

УДК 612.014:612.35:612.646

*И.Г. Васильева, Н.П. Олексенко, Д.Е. Лесовой**

ГУ «Институт нейрохирургии им. А.П. Ромоданова АМН Украины», г. Киев

**НПЦ «Амфион», г. Москва*

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА В ТРЁХМЕРНОМ ПОЛИВИНИЛОВОМ МАТРИКСЕ

Исследована возможность применения полимера на основе поливинила в качестве трёхмерного (3D) матрикса для культивирования стволовых клеток фетальной печени человека. В первые дни после высевания большинство клеток находилось в наружных слоях матрикса, после 7 суток культивирования клетки проникают во внутренние слои и к 14-м суткам располагаются в матриксе равномерно. На протяжении всего срока культивирования клетки сохраняли фенотип, характерный для стволовых клеток, – небольшие размеры и высокое ядерно-цитоплазматическое отношение. Сделан вывод, что 3D-матрикс на основе поливинила не препятствует клеточной миграции, поддерживает жизнеспособность клеток и является нейтральным по отношению к индукции дифференцировки.

Ключевые слова: *3D-матрикс, поливиниловый спирт, фетальная печень человека, стволовые клетки.*

При образовании тканевого дефицита вследствие травмы или хирургического вмешательства, а также при необходимости замещения функционально неадекватной ткани перспективно использование стволовых клеток. В то же время, как следует из анализа литературы, непосредственное их введение в зону поражения не приводит к ожидаемому терапевтическому эффекту. Очевидно, это обусловлено отсутствием организованного пространства. Искусственная организация такого пространства будет более эффективной, если используемый материал нетоксичен для интактной ткани и трансплантируемых стволовых клеток, обладает адгезивными свойствами и не препятствует их локомоции.

На сегодняшний день проводится активная работа по созданию и изучению свойств 3D-материалов – матриксов, выполняющих роль каркаса для клеточных культур (в том числе стволовых клеток). С этой точки зрения интерес представляют как природные полимеры, такие как фибронектин и коллаген [1, 2], так и искусственно синтезированные, например, гидроксиапатит, полилактид и его сополимеры [3]. В работах [4–6] показано влияние

механических свойств матриксов, их локальной топографии через адгезию на деление, дифференцировку и миграцию клеток. Регуляция запускается через тирозин-киназный сигнальный путь и изменения экспрессии генов белков цитоскелета [4, 6]. В зависимости от конкретных хирургических задач требуется широкий спектр подобных материалов, обладающих различными свойствами, такими как жёсткость, размер пор, способность к рассасыванию в ткани реципиента. Использование различных матриксов позволит регулировать свойства трансплантата в соответствии с клиническими требованиями.

В связи со сказанным разработка и использование нетоксичных, биосовместимых каркасных 3D-структур для стволовых клеток на основе поливинилового спирта, которые могли бы обеспечивать оптимальные условия для адгезии, экспансии иммобилизованных клеток и способствовать полной интеграции имплантата с окружающими тканями, является своевременной и актуальной задачей.

Установлено, что из суспензии клеток эмбриональной печени человека 9–10 недель гестации может быть выделено около 5 %

© И.Г. Васильева, Н.П. Олексенко, Д.Е. Лесовой, 2012

стволовых гемопоэтических клеток, характеризующихся фенотипом CD34⁺ и CD133⁺, а также предшественников гепатобластов, способных к делению и колониеобразованию [7]. Поэтому данная ткань является перспективным материалом для трансплантации при патологиях кроветворной системы и печёночной недостаточности.

Целью настоящего исследования явилось испытание в экспериментах *in vitro* полимера поливинилового спирта в качестве 3D-матрикса для клеточной культуры эмбриональной печени человека.

Материал и методы. Для исследований использовали эмбриональную ткань печени человека 9 недель гестации, полученную в результате аборта. Забор абортивного материала осуществлялся на основании договора. В качестве 3D-матрикса использовали стерильные пластинки поливинилового спирта производства НПЦ «Амфион» размером 5×5×1 мм.

Культуральная смесь состояла из среды Игла (ПанЭко, Россия), раствора Хенкса (ПанЭко, Россия) и сыворотки крупного рогатого скота (БиолоТ, Россия). После промывки изотоническим раствором и выделения ткани печени её механическим способом суспендировали в растворе Хенкса и центрифугировали. После осаждения клетки эмбриональной печени человека ресуспендировали в культуральной среде. Исходная концентрация клеток составляла 4,0 млн/мл. Затем суспензию разливали в чашки Петри и туда же помещали пластинку стерильного поливинилового спирта. Через 15 минут поливиниловая матрица полностью набухла, поглощая (150±20) мкл жидкости. Культивирование проводили на протяжении 14 дней с заменой питательной среды каждые 5 суток. По истечении сроков культивирования матрикс извлекали и помещали в жидкий азот. Для исследований криоконсервированный матрикс нарезали на криостате, толщина срезов составляла 0,1 мм.

Изучали флотацию клеток и немедленно после набухания их замораживали. Оценку острой токсичности исследуемого материала проводили через 24 часа культивирования, а его матриксных качеств – после 7 и 14 суток культивирования. Для исследования распределения клеток в 3D-матриксе в динамике

культивирования подсчитывали число клеток после стандартного гистологического окрашивания гематоксилин-эозином [8].

Результаты и их обсуждение. Через 10 минут после помещения 3D-матрикса в суспензию клеток пластинка поливинилового спирта набухла и увеличивалась вдвое во всех линейных размерах. Подсчёт клеток показывает, что при набухании матрикса клетки флоатируют в него пропорционально их количеству в жидкости, ушедшей на набухание. Исследование криосрезов показало, что клетки на этом этапе в матриксе размещаются неоднородно. Через 10 минут они сконцентрированы в основном в слое 2 мм по краям пластинки (рис. 1, а), однако одиночные клетки встречаются и в глубине матрикса (рис. 1, б). Можно предположить, что стенки ячеек 3D-структур являются механическим препятствием на пути продвижения клеток, создают фильтр, способствующий концентрированию клеток в верхних слоях матрикса.

Через 24 часа культивирования клетки эмбриональной печени человека прикрепляются ко дну чашки Петри, а также к поверхности ПВХ-матрикса, наблюдается также концентрирование клеток на поверхности матрикса и культуральной среды, что указывает на его адгезивные свойства и отсутствие токсичности материала. Кроме того, количество клеток в культуральной среде с ПВХ-матриком близко к таковому в культуральных образцах, свободных от матрикса. Исследование срезов через 24 часа культивирования также показало, что основная масса клеток всё ещё сосредоточена в верхних слоях и на поверхности пластинки (рис. 2, а). По мере продвижения в центральные участки матрикса плотность клеток значительно ниже (рис. 2, б). Проникшие в гель клетки характеризуются фенотипом, свойственным недифференцированным клеткам: крупное ядро окружено узким ободком цитоплазмы.

На протяжении последующего срока культивирования – 7-е сутки – клетки эмбриональной печени человека мигрируют вглубь матрикса (рис. 3, а), при этом их количество в центральных участках значительно возрастает. Наблюдаемые на 7-е сутки клетки сохраняют фенотип недифференцированных клеток (рис. 3, б), а следовательно, и способность к делению и дифференцированию.

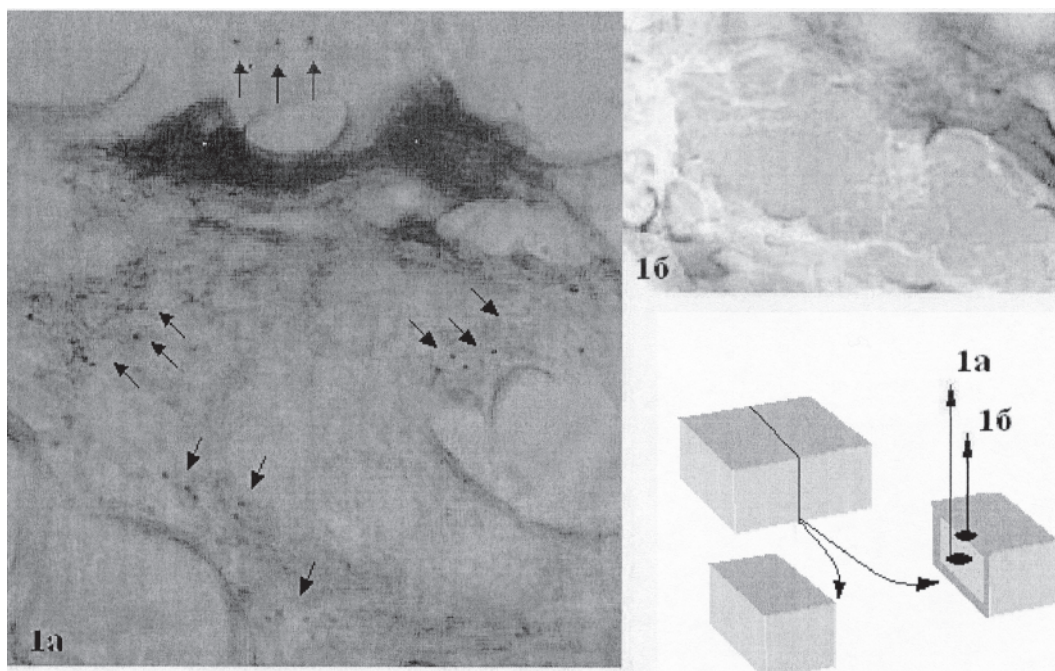


Рис. 1. Суспензия клеток печени человека через 10 мин после адсорбции 3D-матриксом: а – в слое 2 мм по краю пластинки (10×10); б – одиночные, встречаются и в глубине матрикса (40×10). Окрашивание гематоксилин-эозином

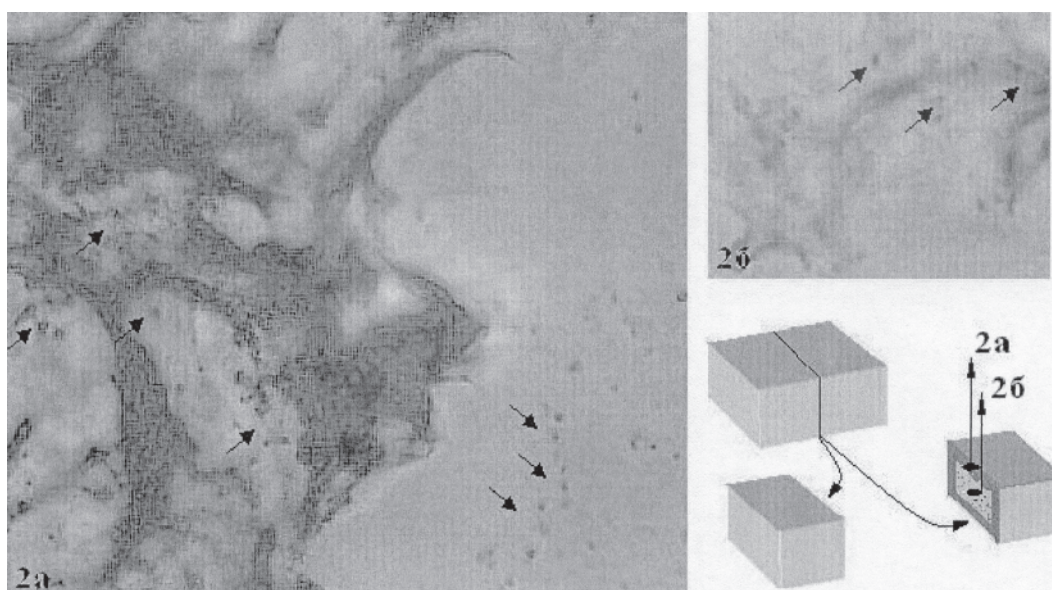


Рис. 2. Клетки печени человека через 24 часа культивирования: а – на поверхности матрикса (10×10); б – на границе матрикса и культуральной среды (10×10). Окрашивание гематоксилин-эозином

К 14-м суткам (рис. 4, а, б) культивирования структура матрикса начинает изменяться: ячейки увеличиваются в размерах, трёхмерная структура теряет свои параметры. Клетки в плоскости среза распределяются более равномерно.

В результате проведённого исследования обнаружено, что трёхмерный поливиниловый матрикс является нетоксичным и обладает выраженными матриксными свойствами для клетки эмбриональной печени человека. Клетки активно прикрепляются к стенкам

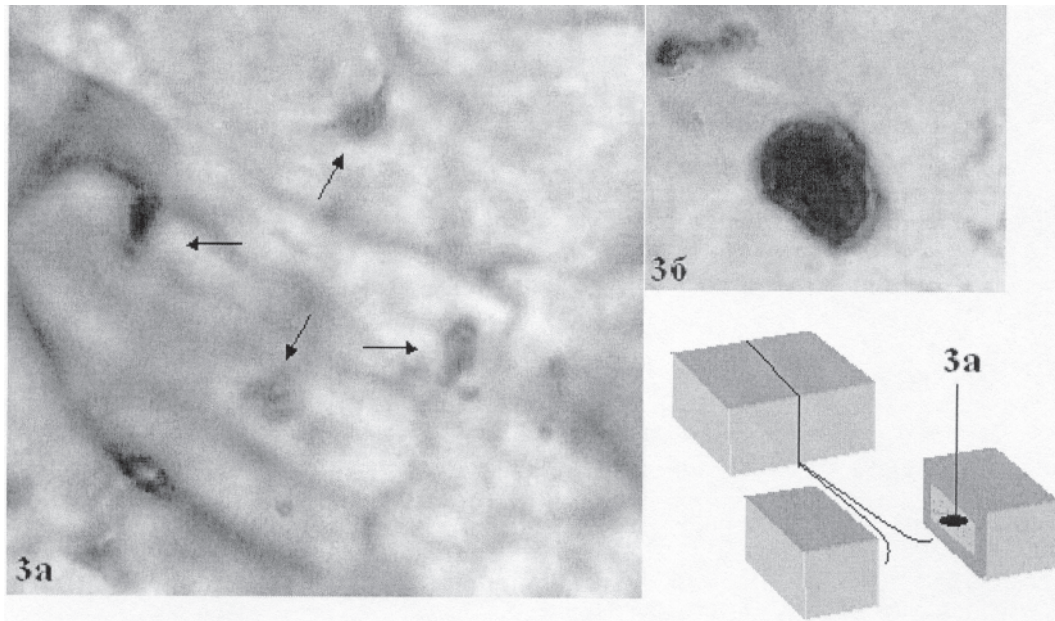


Рис. 3. Клетки печени человека на 7-е сутки культивирования: а – в поверхностном слое плотность клеток несколько снижена (10×10); б – в глубине матрикса количество клеток возросло (40×10). Окрашивание гематоксилин-эозином

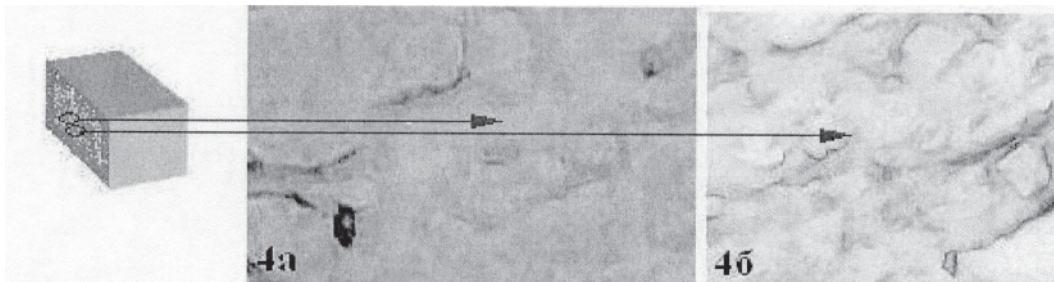


Рис. 4. Клетки печени человека на 14-е сутки культивирования: а – обнаруживаются во всех частях матрикса (40×10); б – структура матрикса меняется: ячейки теряют стенки, увеличиваются в размере (10×10). Окрашивание гематоксилин-эозином

ячеек матрикса, которые являются адекватным субстратом для их адгезии и локомоции.

Следует отметить, что за всё время культивирования клеток мы не наблюдали проявлений дифференцировки в клетках, заключённых в поливиниловый спирт. Они сохраняли фенотип, свойственный стволовым клеткам, – небольшие размеры, высокое ядерно-цитоплазматическое отношение. Обычно такой фенотип характерен для клеток, сохраняющих высокую митотическую активность и способность к миграции. Отсутствовали также контакты между ними, не наблюдалось образования колоний. Все эти характеристики свидетельствуют о сохранении полипотентности клеточной популяции, что особенно важно при использовании поливинилового спирта в

качестве носителя для клеточного материала при трансплантации.

Такие данные позволяют сделать вывод о том, что данный матрикс является нейтральным по отношению к клеткам и его молекулы не несут позиционной информации и не индуцируют дифференцировку тех или иных клеточных типов, что позволяет контролировать этот процесс в зависимости от конкретной задачи.

Таким образом, полученные нами данные позволяют рассматривать синтетический 3D-матрикс поливинилового спирта как перспективный для иммобилизации и направленной доставки клеток эмбриональной печени человека при замещении тканевых дефицитов и дефектов.

Список литературы

1. Культивирование стволовых клеток амниотической жидкости человека в трехмерном коллагеновом матриксе / Д. А. Давыдова, Е. А. Воротеляк, Е. Е. Брагина [и др.] // Цитология. – 2011. – Т. 53, № 4. – С. 325–329.
2. Differentiation of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow and enhancement of cell attachment by fibronectin / N. Ogura, M. Kawada, W. Chang [et al.] // J. Oral. Sci. – 2004. – Vol. 46, № 4. – P. 207–213.
3. Шишковский И. В. Взаимосвязь лазерного дизайна – микроструктуры – свойств пористых 3D матрикс для тканевой инженерии и систем доставки лекарств / И. В. Шишковский // Изв. Самарск. научн. центра РАН. – 2011. – Т. 13, № 4. – С. 45–53.
4. Hyaluronic acid matrix stiffness in 2D and 3D dictates / F. Rehfeldt, A. E. Brown, M. Raab [et al.] // Integr. Biol. (Camb). – 2012. – Vol. 4, № 4. – P. 422–430.
5. Matrix composition regulated three-dimensional network formation / R. R. Rao, A. W. Peterson, J. Ceccarelli [et al.] // Angiogenesis. – 2012. – Vol. 15, № 2. – P. 253–264.
6. Harunaga J. S. Cell-matrix adhesions in 3D / J. S. Harunaga, K. M. Yamada // Matrix Biol. – 2012. – Vol. 30, № 7–8. – P. 363–368.
7. Стволовые клетки фетальной печени / Ю. А. Петренко, О. И. Оченашко, А. С. Лебединский, А. И. Тарасов // www.transplantology.com/index.php?option=com_content&task=view&id=366@Itemid=42
8. Лунна Х. Основы гистохимии / Х. Лунна. – М.: Мир. 1980. – С. 252–266.

I.G. Vasilyeva, N.P. Oleksenko, D.E. Lesovoy

КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ЛЮДИНИ У ТРИВИМІРНОМУ ПОЛІВІНІЛОВОМУ МАТРИКСІ

Досліджено можливість застосування полімеру на основі полівінілу в якості тривимірного (3D) матриксу для культивування стовбурових клітин фетальної печінки людини. В перші дні після висівання більшість клітин знаходиться у зовнішніх шарах матриксу, після 7 діб культивування вони потрапляють у внутрішні шари і на 14-ту добу розташовуються в матриксі рівномірно. Протягом усього терміну культивування клітини зберігали фенотип, характерний для стовбурових клітин, – невеликі розміри та високе ядерно-цитоплазматичне співвідношення. Зроблено висновок, що 3D-матрикс на основі полівінілу не перешкоджає клітинній міграції, підтримує життєздатність клітин та є нейтральним по відношенню до індукції диференціювання.

Ключові слова: 3D-матрикс, полівініловий спирт, фетальна печінка людини, стовбурові клітини.

I.G. Vasilyeva, N.P. Oleksenko, D.E. Lesovoy

HUMAN FETAL LIVER CELLS CULTURING IN THREE-DIMENSIONAL POLYVINYL MATRIX

We have studied the potential of using polyvinyl-based polymer as a three-dimensional (3D) matrix for culturing the stem cells from human fetal liver. During the first days after initial seeding, most of the cells have observed at the external layers of matrix, after 7 day of culturing they have penetrated into the central layers and on 14th day the cells were distributed equally in matrix. It should be note that all time of culturing the cells had stem cells phenotype – small size and high nuclear-cytoplasm ratio. The polyvinyl-based 3D-matrix doesn't obstacle of cell migration, keep the viability of the stem cells and is neutral for cell differentiation induction.

Key words: 3D-matrix, polyvinyl polimer, human fetal liver, stem cells.

Поступила 05.07.12