
giliv@list.ru

Порханов Владимир Алексеевич

ГБУЗ «Научно-Исследовательский институт – Краевая Клиническая больница №1 им. С.В.Очаповского» министерства здравоохранения Краснодарского края
д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, главный врач НИИ-ККБ №1
Российская Федерация, 350086, г.Краснодар, ул. 1 Мая, 167
kpb-opk@mail.ru

Gilevich I.V., Porhanov V.A.

THE PROPERTIES OF TISSUE-ENGINEERED TRACHEA, COMPOSED FROM SYNTHETIC SCAFFOLD SEEDED WITH HUMAN AUTOLOGOUS BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS

SFHI “Research Institute - Regional Clinical Hospital №1”,

Krasnodar, Russian Federation

Abstract. One of the most promising methods in the regenerative medicine is the development of a complex three-dimensional organ, composed of cells and scaffolds. Designed scaffold have to possess general properties, one of which is a biocompatibility. For study 6 samples of tissue-engineered trachea, derived from a synthetic scaffold, seeded with human autologous mononuclear cells from the bone marrow, were used. MTT test showed the viability of the cells seeded on the scaffold. The LIVE and DEAD test allowed visualizing more than 70% living cells. It was found using histological and

immunohistochemical analyses that mononuclear cells adhered on the surface of the synthetic 3D-scaffold and proliferated (Ki-67 marker). Thus, it was shown that the tissue-engineered trachea is biocompatible with human autologous mononuclear cells.

Keywords: tissue-engineered trachea, synthetic scaffold, mononuclear cells, biocompatibility

REFERENCES

1. Marahaini M., Thirumulu P. M., Ismail Ab R. Genotoxicity evaluation of dental restoration nanocomposite using comet assay and chromosome aberration test. *Nanotechnology*. – 2013. – Vol.24(1). – p. 015105 (13pp).

2. Baiguera S., Macchiarini P., Domenico R. Chorioallantoic membrane for in vivo investigation of tissue engineered construct biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2012. – Vol.100(5). – p.1425-1434.

3. Volova T. G. Shishackaja E. I., Mironov P. V. *Materialy dlja mediciny, kletochnoj i tkanevoj inzhenerii*. [Jelektronnyj resurs]: jelektron. ucheb. posobie– Jelektron. dan. (6 Mb). – Krasnojarsk : IPK SFU, 2009.

4. Jungebluth P., Johannes C. Haag J.C., Lim M.L., Lemon G., Sjöqvist S., Gustafsson Y., Ajallouecian F., Gilevich I., Simonson O.E., Grinnemo K.H., Corbascio M., Baiguera S., Gaudio C., Strömblad S., Macchiarini P. Verification of cell viability in bioengineered tissues and organs before clinical transplantation. *Biomaterials*. –2013. – Vol.34(16). – p. 4057 – 4067.

Authors

Gilevich Irina V.

Research Institute - Regional Clinical Hospital №1, Krasnodar, Russia st. 1 Maya 167, Krasnodar, 350086, Russian Federation

MD

gilliv@list.ru

Porhanov Vladimir A.

Research Institute - Regional Clinical Hospital №1, Krasnodar, Russia st. 1 Maya 167, Krasnodar, 350086, Russian Federation

MD, PhD, professor, the head of SCI-RCH#1

kkb1@mail.ru

УДК: 616-155

Иволгин Д.А., Енукашвили Н.И., Айзеништадт А.А., Адылов Ш.Ф. **МОДИФИКАЦИЯ УСЛОВИЙ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

ГБОУ ВПО «Северо-Западный Государственный Медицинский Университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России,

НИЛ Клеточных технологий, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

ООО Покровский Банк Стволовых клеток, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Резюме. Культивирование стволовых клеток пуповинной крови (ПК) является одним из перспективных направлений по улучшению приживления, а, следовательно, повышению эффективности терапии. Для успешного культивирования необходим подбор ряда условий, что являлось целью данной работы. Было изучено влияние коэффициента разведения ПК буфером PBS (HyClone), содержащим 0,02% ЭДТА, а также влияние используемого при разведении буфера (раствор Хэнкса, HyClone+0,02%ЭДТА или PBS+0,02% ЭДТА) на чистоту выделения и жизнеспособность клеток, выделенных из 18 образцов ПК и культивированных. При подборе коэффициента разведения препаратов ПК установлено, что оптимальным для буфера PBS+0.02% ЭДТА перед центрифугированием на фиколле является разведение 1:1. При больших разведениях увеличивается процент CD34+ клеток в мононуклеарной фракции до и после сепарации (96–99% против 91% при разведении 1:1), однако снижается жизнеспособность клеток (34% при разведении 1:3 против 75% при разведении 1:1). Концентрация клеток через трое суток культивирования возросла до $8 \cdot 10^4$ – 10^5 кл/мл, причем процент CD34+ клеток составлял 100%. Из CD34+ клеток 80% являлись CD133+, КОЕ-тест показал, что на 7 день культивирования в метилцеллюлозной среде 85% составляют CFU-GM, 1.3% — CFU-M, 5.1% — CFU-G и 11.5% — BFU-E+CFU-E. Следует отметить появление к 7 дню культивирования фибробластоподобных клеток в колониях, что говорит о присутствии других стволовых и прогениторных клеток в препаратах. Таким образом, подобранные условия пробоподготовки позволили выделить гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) из свежей ПК с высокой степенью очистки (91-99%), с высоким пролиферативным потенциалом.

Ключевые слова: стволовые клетки, пуповинная кровь, ex vivo экспансия, CD34+ клетки

Введение

В мире, по различным оценкам, выполнено более 35 000 трансплантаций пуповинной крови (ТПК) для лечения больных с различными заболеваниями [1]. Образцы пуповинной крови (ПК) имеют высокую концентрацию мультилинейных гемопоэтических клеток-предшественников; однако, общий объем ПК невелик (как

правило, 60–100 мл), что приводит к задержке восстановления кроветворения [2]. Известно, что высокая доза общего количества ядросодержащих клеток (ОЯК) и большое количество CD34+ клеток в трансплантате ПК повышают вероятность успешного приживления [3]. Общепринято, что доза клеток определяется с учетом массы тела (в кг) реципиента. В то время как у маленьких детей при трансплантации ПК может быть достигнута высокая доза клеток ПК, то у взрослых достаточная доза клеток ПК может быть достигнута не всегда. Таким образом, необходимы новые стратегии по ускорению и обеспечению приживления [4]. Одним из основных подходов к улучшению приживления ПК является культивирование (экспансия) ПК ex vivo, чтобы получить большее количество гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) перед трансплантацией.

В Покровском Банке Стволовых Клеток (ПБСК) ведется работа по подбору условий для роста в культуре ГСК, выделяемых как из свежего, так и из размороженного концентрата ПК. Основными требованиями, предъявляемыми при этом к культуре, являются: 1) увеличение числа клеток, 2) сохранение стволовости, 3) сохранение кариотипа (отсутствие хромосомных перестроек).

Цели работы

Подобрать условия выделения и очистки, а также культивирования ГСК, полученных из свежей ПК, для увеличения их количества, при сохранении стволовости.

Материалы и методы

Препараты пуповинной крови

ГСК выделяли из образцов ПК (n=18), предназначенных для утилизации по причине непригодности для хранения (малый объем образца, низкое количество лейкоцитов) или отказа пациентки от хранения.

Выделение ГСК

Использовался метод выделения мононуклеарной фракции на градиенте фиколла с последующей сепарацией с использованием конъюгированных с магнитными частицами антител к поверхностному маркеру CD34 (Miltenyi Biotec, Германия). В процессе отработки методики выделения мононуклеарной фракции в гра-