

На правах рукописи

Островский Дмитрий Сергеевич

**РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ КОНСТРУИРОВАНИЯ
ИСКУССТВЕННОЙ РОГОВИЦЫ НА ОСНОВЕ 3D КЛЕТОЧНЫХ
СФЕРОИДОВ И ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ**

14.03.03 - патологическая физиология

14.01.24 – трансплантология и искусственные органы

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2018

Работа выполнена в лаборатории клеточной биологии и патологии развития Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» и в Центре фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем Федерального государственного автономного учреждения "Национальный медицинский исследовательский центр "Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Минздрава России

Научные руководители:

Сабурина Ирина Николаевна - доктор биологических наук, заведующая лабораторией клеточной биологии и патологии развития Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

Борзенко Сергей Анатольевич - доктор медицинских наук, профессор, заведующий Центром фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем Федерального государственного автономного учреждения "Национальный медицинский исследовательский центр "Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Минздрава России

Официальные оппоненты:

Темнов Андрей Александрович - доктор медицинских наук, заместитель заведующего лабораторией специальных клеточных технологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)».

Перова Надежда Викторовна - доктор биологических наук, заместитель директора по научно-практической работе автономной некоммерческой организации «Институт медико-биологических исследований и технологий».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2019 года в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 001.003.01 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,
по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, дом 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИОПП».
Диссертация размещена на сайте института ФГБНУ «НИИОПП» www.niioopp.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 2018 г.

Учёный секретарь

Диссертационного совета Д 001.003.01

кандидат медицинских наук

Скуратовская Л.Н.

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

По данным Всемирной организации здравоохранения, заболевания роговицы являются одной из основных причин слепоты во всем мире и находятся на 4-ом месте в структуре инвалидности по зрению (World Health Organization, 2017). Примерно 25% от общего числа больных составляют помутнения роговицы, приводящие к частичной или полной потере зрения (Либман Е.С., Калеева Э.В., Рязанов Д.П., 2012). Традиционно, при лечении таких патологических состояний применяют методы сквозной или послойной кератопластики с использованием трупного донорского материала (Борзенко С.А., 1988–2018). В наиболее тяжелых случаях прибегают к кератопротезированию – замене мутной оптической части роговицы искусственным прозрачным материалом (Мороз З.И., 1987; Калинин Ю.Ю., 2004; Борзенко С.А., 2012; Cardon H., 1964; Huang Y.C., 2011). Однако возможности кератопластики ограничиваются дефицитом трупного донорского материала, а современное кератопротезирование не позволяет гарантированно избежать отторжения кератопротеза (Джавришвили Г.В., 2004).

В связи с этим, во всем мире проводятся научные исследования в области разработки искусственной роговицы – ткани, созданной методами биоинженерии, и обладающей прочностными, оптическими и трансплантационными свойствами, идентичными натуральной роговице (Борзенко С.А., Сабурин И.Н., 2012; Poliseti N., Islam M.M., Griffith M., 2013; Борзенко С.А., Сабурин И.Н., Островский Д.С. и др., 2018).

В зависимости от степени поражения структур переднего сегмента глаза тканевые эквиваленты роговицы могут иметь различные составные компоненты и, соответственно, представлять собой: эквивалент стромы роговицы для передней послойной кератопластики, эквивалент комплекса «строма + задний эпителий» для задней послойной кератопластики, эквивалент всех слоев роговицы для сквозной кератопластики (Yamato M., Hayashida Y., Watanabe K., 2004; Lai J.Y., Chen K.H., Hsiue G.H., 2007).

Для создания каждого слоя роговицы *in vitro* используются различные источники донорского клеточного материала и техники конструирования, наиболее распространенной из которых является культивирование клеток роговицы на искусственном внеклеточном матриксе (Parke-Houben R., Fox C.H., Zheng L.L. et al., 2015; Mirazul I.M., Cèpla V. et al., 2015). Передний и задний эпителиальные слои культивируются в двухмерных (2D) условиях на пленках – эквивалентах передней (боуменовской) и задней (десцеметовой) пограничных мембран, а клетки стромы роговицы – в трехмерных условиях (3D) (Takezawa T., Nishikawa K., Wang P.C., 2011; Yoshida J., Oshikata-Miyazaki A., Yokoo S. et al., 2014).

Одним из наиболее перспективных материалов для тканевой инженерии, выполняющих функцию матрикса, является шелк паутиной нити. Основной структурный белок паутиной нити – фибриллярный белок фиброин, характеризуется высокой прочностью на разрыв и эластичностью, а также высокой биосовместимостью и заданной биodeградируемостью (Агапов И.И., Пустовалова О.Л., Мойсенович М.М. и др., 2009; Агапова О.И., 2016; Altman G.H., Diaz F., Jakuba C., et al., 2003; Nazarov R., Jin H.J., Kaplan D.L., et al., 2004; Kim U.J., Park J., Kim H.J., et al., 2005; Bogush V.G., Sokolova O.S., Davydova L.I., et al., 2009). Такие матриксы способны поддерживать рост и адгезию клеток в течение длительного времени и сохранять высокий уровень их жизнеспособности при культивировании.

С учетом изученной литературы нам представляется возможным конструирование искусственной роговицы с использованием клеточных технологий и на основе полимерных материалов. Современные методы 3D культивирования клеток позволяют достигать образования прозрачного естественного внеклеточного матрикса *in vitro* с помощью вариаций инкубационных условий (Zhihua Z., Guoguang N., Jin S.C., et al., 2014). Многоклеточный сфероидный микроагрегат - 3D сфероид – форма клеточной культуры, которая по своим свойствам (фенотип клеток, пространственная организация, функциональность) приближается к нативной ткани (Сабурина И.Н., Репин В.С. 2009). При определенных условиях клетки синтезируют естественный внеклеточный матрикс, что делает их подходящими для конструирования искусственной роговицы (Byun Y.S., Tibrewal S., Kim E. et al., 2014).

Вышеизложенное подчеркивает актуальность, научную и практическую значимость проблемы и определяет цель настоящего исследования.

Цель работы: Разработка методологических подходов к конструированию искусственной роговицы на основе культивированных клеток трупной донорской роговицы в виде 3D клеточных сфероидов и полимерных материалов.

Задачи исследования:

1. Разработать протокол выделения кератоцитов и клеток заднего эпителия (роговичного эндотелия) из трупной донорской роговицы человека.

2. Изучить в эксперименте *in vitro* особенности формирования 3D клеточных сфероидов из выделенных кератоцитов и клеток заднего эпителия (роговичного эндотелия) человека.

3. Изучить в эксперименте *in vitro* биосовместимость полимерных материалов, пригодных для конструирования искусственной роговицы.

4. Изучить в эксперименте *in vitro* адгезивные свойства полученных 2D и 3D клеточных культур к отобранному полимерному материалу.

Научная новизна

1. Впервые предложен оригинальный метод выделения кератоцитов роговицы человека, который позволяет получать статистически более высокий выход жизнеспособных клеток и сохранять их выживаемость для дальнейшего культивирования. Показано, что оптимальным методом выделения клеток заднего эпителия роговицы человека является эксплантационный.

2. Впервые показано, что добавление L-аскорбиновой кислоты в полную питательную среду на основе DMEM/F12, содержащей 5% эмбриональной телячьей сыворотки, фактора роста фибробластов при сроке культивирования 35 суток, способствует максимальному накоплению внеклеточного матрикса коллагена 1, 3, 5 и 6 типов, а также увеличению основных белков малых лейцин-богатых протеогликанов (кератокансульфата и люмикана) и снижению экспрессии нехарактерных белков (α -гладкомышечного актина и виментина) в 3D клеточных сфероидах кератоцитов.

3. Впервые показана возможность использования пленок фиброина шелка как материала с наилучшими адгезивными свойствами в сочетании с 3D сфероидами из кератоцитов для создания слоистой структуры элементов искусственной роговицы.

4. Впервые доказано, что 3D клеточные сфероиды являются наиболее оптимальной структурой в сравнении с 2D культурой клеток роговицы человека, и могут быть использованы при конструировании эквивалентов искусственной роговицы.

Теоретическая и практическая значимость

1. Разработанный протокол выделения кератоцитов включает два этапа: механическая деструкция с последующей щадящей ферментативной дезагрегацией стромы роговицы, позволяющая увеличивать получаемое количество жизнеспособных клеток на 23% в сравнении со стандартным протоколом ($p \leq 0,05$).

2. Впервые показано, что при культивировании клеток заднего эпителия роговицы в полной питательной среде на основе DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки в течение 35 суток сохраняется их гексагональная структура и пролиферативная активность.

3. Впервые показано, что при создании 3D сфероидов из клеток роговицы человека, а именно кератоцитов и клеток заднего эпителия, для сохранения характерного фенотипа и жизнеспособности, оптимальным является 1000 и 500 клеток в одном сфероиде соответственно.

4. Разработан протокол создания эквивалента искусственной роговицы в виде слоистой структуры на основе пленок из фиброина шелка и 3D сфероидов из кератоцитов роговицы человека.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Предложенный протокол выделения и культивирования кератоцитов и клеток заднего эпителия роговицы позволяет увеличивать количество получаемых клеток, сохранять характерный фенотип и высокую пролиферативную активность.

2. Условия 3D клеточного культивирования, позволяющие получать сфероиды из кератоцитов (1000 клеток на сфероид) и клетки заднего эпителия роговицы (500 клеток на сфероид), обладают высокой жизнеспособностью и сохранным фенотипом и способны синтезировать внеклеточный матрикс из коллагенов 1, 3, 5, 6 типов.

3. Полимерный материал фиброин шелка обладает высокой биосовместимостью с кератоцитами, а культивирование 3D клеточных сфероидов на пленках из фиброина шелка с последующим наслаиванием друг на друга, позволяет получать слоистую структуру с равномерным распределением клеток.

Публикации по теме диссертации

Всего по теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, 4 из которых – в журналах, рекомендованных ВАК для публикации основных научных результатов по теме диссертации.

Структура и объём диссертации

Текст диссертации изложен на 145 страницах, содержит 19 таблиц и 55 рисунков. Работа состоит из введения и 3 глав, включающих обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, содержит общее заключение, выводы и практические рекомендации. Список литературы состоит из 257 источников, включающих 18 отечественных и 239 иностранных публикаций.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в постановке задач исследования и разработке концепции, осуществлял сбор материала для исследования, выполнял стендовые и экспериментальные исследования. Автором самостоятельно сформирована база данных, проведена статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных результатов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование было проведено на базе Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. С.Н. Федорова» Минздрава России и включало в себя 5 этапов.

1 этап. Выделение первичной клеточной культуры кератоцитов и клеток заднего эпителия

В работе использовали клеточную культуру, выделенную из стромальной части роговицы - кератоциты и клетки заднего эпителия роговицы.

Первичная культура клеток кератоцитов была получена из постмортальных роговиц (n=7) 2 способами: контрольная группа - кератоциты, полученные методом, предложенным Funderburgh M.L. в 2005 году (Funderburgh M.L., DuY., Mann M.M., et al. 2005), опытная группа - кератоциты, полученные оригинальным методом выделения.

Первичная культура клеток заднего эпителия была получена методом эксплантационного культивирования. Для этого десцеметову мембрану (n=27) с клетками заднего эпителия переносили в чашку Петри d=35 мм и добавляли 500 мкл питательной среды.

Заключительным этапом выделения первичной клеточной культуры кератоцитов и клеток заднего эпителия стало определение общего количества и процента жизнеспособных клеток.

2 этап. Подбор питательной среды для клеточных культур Подбор питательной среды для 2D культуры кератоцитов

Подбор оптимального состава среды для культивирования кератоцитов осуществлялся в 2 этапа.

На 1 этапе проводили подбор базовой питательной среды. Для этого фрагменты роговиц (n=5), обработанные по оригинальной методике, переносили в чашки Петри d=35 мм с одной из исследуемых питательных сред (DMEM с низким содержанием глюкозы, MEM, *a*MEM, DMEM/F12). Спустя 3-е суток полученную культуру клеток подвергали ферментативной обработке 0,25% раствором Трипсин-Версена и производили подсчет количества клеток.

На 2-м этапе осуществляли подбор компонентов, необходимых для культивирования кератоцитов, а именно, изучали влияние количественного содержания эмбриональной телячьей сыворотки и фактора роста фибробластов на пролиферативную активность, а также фенотип кератоцитов. В качестве базовой питательной среды использовали DMEM/F12.

Подбор питательной среды для 2D культуры клеток заднего эпителия роговицы

Для подбора оптимальной культуральной среды для клеток заднего эпителия роговицы полученные фрагменты десцеметовой мембраны с клетками заднего эпителия культивировали, используя базовые среды DMEM/F12; M199; смесь среды DMEM/F12 и M199 с добавлением необходимых компонентов 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2мМ L-глутамина и 1% раствор антибиотиков.

3 этап.3D клеточное культивирование

Метод получения 3D клеточных сфероидов был однотипным для получения сфероидов как из кератоцитов (4-го пассажа; 1000 клеток в сфероиде), так и из клеток заднего эпителия (2-ой пассаж; 500 клеток в сфероиде). Культивирование сфероидов из кератоцитов осуществлялось в 4-х различных по составу средах на основе базовой среды DMEM/F12 с 5%-ным содержанием эмбриональной телячьей сыворотки. Различие сред заключалось в содержании фактора роста фибробластов и L- аскорбиновой кислоты.

Сфероиды из клеток заднего эпителия роговицы культивировали на полной питательной среде, подобранной на 2-ом этапе.

Культивирование осуществлялось при стандартных условиях, смена среды проводилась каждые 2-е суток. Срок наблюдения для 3D клеточных сфероидов кератоцитов составил 35 суток, для 3D клеточных сфероидов клеток заднего эпителия роговицы – 14 суток.

Иммуногистохимические исследования полученных 2D и 3D клеточных культур

Для анализа 2D клеточных культур изучали экспрессию характерных маркеров кератоцитов (кератансульфата, кератокана, люмикана), характерного маркера миофибробластов – α -гладкомышечного актина, а также характерных функциональных белков клеток заднего эпителия роговицы – Na/K АТФазы, люмикана, ZO-1.

Для анализа 3D клеточных сфероидов, помимо вышеуказанных маркеров, изучали экспрессию маркеров внеклеточного матрикса – коллагенов 1, 3, 5 и 6 типов и маркера цитоскелета (виментин).

Протокол проведения иммуногистохимического анализа для 2D и 3D клеточных культур был одинаков и включал в себя следующие этапы: фиксацию материала, пермобилизацию клеток, окраску первичными антителами, окраску вторично-меченными антителами, контрастирование клеточного ядра, заключение препарата под покровное стекло.

Исследование производили на инвертированном лазерно-сканирующем конфокальном микроскопе OlympusFV 10i.

4 этап. 2D культивирование кератоцитов на полимерных материалах

Для подбора оптимальных материалов были использованы следующие образцы полимерных материалов: фиброин шелка, гидроксипропанметакрилат (ГЭМА), олигоуретанметакрилат (ОУМА), полиметилметакрилат (ПММА). Все полученные образцы материалов имели одинаковую форму диаметром 10 мм и толщиной 0,5 мм.

Для исследования биосовместимости полученных образцов были сформированы 5 групп: 4 опытные группы, содержащие исследуемый материал, и 1 контрольная группа - полистирол (культуральный пластик). Исследуемый материал переносили в 24-х луночные культуральные планшеты и добавляли суспензию кератоцитов в расчете 2×10^3 клеток в каждую лунку. Культивировали в полной ростовой среде в течение 6 суток, смена среды проводилась однократно на 3-и сутки. Для оценки пролиферативной активности кератоцитов на исследуемом материале каждые сутки клетки ферментативно снимали с 4-х лунок планшетов каждой группы, центрифугировали и проводили подсчет.

5 этап. 2D и 3D культивирование кератоцитов на фиброине шелка

На данном этапе изучали особенности культивирования 2D и 3D культур кератоцитов на фиброине шелка ($n=100$) с целью последующего создания слоистой структуры стромы искусственной роговицы.

Для проведения 2D культивирования с культурой кератоцитов полученные пленки фиброина шелка ($d=18$ мм) фиксировали между клипсами, далее к полученной конструкции добавляли суспензию клеток кератоцитов 4-го пассажа в концентрации 5×10^4 на одну пленку ($n=30$). Для 3D культивирования использовали 50 сфероидов на одну пленку ($n=30$). Культивирование проводили в полной ростовой среде (DMEM/F12, 5% эмбриональной телячьей сыворотки, 1 мг/мл L-аскорбиновой кислоты, 2мМL-глутамина, 1% микст р-ра антибиотиков) в течение 7-ми суток.

Для создания слоистой структуры стромальной части роговицы пленки фиброина шелка ($n=40$) с 3D клеточными сфероидными (50 сфероидов на одну пленку) культивировали в полной ростовой среде, срок культивирования составил 7 суток. Далее материал извлекали из клипс и наслаивали друг на друга, срок культивирования составил 7 суток.

После истечения срока культивирования проводили детекцию токсического действия материала на клетки, используя метод «ДНК- комет».

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1 этап. Результаты получения первичных клеточных культур Кератоциты

Разработанная в настоящей работе оригинальная методика отличается от общепринятой методики, предложенной M.L. Funderburgh (2005) уменьшением механического повреждения и времени ферментативной дезагрегации стромы роговицы.

При изучении первичной клеточной культуры кератоцитов, полученной по методу Funderburgh, было отмечено, что на первые сутки культивирования выделенная культура была представлена единичными клетками, имеющими округлую форму, адгезия отсутствовала. На вторые сутки была выявлена частичная адгезия клеточной культуры, при этом наблюдалось большое количество неадгезированных клеток.

Разработанный протокол оригинального метода выделения включал схожие этапы с протоколом культивирования по Funderburgh, такие как механическое удаление клеток переднего и заднего эпителия роговицы и выкраивание центральной зоны. Однако, имел и существенные отличия, такие как более щадящая механическая и ферментативная дезагрегация, что не вызывало выраженного клеточного ответа на повреждение и, тем самым, способствовало сохранению жизнеспособности клеток.

При оригинальном методе выделения после краткосрочной обработки р-ром коллагеназы 2 типа, фрагмент переносили в чашку Петри с добавлением культуральной среды. Спустя 12 часов фрагмент был полностью диссоциирован на одиночные клетки, находящиеся в большой концентрации.

С помощью автоматического счетчика клеток проводили подсчет полученных клеточных культур. Количество полученных клеток с использованием методики по Funderburgh составило $6,3 \pm 0,76$, а при использовании оригинальной методики – $8,7 \pm 1,04$. Жизнеспособность полученных клеточных культур оценивали с помощью проточного цитофлуориметра CytoFlex с использованием набора «Live and Dead» (Рис. 1). На диаграмме показано, что количество жизнеспособных клеток в группе, выделенной по методике Funderburgh, составило 64,13%, а по оригинальной – 86,05%.

Таким образом, предложенный оригинальный метод выделения кератоцитов позволяет получить статистически достоверный более высокий выход жизнеспособных клеток и повысить их выживаемость. Дальнейшее проведение работы проводилось на культуре клеток, полученных оригинальным методом выделения.

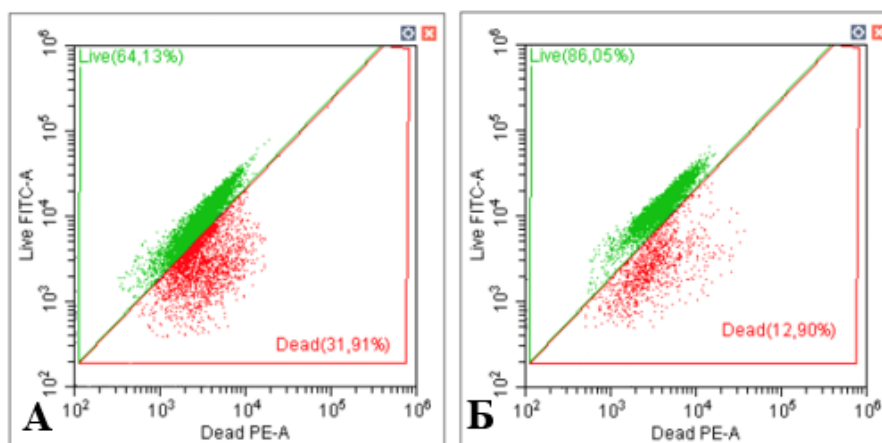


Рисунок 1. Определение жизнеспособности полученных клеточных культур. А – жизнеспособность клеточной культуры, полученной по методике M.L. Funderburgh; Б – жизнеспособность клеточной культуры, полученной по оригинальной методике. *Проточная цитофлуориметрия.*

Клетки заднего эпителия роговицы

Для получения первичной культуры клеток заднего эпителия роговицы использовали эксплантационный метод.

2 этап. Подбор питательной среды для клеточных культур.

2D культивирование кератоцитов

При подборе оптимального состава среды для 2D клеточного культивирования кератоцитов, полученных по оригинальной методике выделения, оценивали морфологические особенности клеточных культур, а также проводили подсчет количества клеток в контрольные сроки наблюдения. При сопоставлении совокупности полученных данных делали вывод о наиболее оптимальных составах сред для 2D культивирования кератоцитов.

Подбор оптимальной питательной среды для культивирования кератоцитов проводили в 2 этапа. На первом этапе осуществляли подбор базовой среды для культивирования первично выделенной клеточной культуры кератоцитов.

Было проведено сравнение наиболее распространенных базовых сред, используемых для культивирования кератоцитов, представленных в доступной литературе: DMEM с низким содержанием глюкозы, MEM, α MEM, DMEM/F12, при этом была изучена адгезия клеток и изменение их морфологии. Полученные результаты оценивали на 1-е и 3-и сутки культивирования.

Полученные результаты показали, что в базовой среде DMEM с низким содержанием глюкозы наблюдалась адгезия клеток небольшими конгломератами уже на первые сутки культивирования, но к концу вторых суток наблюдалось открепление клеток и их деструкция в среде. На 3-и сутки в культуре детектировались единичные прикрепленные клетки с большим количеством дебриса в среде.

При культивировании в базовых средах MEM и *a*MEM были получены схожие результаты. Так на 1-е сутки культивирования отмечалась адгезия клеток к поверхности культурального пластика в виде небольших конгломератов. На 3-и сутки морфология клеток изменялась, клетки приобретали фибробластоподобную морфологию, что являлось косвенным свидетельством потери фенотипа кератоцитов.

Наилучшие результаты были получены при использовании среды DMEM/F12. На 1-е сутки культивирования наблюдалась адгезия большого количества выделенных клеток. На 3-и сутки была получена 90%-ная конfluence в культуре, при этом полученные клетки имели морфологию характерную для кератоцитов.

В группе, содержащей базовую среду DMEM/F12, отмечалось получение достоверно большего количества клеток в сравнении с группами, содержащими базовые среды: *a*MEM, MEM и DMEM с низким содержанием глюкозы ($p \leq 0,05$). Дальнейший подбор оптимального состава полной питательной среды проводили на базовой среде DMEM/F12 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки, фактора роста фибробластов, раствора антибиотиков и L-глутамин.

На втором этапе было проведено исследование влияния дополнительных компонентов на культивирование кератоцитов. Изучалось влияние различных концентраций эмбриональной телячьей сыворотки и фактора роста фибробластов. Оценку результатов подбора (4-ый пассаж клеточной культуры) проводили по следующим критериям: количество полученных клеток и сохранность фенотипа кератоцитов.

Полученные результаты показали, что адгезия клеток наблюдалась на всех типах сред на 1-е сутки культивирования. По достижении 90%-ной конfluence проводили пассирование клеточной культуры раствором Трипсин-Версена и его последующей инактивацией питательной средой, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Дальнейшее культивирование проводили в полной питательной среде в соответствии с группой исследования.

Для поддержания пролиферативной активности клеток необходимо добавление эмбриональной телячьей сыворотки в разных объемных концентрациях в зависимости от вида клеток. Нами было выявлено, что оптимальная концентрация эмбриональной телячьей сыворотки, необходимая для поддержания пролиферативной активности кератоцитов, составляет 5%. При этом при 2%-ной концентрации эмбриональной телячьей сыворотки пролиферация клеток была недостаточной для многократного пассирования, а при увеличении концентрации эмбриональной телячьей сыворотки до 10%, при достоверно большем количестве получаемых кератоцитов, отмечалось

изменение их фенотипа, а именно, вытягивание и приобретение веретенообразной формы.

Добавление фактора роста фибробластов в полную питательную среду достоверных различий в сравнении с группами, не содержащими фактора роста фибробластов, не выявило.

Для оценки фенотипа полученных 2D клеточных культур проводили иммуногистохимический анализ. Было выявлено, что клетки, культивируемые в средах, содержащих 5% эмбриональной телячьей сыворотки и 5% эмбриональной телячьей сыворотки с добавлением фактора роста фибробластов, экспрессируют характерные маркеры кератоцитов: кератокан, кератансульфат, люмикан. При этом экспрессия α -гладкомышечного актина, характерного для миофибробластов, отсутствовала. В средах, содержащих 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 10% эмбриональной телячьей сыворотки с добавлением фактора роста фибробластов, наоборот, отмечалась экспрессия α -гладкомышечного актина, а экспрессия характерных маркеров кератоцитов в данных группах исследования отсутствовала. Таким образом, наиболее оптимальными прописями для культивирования кератоцитов являются среды, содержащие 5% эмбриональной телячьей сыворотки и 5% эмбриональной телячьей сыворотки с добавлением фактора роста фибробластов. Увеличение процентного содержания эмбриональной телячьей сыворотки в среде приводило к статистически значимому количеству получаемых клеток, однако, при этом наблюдалась их дифференцировка в миофибробласты.

В связи с сохранением фенотипа кератоцитов дальнейшее проведение экспериментов проводили в средах, содержащих 5% эмбриональной телячьей сыворотки и 5% эмбриональной телячьей сыворотки с добавлением фактора роста фибробластов.

2D культивирование клеток заднего эпителия роговицы

Для подбора оптимального состава среды для культивирования клеток заднего эпителия роговицы, согласно литературным данным, использовали две наиболее распространенные базовые среды (DMEM/F12; M199) и их комбинацию (DMEM/F12 и M199 (0,5:0,5:1)) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки.

При культивировании десцеметовой мембраны в среде, включавшей базовую пропись DMEM/F12, на 1-е сутки отмечали постепенную потерю исходных клеток заднего эпителия роговицы. Параллельно с данным процессом наблюдалась пролиферация оставшихся клеток на культивируемой мембране. При полном покрытии десцеметовой мембраны клетками заднего эпителия (6-10 сутки) наблюдалась их постепенная миграция на поверхность культурального пластика с последующей адгезией к нему. Пролиферация клеток наблюдалась как от единичных прикрепленных клеток, так и сплошной

линией, характерной для эпителиальных клеток. При оценке морфологии клеток, отмечалось увеличение их размеров, при этом наблюдалось сохранение гексагональной формы клеток, характерной для заднего эпителия роговицы. Вытягивания клеток в сторону формирования фибробластоподобной формы отмечено не было. По достижении 90%-ой конфлюентности клетки пассировали.

При культивировании клеток в прописи, включавшей базовую среду M199, на 1-е сутки отмечали образование бесклеточных участков на десцеметовой мембране. Дальнейшее культивирование показало, что на 5-е сутки происходило увеличение общего количество клеток на десцеметовой мембране, однако, клетки меняли свой фенотип, вытягивались, и, при миграции на пластик, не сохраняли свой эпителиальный фенотип. При пассировании полученных клеточных культур отмечали сохранение фибробластоподобной морфологии.

При культивировании в прописи, включавшей базовую среду DMEM/F12 и среду M199 в соотношении 1:1, наблюдалась постепенная потеря клеток на десцеметовой мембране. Далее, к 12-ти суткам культивирования отмечалась полная потеря клеток заднего эпителия роговицы.

Для проведения иммуногистохимического исследования проводили анализ полученных клеточных культур 2-го пассажа в средах DMEM/F12 и M199. Для эталонного сравнения морфологии полученных клеточных культур использовали нативные клетки заднего эпителия трупной донорской роговицы человека. Для этого роговицу фиксировали в искусственной передней камере, используя микротом, удаляли 2/3 объема стромы роговицы, полученную десцеметову мембрану переносили в чашку Петри d=35 мм с расположенными вверх клетками заднего эпителия. Далее проводили иммуногистохимическое окрашивание.

Было обнаружено, что нативная культура клеток заднего эпителия роговицы экспрессирует маркер люмикан и Na/K АТФазу, в единичных клетках детектировалась экспрессия промежуточного филамента цитоскелета – виментина. В исследуемой нативной культуре клеток была выявлена нехарактерная экспрессия α -гладкомышечного актина в ядре, в то время, как известно, что специфическим местом локализации данного маркера является цитоплазма клетки.

Иммуногистохимическое исследование полученных клеточных культур (среда DMEM/F12) показало, что культивируемые клетки способны сохранять нативный фенотип. Так, была показана экспрессия Na/K АТФазы, люмикана и виментина. Кроме того, была выявлена детекция маркера плотных межклеточных контактов ZO-1, подтверждающего эпителиальную природу

полученных клеток. Экспрессия α -гладкомышечного актина также была обнаружена в ядре клетки.

Иммуногистохимическое исследование клеточной культуры, полученной при культивировании в среде M199, выявило изменение клеточного фенотипа, что соответствовало данным световой микроскопии. Было выявлено отсутствие экспрессии белка ZO-1, наблюдалась низкая экспрессия характерных белков Na/K АТФазы и люмикана, а экспрессия α -гладкомышечного актина была аналогична нативным клеткам.

Для сравнительного анализа полученных данных использовали программное обеспечение CellProfiler. Было показано, что экспрессия α -гладкомышечного актина была сопоставимой в исследуемых группах и нативном клеточном материале. Экспрессия промежуточного филамента виментина и люмикана в полученных культурах была достоверно больше, чем в нативной культуре, однако, статистически значимой разницы между клеточными культурами, полученными в средах DMEM/F12 и M199 выявлено не было. Исследование Na/K АТФазы показало достоверное увеличение экспрессии данного маркера в культуре клеток, полученных в среде DMEM/F12. Статистической разницы между нативной культурой клеток и культурой клеток полученной в среде M199 выявлено не было (Рис. 2).

Таким образом, наиболее оптимальной средой для культивирования клеток заднего эпителия роговицы, является пропись № I, содержащая DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Полученные результаты подтвердили экспрессию характерных маркеров исследуемых клеток, а именно, Na/K АТФазы и люмикана, а также маркера эпителиальных клеток ZO-1. При этом экспрессия α -гладкомышечного актина была аналогична его экспрессии в нативной культуре клеток.

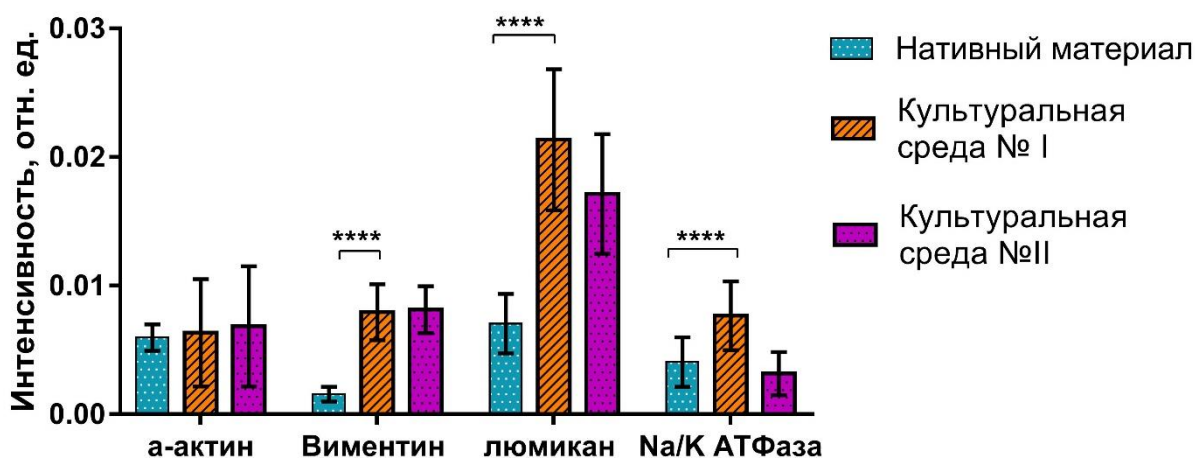


Рисунок 2. Изменение экспрессии маркеров в полученных клеточных культурах клеток заднего эпителия роговицы в сравнении с нативными клетками.

3 этап 3D культивирование

3D культивирование кератоцитов

Для получения сфероидов из кератоцитов использовались 4 разные по составу прописи сред, 2 из которых были отобраны на этапе 2D клеточного культивирования, и те же по составу среды, но с добавлением L-аскорбиновой кислоты.

Было показано, что формирование сфероидов, состоящих из 500 клеток, во всех анализируемых средах имело общую тенденцию. Так уже после 5-ти часов культивирования клетки формировали рыхлые агрегаты, а к 7-м суткам были сформированы компактные сфероиды с постепенным уменьшением их размеров. Дальнейшее культивирование в течение 35 суток каких-либо значимых изменений не наблюдалось. Также было показано, что в течение всего периода культивирования полученные сфероиды сохраняли свою жизнеспособность.

Иммуногистохимическое исследование показало, что уже в первые сутки культивирования в 3D клеточных сфероиде детектировались характерные маркеры кератоцитов: кератокан и кератансульфа. Сравнительную оценку экспрессии указанных маркеров проводили на основании средней интенсивности свечения с использованием программного обеспечения CellProfiler. Достоверной разницы между группами и сроками культивирования в экспрессии данных маркеров выявлено не было. При этом в каждой группе к 35 суткам наблюдения отмечалось постепенное увеличение экспрессии кератансульфата. Экспрессия кератокана была стабильной, или же снижалась незначительно.

После 1-х суток культивирования во всех группах сравнения было показано достоверное снижение экспрессии люмикана – протеогликана богатого лейцином, основная функция которого заключается в поддержании прозрачности роговицы путем высокой организации и регуляции коллагеновых фибрилл. Предположительно, данный факт связан не с уменьшением синтеза конкретного белка, а с уменьшением размеров клеток, формирующих сфероид в процессе его компактизации, поскольку известно, что люмикан экспрессируется в цитоплазме клеток. Наибольшая экспрессия люмикана наблюдалась в группах, содержащих L-аскорбиновую кислоту. При этом было показано, что в группе с посевной концентрацией 1000 клеток на сфероид уровень экспрессии был достоверно больше, чем в группе с посевной концентрацией 500 клеток на сфероид ($p \leq 0,005$).

Характерный белок миофибробластов α -гладкомышечный актин при культивировании 3D сфероидов детектировался в малом количестве и к 35-м суткам его экспрессия достоверно снижалась ($p \leq 0,05$).

Иммуногистохимическое исследование промежуточного филамента мезенхимальных клеток виментина также показало достоверное снижение к 35-м суткам культивирования ($p \leq 0,005$). Предположительно, данный факт снижения мезенхимальных маркеров свидетельствует о переходе кератоцитов из активного состояния, характеризующегося приобретением фибробластоподобной морфологии и способностью к активному митозу, к состоянию покоя и восстановлению исходного фенотипа кератоцитов.

При изучении динамики изменения экспрессии коллагена 1 и 3 типов в течение всего периода культивирования наблюдалась максимальная экспрессия выше указанных маркеров в группах с добавлением L-аскорбиновой кислоты. При этом достоверной разницы между группой сфероидов из 1000 клеток и 500 клеток выявлено не было.

При изучении динамики изменения экспрессии коллагена 5 и 6 типов в течение всего периода культивирования также отмечалась экспрессия коллагена 1 и 3 типов. Максимальная экспрессия коллагена 5 и 6 типов отмечалась в группах с добавлением L-аскорбиновой кислоты. При этом достоверной разницы между группами сфероидов из 500 и 1000 клеток выявлено не было.

Таким образом, наиболее оптимальной прописью для культивирования сфероидов из кератоцитов является среда, содержащая DMEM/F12, 5% эмбриональной телячьей сыворотки, фактор роста фибробластов и L-аскорбиновую кислоту при сроке культивирования 35 суток и 1000 клеток/на сфероид. Данные условия способствуют максимальному накоплению внеклеточного матрикса коллагена 1, 3, 5 и 6 типов, увеличению основных белков малых лейцин-богатых протеогликанов (кератокансульфата и люмикана) и снижению экспрессии нехарактерных белков (α -гладкомышечного актина и виментина). В этой связи дальнейшее исследование осуществлялось с использованием сфероидов, полученных при указанных условиях.

3D культивирование сфероидов клеток заднего эпителия роговицы

Из охарактеризованной клеточной культуры заднего эпителия роговицы 2-го пассажа были созданы 3D клеточные сфериды, содержащие по 500 клеток на сфероид. На 1-е сутки культивирования сфериды образовывали рыхлые агрегаты со слабо выраженной округлой формой, к 7-м суткам были образованы компактные сфериды, к 14-м суткам размер сфероидов не менялся. При этом сфериды оставались жизнеспособными на протяжении всего срока культивирования.

Иммуногистохимический анализ показал, что α -гладкомышечный актин не экспрессируется клетками заднего эпителия роговицы в 3D клеточных сфероидах. Также отмечалось увеличение экспрессии люмикана к 14-м суткам.

В свою очередь, противоположная тенденция была обнаружена в экспрессии Na/K АТФазы. При иммуногистохимическом исследовании данных маркеров в нативной культуре клеток заднего эпителия роговицы было отмечено увеличение их экспрессии в зонах дефектов слоя клеток. Таким образом, повышение экспрессии Na/K АТФазы наблюдается при повреждении клеток заднего эпителия роговицы. Следовательно, уменьшение Na/K АТФазы в 3D культуре клеток заднего эпителия роговицы свидетельствует о стабилизации полученной клеточной культуры.

Полученные результаты 3D культивирования свидетельствуют о том, что 3D клеточные сфероиды являются наиболее оптимальной структурой в сравнении с 2D культурой, и могут быть использованы при конструировании эквивалентов роговицы.

4 этап. 2D культивирование кератоцитов на полимерных материалах

Для проведения оценки пролиферативной активности кератоцитов на полимерных материалах проводили подсчет количества клеток в течение 6-ти суток.

Полученные результаты 2D клеточного культивирования кератоцитов на ПММА и фиброине шелка показали схожие результаты адгезии клеток, что свидетельствовало о нетоксичности исследуемых материалов. Также отмечалась более высокая адгезия к этим материалам по сравнению ОУМА и ГЭМА. Таким образом, материалы ОУМА и ГЭМА могут быть использованы для создания оптической части искусственной роговицы, но непригодны для конструирования каркасной структуры роговицы. Материалы, показавшие наилучшие результаты адгезии (ПММА и фиброин шелка), могут быть использованы как для создания каркасного, так и оптического элементов искусственной роговицы. Однако только фиброин шелка в силу своих физико-химических свойств позволяет создавать слоистую структуру, отвечающую всем требованиям, предъявляемым к искусственной роговице.

Таким образом, фиброин шелка был выбран для дальнейшей работы как материал, показавший наилучшие адгезивные свойства и слоистость при конструировании структуры стромы роговицы.

5 этап. Культивирование кератоцитов на фиброине шелка

Для создания слоистой структуры стромальной части роговицы использовали пленки фиброина шелка.

Исследование пленок проводили в 2 этапа: на 1-м этапе проверяли токсичность материала и спрединг распространения 2D и 3D клеточных культур, пассируемых на материале. После 7-ми суток культивирования

проводили анализ жизнеспособности клеточных культур, однако, стандартный метод определения с использованием флуоресцентного красителя не дал ожидаемых результатов. Данное обстоятельство было связано с тем, что пленки фиброина шелка хорошо впитывают краситель, в связи с чем детекция на конфокальном микроскопе представляется невозможной из-за сильного фонового окрашивания. В связи с этим, нами был использован метод «ДНК комет», который позволяет детектировать повреждение ДНК, которое может привести к запуску апоптоза или некроза клетки (Рис. 3).

При анализе полученных данных «ДНК-комет» было показано, что материал не является токсичным. Так для сравнения использовали культуру клеток, культивируемую на пластике, а в качестве положительного контроля – клетки после 10-ти минут экспозиции УФ-облучения. В опытных группах было выявлено достоверное различие по сравнению с группой положительного контроля, что позволило сделать данный вывод (Рис. 4).

При анализе характера клеточного роста с помощью световой микроскопии было показано, что использование 3D клеточных сфероидов сопровождается более равномерным распространением клеток по материалу, в отличие от 2D культуры.

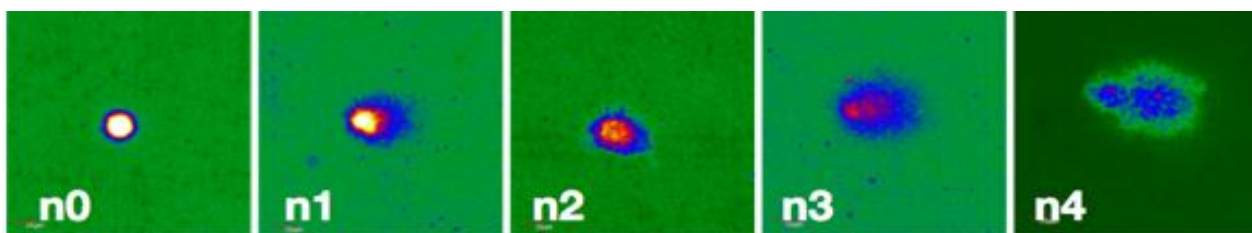


Рисунок 3. Пять условных типов «ДНК-комет», полученных при оценке жизнеспособности клеточных культур культивируемых на материале. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, ув. 600x

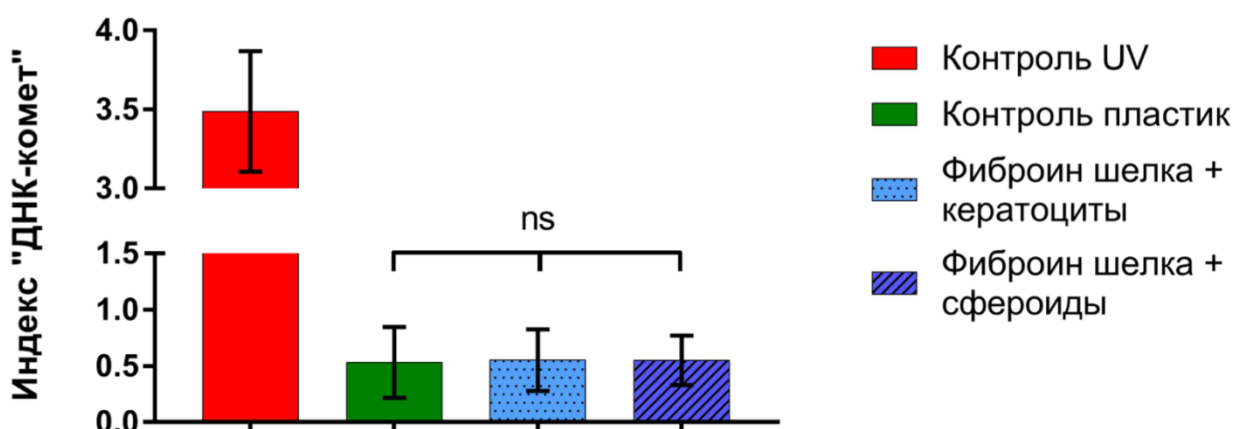


Рисунок 4. Сравнение индекса «ДНК-комет» 2D и 3D клеточных культур, культивируемых на пленках фиброина шелка.

На 2-м этапе работы для создания слоистой структуры использовали 3 пленки с клеточными сфероидами, и одну без клеток (Рис. 5), срок

культивирования составил 7 суток. Была показана возможность создания слоистой структуры, используя пленки из фиброина шелка и 3D клеточных сфероидов. При этом отмечалось прикрепление и распределение клеток между пленками.

Оценку жизнеспособности клеток проводили, используя метод ДНК-комет на каждом уровне в отдельности. Было выявлено отсутствие статистически значимой разницы между клетками, находящимися на верхнем и нижнем уровнях, и клетками, культивируемыми на пластике (контрольная группа). При этом отмечали статистически значимое ($p \leq 0,05$) более выраженное повреждение ДНК в клетках, культивируемых во внутреннем слое (Рис. 6). Данный факт указывает на низкую диффузию питательных веществ, что требует доработки специальных свойств материала, а именно – его проницаемости. Таким образом, впервые была показана возможность создания слоистой структуры искусственной роговицы на основе пленок из фиброина шелка и 3D клеточных сфероидов кератоцитов.

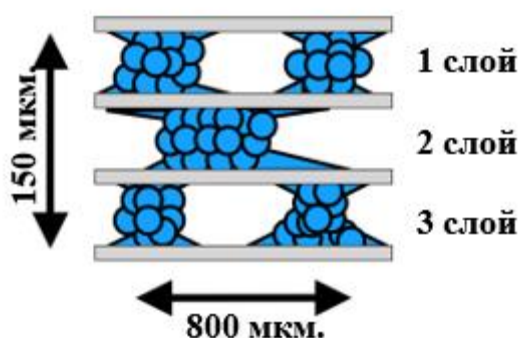


Рисунок 5. Схематическое изображение слоистой структуры на основе пленок фиброина шелка и 3D клеточных сфероидов.

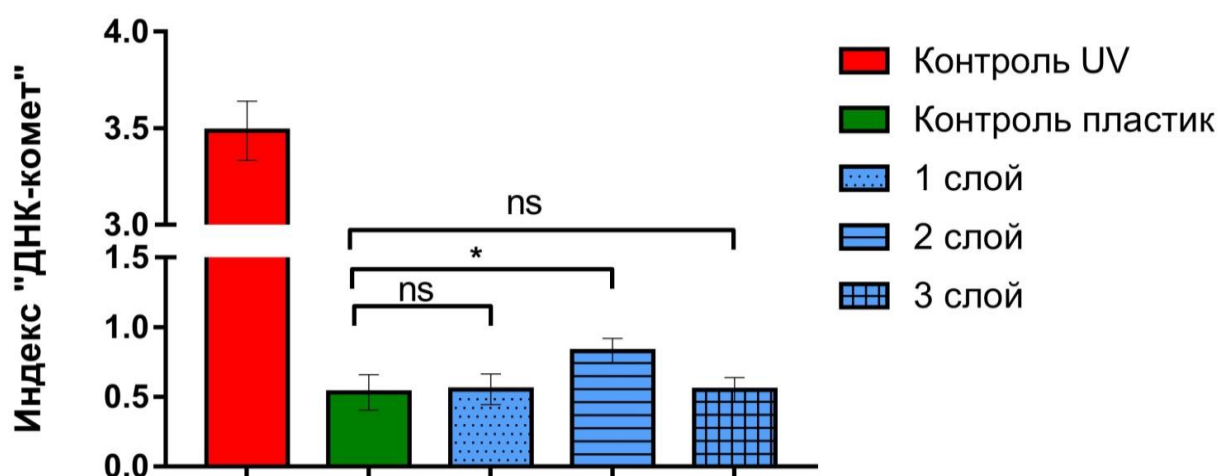


Рисунок 6. Сравнительный анализ индекса «ДНК-комет» в полученной слоистой структуре.

Выводы

1. Разработанный протокол выделения кератоцитов позволяет увеличить получаемое количество жизнеспособных клеток на 23%, в сравнении с широко используемым протоколом ($p \leq 0,05$). Оптимальным способом выделения клеток заднего эпителия роговицы является эксплантационный метод культивирования.

2. Установлено, что для 2D культивирования кератоцитов, среда на основе DMEM/F12 с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки и среда DMEM/F12 с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки и 10 нг/мл фактора роста фибробластов, позволяют сохранить фенотип и поддерживать пролиферативную активность клеток, достоверной разницы между средами выявлено не было. Среда DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки является оптимальной для поддержания клеток заднего эпителия роговицы в виде 2D клеточной культуры, а также, способствует сохранению их гексагональной морфологии и экспрессии характерных маркеров (Na/K АТФазы, люмикана, ZO-1).

3. Для сохранения фенотипа и функциональной активности кератоцитов при 3D культивировании в течение 35 суток предпочтительной является среда DMEM/F12 с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки, фактора роста фибробластов и L-аскорбиновой кислоты, которая способствует достоверно значимому ($p \leq 0,001$) увеличению экспрессии белков внеклеточного матрикса, а именно: коллагена 1, 3, 5 и 6 типов, кератансульфата, и выраженному снижению экспрессии α -гладкомышечного актина - маркера миофибробластов. Экспрессия люмикана была достоверно выше ($p \leq 0,001$) в группе сфероидов с концентрацией 1000 клеток в сфероиде. Полная питательная среда DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки при концентрации 500 клеток на сфероид является оптимальной для сохранения фенотипа и функциональной активности 3D клеточных сфероидов из клеток заднего эпителия роговицы.

4. При культивировании 2D и 3D клеточной культуры кератоцитов на пленках фиброина шелка в течение 7 суток достоверной разницы в жизнеспособности клеток не выявлено, 0.552 и 0.549 соответственно по индексу «ДНК-комет»; при этом, отмечалось более равномерное распространение клеточного слоя при использовании в виде 3D сфероидов.

5. Для конструирования искусственной роговицы оптимальным полимерным материалом является фиброин шелка, характеризующийся наилучшей биосовместимостью как с 2D, так и 3D культурой кератоцитов, обусловленной высокой адгезией и пролиферативной активностью клеток, а также, возможностью создания слоистой структуры, в сравнении с ГЭМА и ОУМА, обладающими низкой адгезией для клеток роговицы.

Список опубликованных работ

1. Желтоножко А.А., Борзенко С.А., Сабурин И.Н., Попов И.А., Островский Д.С., Комах Ю.А., Тонаева Х.Д., Богуш В.Г., Агапов И.И. Роль феномена эпителиально-мезенхимальной пластичности в конструировании эквивалента искусственной роговицы // В книге: X Съезд офтальмологов России. – 2015. – С. 184а.
2. Борзенко С.А., Малюгин Б.Э., Измайлова С.Б., Поручикова Е.П., Попов И.А., Островский Д.С. Изучение биосовместимости полимерных материалов (полиметилметакрилат и бисфенол-а-диглицидилметокрилат) на модели культуры клеток стромы роговицы // Офтальмохирургия. – 2016г. – №4.– С. 16 – 19.
3. Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Мушкова И.А., Шевлягина Н.В., Шкандина Ю.В., Островский Д.С., Попов И.А. Морфологическое исследование биосовместимости интракорнеальных полимерных линз с роговицей человека в эксперименте *in vitro* // Офтальмохирургия. – 2016. – №4.– С. 51–60.
4. Поручикова Е.П., Островский Д.С., Попов И.А., Измайлова С.Б., Борзенко С.А., Малюгин Б.Э. Исследование биосовместимости интрастромальных роговичных сегментов из полимерных материалов на модели органной культуры трупной роговицы человека // Современные технологии в офтальмологии. – 2016. – № 4. – С. 188 – 191.
5. Казанцев А.Д., Островский Д.С., Герасимов М.Ю., Борзенко С.А. Изучение экспериментальных методов выделения и культивирования клеток эндотелия роговицы человека // Современные технологии в офтальмологии. – 2017. – №4. – С. 105 – 108.
6. Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Мушкова И.А., Островский Д.С., Попов И.А., Шкандина Ю.В. Исследование биосовместимости материалов для внутрироговичных линз на модели культуры клеток стромы роговицы человека // Вестник трансплантологии. – 2017. – Т. 19. – №1. – С. 74 – 81.
7. Казанцев А.Д., Островский Д.С., Борзенко С.А. Результаты разработки протокола выделения и культивирования заднего эпителия роговицы человека // Вестник Совета молодых учёных и специалистов Челябинской области. – 2017. – Т. 3. – № 4 (19). – С. 50 – 52.
8. Казанцев А.Д., Островский Д.С., Герасимов М.Ю., Борзенко С.А. Разработка протокола фенотипирования клеток заднего эпителия роговицы кадаверных глаз человека // Современные технологии в офтальмологии. – 2018. – № 24(4). – С. 158 – 162.
9. Островский Д.С., Борзенко С.А., Сабурин И.Н., Малюгин Б.Э., Мушкова И.А., Репин В.С. Модель культуры кератоцитов человека в изучении биосовместимости полимерных материалов для роговичных имплантатов и биоскусственной роговицы // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2018. – № 62(2). – С. 129 – 135.

Список условных сокращений

- 2D** – англ. *two-dimensional*; двумерный
3D – англ. *three-dimensional*; трехмерный
DMCO – англ. *dimethylsulfoxide*; диметилсульфоксид
 α SMA – англ. *α -smoothmuscleactin*; α -гладкомышечный актин
ZO-1 – англ. *zonulaoccludens-1*; зонаооклюденс-1
ПММА – полиметилметакрилат
ПТФЭ - политетрафторэтилен
ГЭМА – гидроксиэтилметакрилат
MEM – англ. *Minimum Essential Medium*; основная минимальная питательная среда
DMEM – англ. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; питательная среда Игла в модификации Дульбекко
DMEM/F12 – англ. *Dulbecco's Modified Eagle Medium / Ham's F12*; смесь питательных сред – среды Игла в модификации Дульбекко и среды Хэма F12 в соотношении 1:1

Developing new tissue-engineering approaches based on spheroid stem cell culture and polymers.

The aim of the work is to develop new methodological approaches for an artificial cornea bioengineering based on cultured cadaver donor corneal cells in form of spheroid culture (3D) on different polymeric materials. During the study it was developed a new method for keratocytes isolation. The method provides high viability and increased cells numbers during digestion. In addition, medium for 2D- and 3D culture of keratocytes and corneal endothelium cells were refined. The medium sustains morphology and functional characteristic of the cells. For creation of artificial cornea suitable polymeric materials were analyzed and selected. It was found that silk fibroin is an optimal polymeric material for artificial cornea bioengineering and its combination with 3D culture of keratocytes might be used for lamellar corneal stromal equivalent.