

Разработка биоинженерной конструкции искусственной роговицы на основе пленочного матрикса из спидроина и культивированных клеток лимбальной зоны глазного яблока

Б.Э. Малюгин¹, С.А. Борзенко^{1, 4}, И.Н. Сабурин^{2, 3}, В.С. Репин^{1, 2, 3}, Н.В. Кошелева^{2, 7}, Т.Д. Колокольцова^{1, 2, 3}, И.М. Зурина², Ю.А. Комах¹, А.А. Желтоножко¹, И.А. Попов¹, Л.И. Давыдова⁵, В.Г. Богущ⁵, И.И. Агапов^{6, 7}

¹ ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва;

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН, Москва;

³ ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, Москва;

⁴ ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва;

⁵ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов», Москва;

⁶ ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва;

⁷ ГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

РЕФЕРАТ

Цель. Изучить предпосылки к разработке биоинженерной конструкции искусственной роговицы на основе тканевого матрикса из рекомбинантного спидроина путем оценки поведения на его поверхности плоскостных (2D) и трехмерных (3D) клеточных культур.

Материал и методы. Изучали первичные культуры эпителиоидных и стромальных клеток (МСК-Л), полученных из лимбальной зоны аутопсированных глаз доноров. Клетки засеивали на чашки Петри и в лунки 12-луночных культуральных планшетов (Corning, США). Для получения сфероидов клетки после второго пассажа центрифугировали и высевали на агарозные планшеты, затем культивировали в термостатируемой камере (Cell-IQ, Chip Map Technologies, Финляндия) в стандартных условиях (37°С, 5% CO₂). Контроль роста и морфологии клеток в планшетах проводили под инвертированным микроскопом СКХ41 (Olympus, Япония). Для подсчета количества клеток и их жизнеспособности использовали автоматический счетчик клеток Countess (Invitrogen, США), экспрессию поверхностных белков анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Для заселения матриксов использовали МСК-Л 3 пассажа и 7-дневные сфероиды из МСК-Л. Оценку роста 2D и 3D клеточных культур на поверхности пленочных матриксов из рекомбинантного спидроина, определение их нетоксичности и адгезивности проводили с использованием иммуногистохимических исследований, световой цитраферной микроскопии (Cell-IQ, Chip Map Technologies, Финляндия), лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (FluoView FV10i, Olympus, Япония) и растровой электронной микроскопии (CamScan, Япония).

Результаты. После посева клеток уже через несколько часов наблюдалось активное их прикрепление к подложке. Прикрепившиеся клетки имели округлую, овальную или полигональную архитектуру. Через сутки наблюдалось появление биполярных вытянутых клеток и островков мигрирующих эпителиоидных клеток. Сфероиды в процессе инкубирования под действием силы тяжести скапливались преимущественно в центральной зоне матрикса, и уже через 2 часа отмечалась активная миграция эпителиоподобных клеток поверхностной области сфероидов по пленке. Через сутки инкубации все выселившиеся на поверхность пленочного матрикса клетки имели мезенхимоподобный фенотип. Сфероиды обладали способностью неограниченно сливаться, после чего наблюдали формирование новой микроткани с эпителиальными клетками на поверхности и мезенхимоподобными клетками в центральной области. Как одиночные сфероиды, так и полученная в результате их слияния микроткань содержали эпителиальный и мезенхимный компоненты, а также регулярно организованные фибриллы внеклеточного матрикса.

Выводы. В свете полученных данных, разработка биоинженерных клеточно-тканевых конструкций искусственной роговицы на основе технологии культивирования клеточных сфероидов (3D), получаемых из мультипотентных стволовых клеток лимба и спидроинового матрикса, представляется перспективной и требующей дальнейшей более углубленной разработки.

Ключевые слова: биоинжиниринг, искусственная роговица, клеточные сфероиды, 2D- и 3D-культивирование, биоплимерный матрикс, спидроин. ■

Офтальмохирургия. – 2013. – № 4. – С.89-97.

ABSTRACT

Development of bioengineering design of artificial cornea based on tissue matrix made of spidroin and cultivated cells of eye limbus zone

B.E. Malyugin¹, S.A. Borzenok^{1,4}, I.N. Saburina^{2,3}, V.S. Repin^{1,2,3}, N.V. Kosheleva^{2,7}, T.D. Kolokoltsova^{1,2,3}, I.M. Zurina², Y.A. Komakh¹, A.A. Zheltonozhko¹, I.A. Popov¹, L.I. Davydova⁵, V.G. Bogush⁵, I.I. Agapov^{6,7}

¹ The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow, Russia;

² The Research Institute of General Pathology and Pathophysiology of the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia;

³ The Russian Medical Academy of Post-diploma Education Moscow, Russia;

⁴ The A.I. Evdokimov Moscow State Medical Dentistry University, Moscow, Russia;

⁵ The State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms Moscow, Russia;

⁶ The V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russia;

⁷ The M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Purpose. To study prerequisites for a development of artificial cornea bioengineered design based on recombinant spidroin tissue matrix by behavior evaluation of 2D (planar) and 3D cell (three-dimensional) cultures on its surface.

Material and methods. We studied epithelioid and stromal primary cell cultures (MSC-L) received from the limbal zone of post-mortem donor eyes. Cells were seeded on Petri dishes and on cavities of cultural trays (Corning, USA). To get spheroid structures the cells after the second passage underwent the centrifuge and were seeded on agarous trays then were cultivated in thermostatic chamber (Cell-IQ, Chip Man Technologies, Finland) under standard conditions (37° C, 5% CO₂). Control over cell growth and morphology in trays was conducted under inverted microscope CKX41 (Olympus, Japan). To count the cell quantity and their viability the automatic cell counter Countess (Invitrogen, USA) was used, to analyze the surface proteins expression the flow cytofluorimetry was applied. For matrices colonization we used the 3rd passage MSC-L and 7-day spheroids of MSC-L origin. To evaluate 2D and 3D cell cultures growth on the surface of membranous matrices of recombinant spidroin, to estimate its non-toxicity and adhesiveness the immunohistochemistry, light time-lapse microscopy (Cell-IQ, Chip Man Technologies, Finland), laser scanning confocal microscopy (FluoView FV10i, Olympus, Japan) and raster electronic microscopy (CamScan, Japan) were incorporated.

Results. Few hours after cell seeding there was active cells' attachment to the substrate. Attached cells were characterized by rounded, oval or polygonal ordonnance. 24 hours later bipolar elongated cells and islets of migrating epithelioid cells appearance were observed. In the incubation process under gravity force the spheroids were accumulated predominantly in the central zone of the matrix, 2 hours later an active migration of spheroids surface zone epithelioid cells was registered on the membrane. After 24 hours of incubation all seeded on the surface of membranous matrix cells possessed a mesenchyme-like phenotype. Spheroids had an ability to merge limitlessly, later we observed a new microtissue formation with epithelioid cells on the surface and mesenchyme-like cells in the central area. Both solitary spheroids and merger-derived microtissue contained epithelial and mesenchymal components as well as regularly organized fibrils of extracellular matrix.

Conclusions. According to aforementioned data the development of artificial cornea bioengineered cell-tissue constructions based on the technology of 3D cell spheroids cultivation derived from multipotent stem cells of the limbus and spidroin matrix presents a promising prospect requiring a further profound investigation.

Key words: bioengineering, artificial cornea, cell spheroids, 2D and 3D cultivation, biopolymer matrix, spidroin. ■

Ophthalmosurgery.- 2013.- No. 4.- P. 89-97.

Разработки в области создания биоинженерных конструкций искусственной роговицы являются одними из самых перспективных для решения проблемы дефицита донорских роговиц. С этой целью проанализировано достаточно большое количество химически синтезированных биополимеров и натуральных материалов, используемых для создания тканевых конструкций [13], однако на настоящий момент ни один из них не соответствует в полной мере требованиям, предъявляемым к биоинженерным матрицам. Материал для создания биоинженерных конструкций тка-

невых матриц искусственных роговиц должен обладать прозрачностью, биосовместимостью, биоинертностью, адгезивностью, заданной стабильностью к биодеградации, иметь определенную пористость, высокую прочность на разрыв и эластичность [2]. Только при полном соответствии вышеуказанным характеристикам вновь предлагаемые материалы могут стать полноценными кандидатами для разработки современной технологии конструирования искусственной роговицы. Именно это обусловило перманентный поиск новых субстанций и разработку оптимальных

условий выращивания на них клеток, полученных из разных источников [3, 4].

В последние годы появились публикации, в которых анализируются матриксы из белка каркасной нити паутины – спидроина [1, 6]. Биоинженерные конструкции матриксов костной, хрящевой, нервной тканей на основе спидроина описаны в литературе [5, 7]. Известно, что спидроин обладает хорошими механическими свойствами, высокой адгезивностью, биоинертностью, биосовместимостью, устойчив к условиям внешней среды, абсолютно прозрачен, что делает его материалом

выбора для создания тканевого матрикса при конструировании искусственных роговиц.

Помимо выбора каркасной биополимерной конструкции, существует проблема ее заполнения клеточными элементами. Так, лимбальная зона глазного яблока является источником стволовых/прогениторных эпителиоидных и мезенхимальных клеток роговицы (МСК-Л). Однако они, при длительном культивировании в монослое, меняют свой фенотип, теряют функциональные характеристики и становятся неспособными к заселению трехмерного матрикса. В этом плане определенной перспективой обладает ранее предложенная нами технология получения и культивирования 3D-сфероидов из клеток лимбальной зоны трупного глаза человека, позволяющая длительно и полноценно сохранять фенотип и функциональные свойства специализированных клеток роговицы, и может быть ис-

пользована для создания биоинженерной конструкции искусственной роговицы на базе тканевого матрикса из спидроина [2].

ЦЕЛЬ

Изучить предпосылки к разработке биоинженерной конструкции искусственной роговицы на основе тканевого матрикса из рекомбинантного спидроина путем оценки поведения 2D и 3D клеточных культур, выделенных из лимбальной зоны глаза человека, при их заселении на матричную поверхность.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Первичные культуры эпителиоидных и стромальных клеток получали из тканевых сегментов лимбального глаза человека по методике, разработанной и описанной ра-

нее [2]. Клетки высевали на пластиковые чашки Петри в концентрации 100000 кл/мл в полной ростовой среде DMEM/F12 (1:1, БиолоТ, Россия) с добавлением L-глутамина (2 мМ/л, ПанЭко, Россия), гентамицина (50 мкг/мл, ПанЭко, Россия), инсулина-трансферрина-селенита (1:100, БиолоТ, Россия), 20 нг/мл bFGF (ProSpec, Израиль) и 10%-ной эмбриональной сыворотки крови коров (HyClone, США). Культивирование проводили в стандартных условиях (37° С, 5% CO₂), культуральную среду меняли каждые 2-3 дня.

Контроль роста и морфологии клеток осуществляли ежедневно под инвертированным микроскопом СКХ41 (Olympus, Япония). Клетки в плотности 100000 кл/мл засевали на чашки Петри и в лунки 12-луночных культуральных планшетов (Corning, США). Прижизненное наблюдение за изменением морфологии и поведением клеток в планшетах, помещенных в специальную термостатируе-

Для корреспонденции:

Малюгин Борис Эдуардович, докт. мед. наук, профессор, зам. ген. директора по научной работе;

Борзенко Сергей Анатольевич, докт. мед. наук, академик РАЕН, зав. Центром фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России; профессор кафедры глазных болезней ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России;

Колокольцова Тамара Дмитриевна, докт. биол. наук, ст. научн. сотрудник ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, ведущ. научн. сотрудник лаборатории клеточной биологии и патологии развития ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, профессор кафедры патофизиологии ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России;

Комах Юрий Алексеевич, канд. мед. наук, зав. лабораторией трансплантологии и клеточной биологии;

Желтоножко Александра Александровна, врач-офтальмолог Глазного тканевого банка;

Попов Илья Андреевич, аспирант Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем

ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России

ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России

Адрес: 127486, Москва, Бескудниковский бульвар, 59а

Тел.: (499) 488-8552. E-mail: info@mntk.ru

Сабурова Ирина Николаевна, докт. биол. наук, зав. лабораторией клеточной биологии и патологии развития ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, профессор кафедры патофизиологии ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России;

Репин Вадим Сергеевич, докт. мед. наук, профессор, чл.-корр. РАМН, главный научный сотрудник ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, гл. научн. сотрудник лаборатории клеточной биологии и патологии развития ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, профессор кафедры патофизиологии ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России;

Кошелева Настасья Владимировна, канд. биол. наук, ведущ. научн. сотрудник лаборатории клеточной биологии и патологии развития ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, старший научный сотрудник кафедры эмбриологии биологического факультета ГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»;

Зурина Ирина Михайловна, мл. научн. сотрудник лаборатории клеточной биологии и патологии развития

ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН

Адрес: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Тел.: (499) 151-1756

ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России

Адрес: 123995, Москва, ул. Баррикадная, 2/1

Тел.: (499) 252-2104

мую камеру, проводили на приборе Cell-IQ (Chip Man Technologies, Финляндия). Для подсчета количества клеток и их жизнеспособности использовали автоматический счетчик клеток Countess (Invitrogen, США).

Исследование иммунотипа культур клеток. С помощью проточной цитофлуориметрии анализировали экспрессию следующих поверхностных белков: CD34, CD45, CD90, CD105, CD14, CD11b, CD19. Для проведения анализа культивированные клетки снимали с чашек Петри с использованием растворов версена и 0,25%-ного трипсина, центрифугировали (7 мин, $g=100 \text{ см}^2/\text{с}$), к полученному осадку добавляли 700 мкл раствора фосфатно-солевого буфера (pH=7,4) с добавлением 1%-ной эмбриональной сыворотки крови коров и разливали по 100 мкл. К каждой пробе согласно рекомендованным производителями протоколам добавляли антитела, конъюгированные с флуоресцентными метками FITC, PE, PC5 или ECD (Beckman Coulter, США) и инкубировали 15 мин при комнатной температуре в темноте. После этого пробы центрифугировали (5 мин, 400 g), осадок ресуспендировали в 1 мл раствора фосфатно-солевого буфера (pH=7,4) с добавлением 1%-ной эмбриональной сыворотки крови коров и переносили в пробирки для проточного цитофлуориметра. Результаты оценивали на проточном цитофлуориметре FC500 (Beckman Coulter, США) с помощью программы CXP Software.

Иммуноцитохимическое исследование. Для фиксации (20 мин,

4° C) использовали 4%-ный раствор параформальдегида (Sigma, США) на фосфатно-солевом буфере (pH=7,4). Монослой клеток перед окрашиванием трижды промывали в растворе фосфатно-солевого буфера (pH=7,4). Сфероиды после фиксации и отмытки в растворе фосфатно-солевого буфера (pH=7,4) переносили в водные растворы сахарозы возрастающей концентрации 10, 20 и 30%, в каждом инкубируя сутки, заключали в матричную среду для криотомии Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura, Нидерланды), серию срезов толщиной 10 мкм производили на криотоме CM1510S (Leica, Германия). Срезы помещали на предметные стекла с положительно заряженной поверхностью SuperFrost PLUS (Menzel, Германия), перед окрашиванием трижды промывали раствором фосфатно-солевого буфера (pH=7,4). Окрашивание первичными и вторичными антителами осуществляли в условиях влажной камеры при комнатной температуре по протоколам, предлагаемым производителями. Использовали антитела к нестину (Chemicon, Франция), виментину (Sigma, США), цитокератину 19 (Abcam, Великобритания), фибронектину (Abcam, Великобритания), коллагенам I и V типов (Abcam, Великобритания), ламинину (Abcam, Великобритания), кератокану (Thermo Scientific, США) и кератансульфату (Thermo Scientific, США). Ядра докрашивали флуоресцентным красителем Hoechst 33258 (3,2 нмоль/мл, 30 мин).

3D-культивирование клеток лимбальной зоны. Для получения сфероидов клетки после второго пассажа

снимали с чашек Петри с помощью растворов версена и 0,25%-ного трипсина, центрифугировали (7 мин, $g=100 \text{ см}^2/\text{с}$) и высевали в концентрации 300000 кл/мл на агарозные планшеты (Microtissues™, США), помещенные в лунки 12-луночных культуральных планшетов (Corning, США) в полной ростовой среде. Культивировали в специальной термостатируемой камере прибора Cell-IQ (Chip Man Technologies, Финляндия) в стандартных условиях (37° C, 5% CO₂).

Заселение матриксов из спидроина сфероидными и суспензиями клеток. Тканевые матриксы были изготовлены в виде пленок из 4%-ного раствора рекомбинантного спидроина в муравьиной кислоте. Для формирования пленочных матриксов разной толщины использовали растворы спидроина в объемах 200 мкл (диаметр пленки – 16 мм, толщина – 75 мкм) и 300 мкл (диаметр пленки – 18 мм, толщина – 100 мкм). Пленочные матриксы без бортиков и с бортиками в виде контактных линз фиксировали 96%-ным этиловым спиртом, промывали в 2-х сменах бидистиллированной воды (по 6 часов, 25° C), затем в полной ростовой среде (24 часа, 25° C). Перед заселением матриксы переносили по 1 образцу в лунки 12-луночного культурального планшета (Corning, США), предварительно заполнив пространство между лунками планшета ростовой средой для создания влажной камеры и предотвращения испарения среды в лунках.

Для заселения матриксов использовали МСК-Л 3 пассажа и 7-дневные

Давыдова Любовь Ивановна, канд. биол. наук, ст. научный сотрудник;

Богуш Владимир Григорьевич, канд. биол. наук, ведущ. научн. сотрудник лаборатории белковой инженерии;

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»

Адрес: 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, 1

Тел.: (495) 315-3747

Агапов Игорь Иванович, докт. биол. наук, профессор, доцент кафедры биоинженерии биологического факультета ГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», зав. лабораторией бионанотехнологий ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России

ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России

Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, 1

Тел.: (495) 544-1800

ГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

Адрес: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1, стр. 12

Тел.: (495) 939-2776

сфероиды из МСК-Л. Клетки снимали с подложки с использованием растворов версена и 0,25%-ного трипсина, центрифугировали (7 мин, $g=100 \text{ см}^2/\text{с}$), ресуспендировали, доводили концентрацию до 600000 клеток в 200 мкл среды и помещали на пленочные тканевые матриксы. Сфероиды снимали с агарозных планшетов полной ростовой средой, пассивно осаждали в центрифужных пробирках по 15 мл, ресуспендировали в 200 мкл той же среды, переносили по 300 единиц на пленочные тканевые матриксы. Через 30 мин в лунки планшетов с клетками добавляли полную ростовую среду до 1 мл, накрывали планшеты специальной крышкой, помещали в термостатируемую камеру прибора Cell-IQ (Chip Map Technologies, Финляндия) и культивировали в стандартных условиях (37°C , 5% CO_2).

Световая цейтраферная микроскопия. Цейтраферную фоторегистрацию 2D монослойных и 3D-культур и сфероидов осуществляли на приборе Cell-IQ (Chip Map Technologies, Финляндия) с покадровым интервалом 20 мин в течение 1-12 суток. Фотоматериалы анализировали с помощью программного обеспечения Cell-IQ Analyzer.

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Препараты культур клеток и срезы сфероидов после иммуноцитохимического окрашивания изучали под инвертированным микроскопом СКХ41 (Olympus, Япония) в видимом и ультрафиолетовом световых диапазонах, а также с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа FluoView FV10i (Olympus, Япония).

Растровая электронная микроскопия. Пленочные матриксы, заселенные суспензией клеток или сфероиды, фиксировали в 2,5%-ном растворе глутарового альдегида на 0,1 М какодилатном буфере ($\text{pH}=7,3$) в течение 1 часа, дофиксировали в 1%-ном водном растворе OsO_4 в течение 1-2 часов, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации (2 смены по 5 мин в каждой) и ацетоне (3 смены по 10 мин в каждой). После фиксации и обезвоживания препаратов осуществляли высушивание в критической точке, и перед сеансом образец напыляли в вакууме

золотом, получая реплику (отпечаток), повторяющую контуры образца, которую впоследствии сканировали с использованием растрового электронного микроскопа CamScan (Япония).

Общий расход материалов исследований. Для получения клеточных культур и сфероидов использовали 48 лимбальных тканевых фрагментов, выделенных из 12 глаз, аутопсированных у 6 трупов-доноров роговиц и полученных из Глазного тканевого банка ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» (Москва) согласно нормативно-правовым и биоэтическим требованиям, действующим в Российской Федерации и предъявляемым к подобного рода исследованиям. Из выделенных МСК-Л получено, протестировано на пригодность и использовано в экспериментах 24 пластиковых чашки Петри и 6 12-луночных планшетов с первичными клеточными суспензиями. В экспериментах со сфероиды МСК-Л использовано 120 агарозных подложек, размещенных в 10 12-луночных культуральных планшетах. Для электронной растровой и иммунофлуоресцентной ми-

кроскопии использовали 30 образцов пленочных матриксов из рекомбинантного спидроина со сфероиды, из них прокультивированных на матриксах с диаметром 18 мм и толщиной 100 мкм – 10 образцов, с диаметром 16 мм и толщиной 75 мкм – 20 образцов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При создании биоинженерной конструкции искусственной роговицы чрезвычайно важную роль играют клетки и их характеристики. С этой целью используют клетки эпителия роговицы глаза [12], клетки амниотического эпителия [9, 10], мезенхимальные стволовые клетки пуповины человека [14], стволовые клетки жировой ткани [15]. Учитывая возможность МСК-Л генерировать эпителиальный и стромальный слои роговицы, мы выбрали данную ткань в качестве основного источника клеток.

После посева клеток, выделенных из ткани лимба, уже через несколько часов наблюдалось активное их прикрепление к подложке. Все прикре-

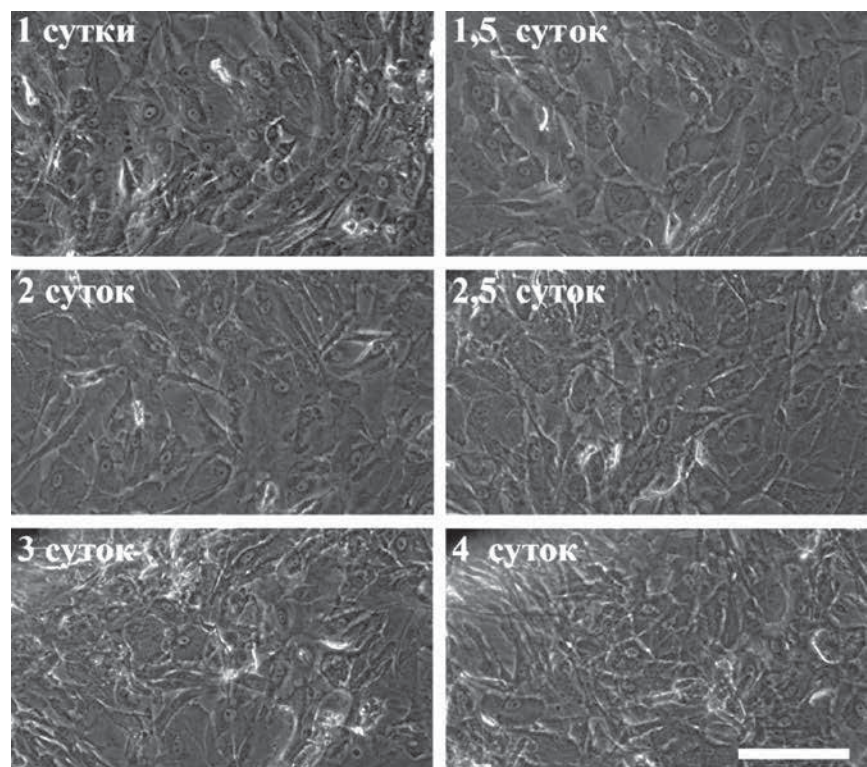


Рис. 1. Изменение морфологии эпителиоидцитов в монослойной 2D-культуре. Прижизненная цейтраферная съемка (Cell-IQ). Масштабный отрезок 100 мкм

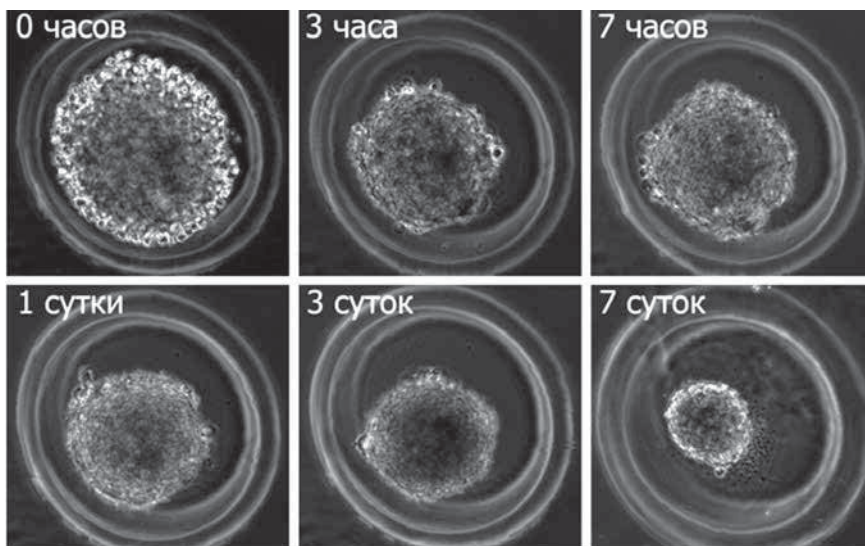


Рис. 2. Динамика формирования сфероидов МСК-Л в 3D-культуре. Прижизненная цейтраферная съемка (Cell-IQ). Диаметр лунок 200 мкм

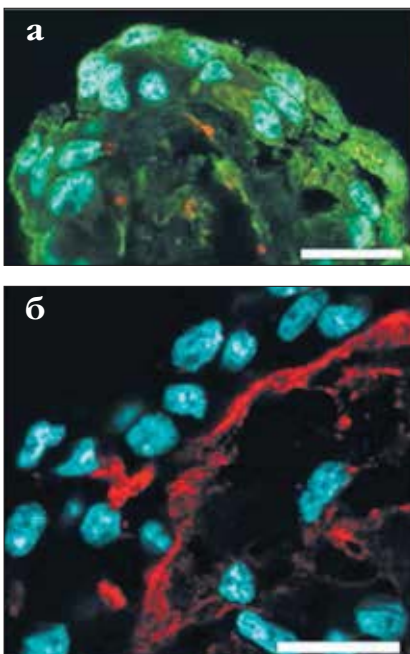


Рис. 3. Иммуноцитохимическое окрашивание сфероидов из МСК-Л (7 дней 3D-культивирования): а) экспрессия Е-кадгерина (зеленый цвет) и N-кадгерина (красный цвет); б) экспрессия коллагена I типа (красный цвет). Ядра клеток окрашены Hoechst 33258 (синий цвет). Сканирующая лазерная конфокальная микроскопия. Масштабный отрезок 20 мкм

пившиеся клетки имели округлую, овальную или полигональную архитектуру. Через сутки наблюдалось появление биполярных вытянутых клеток и островков мигрирующих эпителиоидных клеток.

Для изолирования островков эпителиоидных клеток первично ис-

пользовали специальные цилиндры («glass cloning cylinders»), которые затем переносили на другие чашки и продолжали культивировать в полной ростовой среде. Прижизненное наблюдение выделенных таким способом эпителиоидных клеток показало, что уже через 3-4 суток после первого пассажа клетки вытягивались, становились биполярными и приобретали фибробластоподобный фенотип (рис. 1). С ростом числа пассажей помимо изменения архитектуры увеличивалась доля клеток, активно экспрессирующих маркеры мезенхимальных клеток: CD90+, CD105+ и CD29+, что совпадало с ранее полученными результатами [2]. Изменение морфологических свойств клеток в сочетании с экспрессией маркеров свидетельствует о вовлечении клеток в процесс эпителиомезенхимной трансформации.

По сравнению с эпителиоидоцитами МСК-Л отличались хорошей пролиферативной активностью, стабильностью фенотипа. В культуре МСК-Л ко второму пассажу обладали мезенхимоподобные клетки, экспрессирующие CD90, CD105, альфа-актинин и не экспрессирующие CD45, CD34, CD14, CD19, CD11b. При 3D-культивировании как из эпителиоидоцитов, так и из МСК-Л формировались сфероиды с одинаковыми характеристиками, также описанными нами ранее [2]. Нестабильность фенотипа эпителиоидоцитов в культуре, сложность их выращива-

ния с поддержанием эпителиального статуса в необходимых количествах, а также возможность МСК-Л подвергаться эпителиомезенхимной трансформации обусловили наш выбор в пользу последних клеток для проведения последующих экспериментов с тканевой конструкцией пленочного матрикса из спидроина.

На рисунке 2 показана динамика формирования сфероидов из МСК-Л. Как видно из рис. 2, при помещении в 3D-культуру МСК-Л уже в первые часы объединялись в рыхлые агрегаты размером 150-200 мкм, которые через сутки формировали круглые сфероиды с гладким поверхностным слоем клеток. При дальнейшем культивировании наблюдалась активная компактизация сфероидов, клеточная масса значительно уплотнялась уже к концу первых суток до 100-120 мкм в диаметре, а к 7-м суткам их размеры уменьшались до 70-80 мкм (рис. 2).

С помощью методов иммуногистохимической и растровой электронной микроскопии нами ранее уже было показано, что в основе формирования сфероидов лежит процесс эпителиомезенхимной трансформации клеток, при этом поверхностные клетки сфероидов приобретают эпителиальный фенотип [2, 3, 4]. Появление экспрессии Е-кадгерина в клетках поверхностной области сфероидов (рис. 3а) дополнительно подтвердило эпителиальные характеристики клеток этой области и ведущую роль эпителиомезенхимной пластичности в формировании сфероидов.

Как видно из рис. 3, практически во всех клетках сфероида наблюдалась экспрессия Е-кадгерина, а экспрессия N-кадгерина сохранялась только в мезенхимоподобных клетках центральной области сфероидов (рис. 3а). Кроме того, в предыдущих исследованиях было показано, что поверхностные клетки активно экспрессировали нестин и цитокератин 19, а также важные для роговицы гликозаминогликаны – кератокан, кератансульфат и компоненты базальной мембраны – ламинин, фибронектин и коллаген I типа [2].

Известно, что внеклеточный матрикс в роговице формирует сложный динамичный комплекс микроокружения клеток, обеспечивает прочность и прозрачность рого-

вицы. Прозрачность внеклеточного матрикса роговицы обусловлена возникающей в эмбриогенезе регулярной упаковкой фибрилл коллагенов I, V типов, и, в меньшей степени, коллагена IV типа [11]. В культивируемом нами монослое 2D-культур МСК-Л экспрессия коллагенов I и V типов снижалась, но в 3D-культурах сфероидов экспрессия этих белков возрастала, далее наблюдалась регулярная, напоминающая таковую в строме роговицы, упаковка фибрилл коллагена I типа на границе поверхностной и центральной областей сформированных сфероидов (рис. 3б).

Сфероиды при объединении нескольких в одной лунке агарозного планшета успешно сливались, уже через час наблюдалась адгезия поверхностных областей сфероидов (рис. 4). Позднее небольшие сфероиды сливались в один крупный сфероид. В слиянии участвовали все сфероиды, оказавшиеся в одной лунке и получившие возможность контактировать между собой в условиях 3D-культивирования. Результаты показали, что сфероиды обладают способностью неограниченно сливаться без контактного торможения. После полного слияния сфероидов наблюдалось формирование новой микроткани с эпителиальными клетками на поверхности и мезенхимоподобными клетками в центральной области. Как одиночные сфероиды, так и полученная в результате их слияния микроткань содержали эпителиальный и мезенхимный компоненты, регулярно организованные фибриллы внеклеточного матрикса, что подтверждает высокую перспективность их применения при конструировании искусственной роговицы.

В настоящее время считается, что успех в создании искусственной роговицы во многом зависит от выбранного материала, используемого в качестве матрикса для выращивания клеток *in vitro* и поддержания их в должном функциональном состоянии *in vivo*. При выборе тканевых матриксов (или субстратов) для конструирования искусственной роговицы наиболее важными являются такие их свойства, как прозрачность, прочность, биологическая толерантность. Также играет не последнюю роль структура поверхности матрикса. Наиболее часто

с этой целью используют децеллюлированную (очищенную от клеток) роговицу животных [10, 16], фиброинный шелк [5, 6, 12], хитозан-фиброиновый комплекс [8, 12]. Экспериментальные образцы новых материалов на основе рекомбинантных аналогов природных белков каркасной нити паутины (спидроинов) являются уникальными разработками биосовместимых, биорезорбируемых материалов для медицины [1, 6]. Спидроины нерастворимы в водных растворах, обладают химической стабильностью в растворах слабых кислот и щелочей, обеспечивают адгезию, пролиферацию и жизнеспособность эукариотических клеток.

Для создания искусственной роговицы мы использовали пленчатые матриксы из рекомбинантного спидроина (рис. 5) без бортиков и с бортиками по краям пленочной конструкции в виде контактной линзы, которые заселяли клетками либо сфероидами, полученными из МСК-Л культур. Как показали результаты прижизненного наблюдения под микроскопом с цейтраферной фоторегистрацией, модификации пленочных

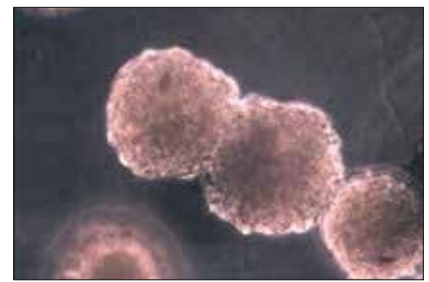


Рис. 4. Взаимодействие семидневных сфероидов стромальных клеток лимба. 1 час инкубирования. Слияние нескольких 3D МСК-Л сфероидов посредством адгезии поверхностных областей. Световая микроскопия с фазовым контрастом



Рис. 5. Пленчатый матрикс из рекомбинантного белка спидроина для создания искусственной роговицы.

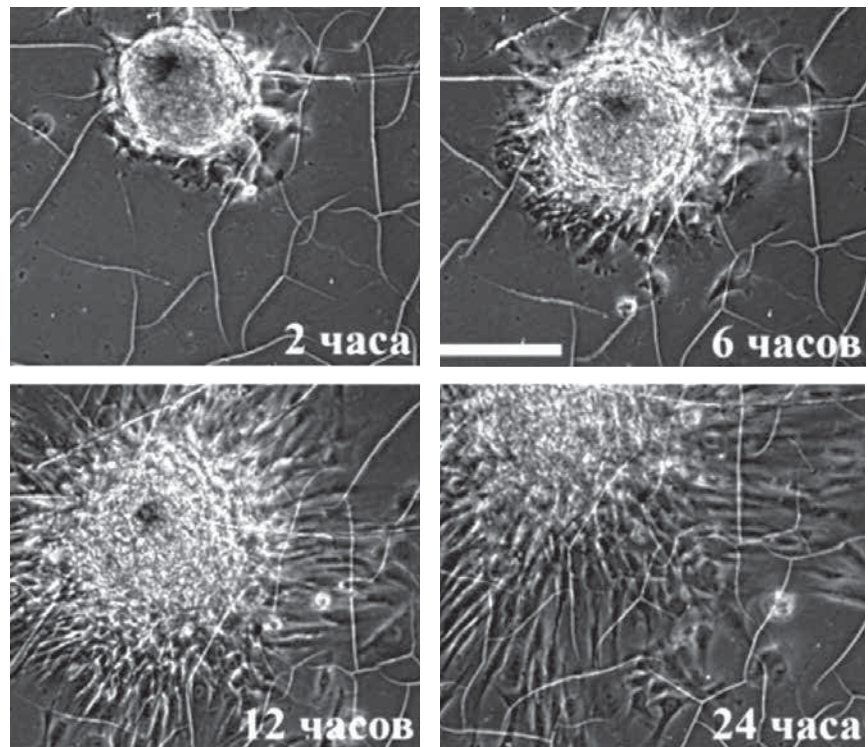


Рис. 6. Динамика заселения пленочного матрикса из спидроина без бортиков 7-дневными сфероидами стромальных клеток лимба. Диаметр матрикса – 18 мм, толщина – 100 мкм, объем раствора спидроина при изготовлении образца – 300 мкл. Цейтраферная съемка методом световой микроскопии с фазовым контрастом на приборе Cell-IQ (Chip Man Technologies, Финляндия). Масштабный отрезок равен 100 мкм

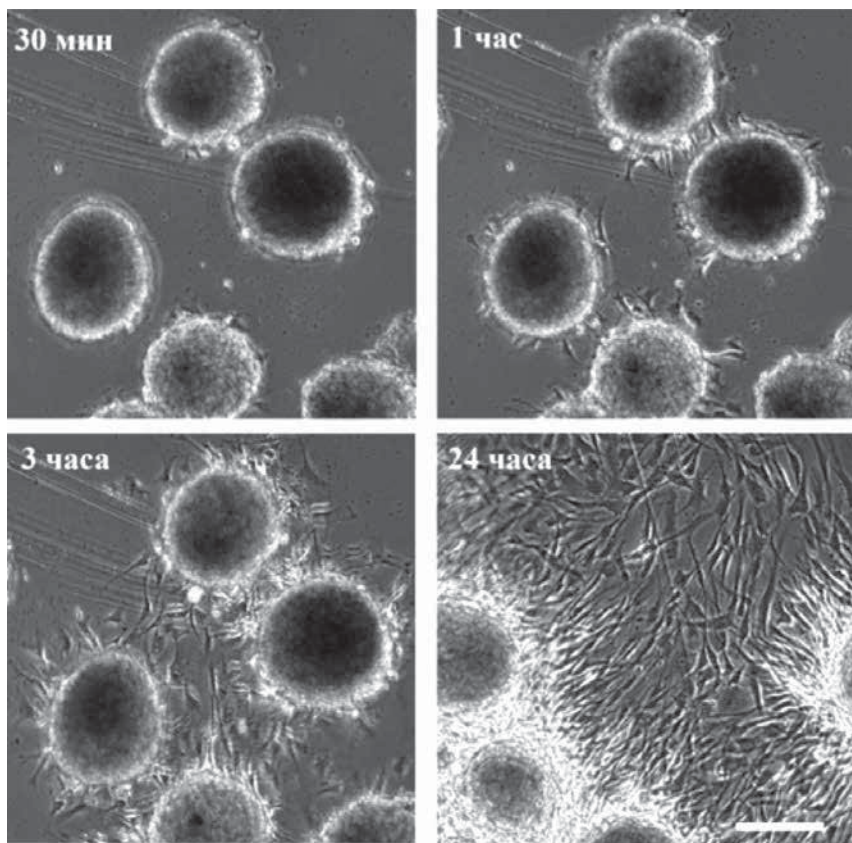


Рис. 7. Динамика заселения пленочного матрикса из спидроина с бортиками 7-дневными сфероидами стромальных клеток лимба. Диаметр матрикса – 16 мм, толщина – 75 мкм, объем раствора спидроина при изготовлении образца – 200 мкл. Цейтраферная съемка методом световой микроскопии с фазовым контрастом на приборе Cell-IQ (Chip Map Technologies, Финляндия). Масштабный отрезок равен 100 мкм

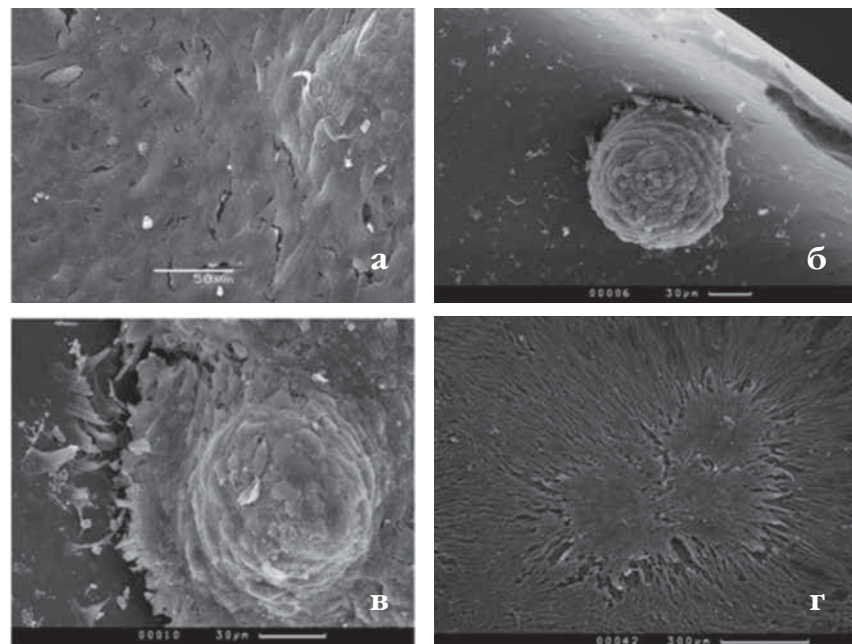


Рис. 8. Динамика и характер роста клеток и сфероидов на пленочных матриксах из спидроина: а) через 24 часа инкубации 2D-культуры МСК-Л; б) через 1 час инкубации 3D-сфероидов; в) через 6 часов инкубации 3D-сфероидов; г) через 1 сутки инкубации 3D-сфероидов. Растровая электронная микроскопия. Масштабный отрезок равен 100 мкм

матрикса с бортиками и без бортиков двух заданных диаметров и толщины конструкции не влияли на динамику их заселения сфероидными (рис. 6, 7). Поскольку пленочные матриксы имели бортики и форму контактных линз, то сфероиды в процессе инкубирования под действием силы тяжести скапливались преимущественно в центральной зоне матрикса. В течение первого часа сфероиды прикреплялись к поверхности пленочного матрикса, через 2 часа отмечалась активная миграция эпителиоподобных клеток поверхностной области сфероидов по пленке, через 3 часа миграция эпителиоподобных клеток по поверхности пленок продолжалась, а из центральной области сфероидов начинали выселяться мезенхимоподобные клетки. При этом на концах островков сфероидов наблюдались активно мигрирующие мезенхимоподобные биполярные клетки. Через сутки инкубации все выселившиеся на поверхность пленочного матрикса клетки имели мезенхимоподобный фенотип (рис. 6г, 7г).

Пленочные матриксы при переносе из одной лунки планшета в другую сохраняли свою целостность, что свидетельствовало об их прочности, однако уже через сутки они теряли свою прозрачность, но при этом не подвергались биодegradации в течение всего периода эксперимента (по крайней мере в течение 12 суток). Хороший рост клеток на поверхности пленочных матриксов свидетельствовал об их нетоксичности и адгезивности.

Исследования методом растровой электронной микроскопии заселенных 2D-культурами МСК-Л и 3D-сфероидными матриксами (рис. 8) подтвердили данные световой микроскопии и показали, что в первый час клетки и сфероиды активно адгезировались на поверхности пленок, далее началась активная миграция эпителиоподобных клеток. Через 6 часов в мигрирующей по поверхности матриксов популяции присутствовали как эпителиоподобные, так и мезенхимоподобные клетки, доля последних стремительно возрастала, и уже через сутки поверхность была покрыта монослоем мезенхимоподобных клеток как в 2D МСК-Л культурах (рис. 8а), так и в 3D-культурах сфероидов (рис. 8г).

При создании искусственной роговицы важную роль отводится сохранению оптических свойств биоинженерной конструкции, обеспечению и поддержанию ее прозрачности на этапах *in vitro* и *in vivo*. Прозрачность роговицы обусловлена сочетанием клеточных компонентов стромы и упорядоченным регулярным строением внеклеточного матрикса. Поэтому сфероиды и получаемые на их основе микроклетки представляются нам наиболее перспективными для создания биоинженерной конструкции полноценно функционирующей искусственной роговицы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что пленочные матрицы, изготовленные из рекомбинантного белка спидроина, имеют достаточно высокую прочность и эластичность, отличаются стабильностью к биодеградации, хорошими адгезивными свойствами и нетоксичны для клеток. Заселенные клетки и сфероиды дают хороший рост и активно мигрируют на поверхности матриксов, формируют плотный монослой. Модификации пленочных матриксов с бортиками и безбортиков двух заданных диаметров (18 и 16 мм) и толщины (100 и 75 мкм) не влияют на динамику их заселения клетками и сфероидами. Однако пленочные матриксы из спидроина уже через сутки нарушают организацию сфероидов, смещая эпителио-мезенхимное равновесие в сторону преобладания мезенхимного компонента, что впоследствии снижает прозрачность полученной конструкции, в то время как слившиеся сфероиды в виде микроклетки без пленочного матрикса длительное время сохраняют в 3D-культуре свою прозрачность.

Использование 3D-культур сфероидов и полученных на их основе микроклеток для заселения матриксов имеет значительные преимущества перед 2D-культурами МСК-Л в связи с их строением, балансом составляющих клеточных компонентов и организацией собственного внеклеточного матрикса.

Разработанная нами технология получения сфероидов (от 300 до 3 млн.) и на их основе микроклетки, содержащих эпителиоподобные и мезенхимоподобные клетки и волокна внеклеточного матрикса с упорядоченной организацией коллагеновых фибрилл, соответствующей структуре стромы роговицы, обуславливает принципиальную возможность использования 3D клеточных сфероидов, полученных из МСК-Л, для создания биоинженерной конструкции искусственной роговицы.

По нашему мнению, дальнейшие перспективы создания биоинженерных клеточно-тканевых конструкций искусственной роговицы и других тканей глаза должны быть связаны с использованием технологии 3D-культивирования сфероидов, получаемых из МСК-Л и других прогениторных/стромальных клеток, без дополнительных биополимерных матриксов или, по крайней мере, с использованием биodeградируемых материалов в качестве субстратов для краткосрочного культивирования сфероидов на этапе *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агапов И.И., Пустовалова О.Л., Мойсенович М.М. и др. Трехмерный матрикс из рекомбинантного белка паутины для тканевой инженерии // Доклады Академии наук.– 2009.– Т. 426, № 1.– С. 115-118.
2. Борзенко С.А., Сабурин И.Н., Ретин В.С. и др. Методологические и технологические проблемы конструирования искусственной роговицы на базе 3D-клеточного культивирования // Офтальмохирургия.– 2012.– № 4.– С. 12-17.
3. Сабурин И.Н., Горкун А.А., Кошелева Н.В. и др. Сопоставление поведения стромальных клеток пупочного канатика и мультипотентных стромальных клеток взрослого костного мозга в 2-D и 3-D культуре: моделирование стромальной регенерации // Вестник новых медицинских технологий.– 2009.– Т. 16, № 4.– С. 9-11.
4. Сабурин И.Н., Ретин В.С. 3D-культивирование: от отдельных клеток к регенерационной ткани (к вопросу о феномене эпителио-мезенхимальной пластичности) // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.– 2009.– Т. 5, № 3.– С. 75-86.
5. Allmeling C., Jokuszies A., Reimers K. et al. Spider silk fibres in artificial nerve

constructs promote peripheral nerve regeneration // Cell Prolif.– 2008.– Vol. 41, № 3.– P. 408-420.

6. Bogush V.G., Sokolova O.S., Davydova L.I. et al. A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins // J. Neuroimmune Pharmacol.– 2009.– Vol. 4, № 1.– P. 17-27.

7. Bray L.J., George K.A., Huttmacher D.W. et al. A dual-layer silk fibroin scaffold for reconstructing the human corneal limbus // Biomaterials.– 2012.– Vol. 33.– № 13.– P. 3529-3538.

8. Gellynck K., Verdonk P.C., Van Nimmen E. et al. Silkworm and spider silk scaffolds for chondrocyte support // J. Mater. Sci. Mater. Med.– 2008.– Vol. 19, № 11.– P. 3399-3409.

9. Guan L., Tian P., Ge H. et al. Chitosan-functionalized silk fibroin 3D scaffold for keratocyte culture // J. Mol. Histol.– 2013.– Vol. 44, № 5.– P. 609-618.

10. Liu X.Y., Chen J., Zhou Q. et al. In vitro tissue engineering of lamellar cornea using human amniotic epithelial cells and rabbit cornea stroma // Int. J. Ophthalmol.– 2013.– Vol. 6, № 4.– P. 425-429.

11. Luo H., Lu Y., Wu T. et al. Construction of tissue-engineered cornea composed of amniotic epithelial cells and acellular porcine cornea for treating corneal alkali burn // Biomaterials.– 2013.– Vol. 34, № 28.– P. 6748-6759.

12. Michellacci Y.M. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix // Brazilian Journal of Medical and Biological Research.– 2003.– Vol. 36, № 8.– P. 1037-1046.

13. Shadforth A.M., George K.A., Kwan A.S. et al. The cultivation of human retinal pigment epithelial cells on Bombyx mori silk fibroin // Biomaterials.– 2012.– Vol. 33, № 16.– P. 4110-4117.

14. Shimazaki J., Aiba M., Goto E. et al. Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders // Ophthalmology.– 2002.– Vol. 109, № 7.– P. 1285-1290.

15. Thomas V.J., Caterson B., Kao W.W. Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells cures the corneal defects of Mucopolysaccharidosis VII mice // Stem Cells.– 2013. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1002/stem.1481.

16. Zeppieri M., Salvetat M.L., Beltrami A.P. et al. Human adipose-derived stem cells for the treatment of chemically burned rat cornea: preliminary results // Curr. Eye Res.– 2013.– Vol. 38, № 4.– P. 451-463.

17. Zhu J., Zhang K., Sun Y. et al. Reconstruction of functional ocular surface by acellular porcine cornea matrix scaffold and limbal stem cells derived from human embryonic stem cells // Tissue Eng. Part A.– 2013. [Epub ahead of print]. PMID: 23675636.

Поступила 28.10.2013