

В.А. Алексеев, Г.А. Апсолихова, Н.И. Павлова, Т.С. Бобокова,
Н.А. Соловьева, Е.Н. Попов, Х.А. Куртанов

ПОЛУЧЕНИЕ КУЛЬТУРЫ ПЕРВИЧНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ИЗ БИОПТАТА КОЖИ

УДК 616.31-089.843

В данной статье описывается методика получения и поддержания, а также длительного хранения культуры первичных фибробластов кожи человека для лечения различных травм и дефектов кожи. Преимущество описываемого в данной статье метода заключается в его быстроте, простоте и высокой воспроизводимости.

Ключевые слова: первичные фибробласты, клеточная терапия.

In this paper we describe the method of isolation, maintaining and storage of human primary skin fibroblasts to treat damaged skin. The described method is fast, simple and reproducible.

Keywords: primary fibroblasts, cell therapy.

Введение. В современном мире клеточные технологии активно развиваются и за последнее десятилетие достигли значительных успехов, прежде всего, для лечения тяжелых состояний, которые требуют регенерации тканей. Клеточная терапия может применяться при трофических язвах различной этиологии, обширных ожогах, включая лучевые и химические, симптоматическом лечении наследственной патологии, восстановлении сухожилий и косметических проблемах. Среди различных областей использования культивированных клеток можно выделить клеточную терапию на основе фибробластов кожи благодаря их высокому потенциалу в осуществлении процессов репарации. Выделение и культивирование фибробластов кожи является перспективным направлением в современной медицине, благодаря высокой эффективности и относительно низкой себестоимости. В связи с отсутствием иммунного конфликта и невозможностью переноса инфекции при пересадке клеток наибольший интерес представляют аутологичные клетки.

Фибробласты – это гетерогенная клеточная популяция, включающая весь фибробластический дифферон: от мультипотентной мезенхимальной стволовой клетки до дифференци-

рованного фиброцита [1]. Основной функцией фибробластов является продукция и организация внеклеточного матрикса [9] путем синтеза и разрушения коллагена, эластина и основного вещества [2]. Биосинтетический потенциал фибробластов чрезвычайно велик, так, одна зрелая клетка в активном состоянии способна произвести до 3,5 млн. макромолекул коллагена в сутки [4]. Также фибробласты синтезируют различные факторы роста, цитокины, гликозаминогликаны, проэластин, нидоген, ламинин и другие важные компоненты внеклеточного матрикса [1]. После трансплантации в кожу эти функции не утрачиваются, и фибробласты активно производят составляющие внеклеточного матрикса [5], что способствует созданию оптимальной среды для функционирования и пролиферации других клеток.

В настоящее время для лечения дефектов кожи существует возможность использовать как аллогенные, так и аутогенные клетки. При терапии с использованием аутогенных фибробластов наблюдается длительный клинический эффект, исключен риск инфицирования пациента и развития аллергических реакций [7]. Аллогенные клетки можно использовать незамедлительно по экстренным показаниям, что способствует быстрому закрытию раны и обеспечивает быстрое ее заживление, но жизненный срок аллогенных клеток ограничен [8].

Для получения фибробластов из биоптатов тканей используют различные методы: механические и ферментативные. Известен также комбинированный способ, который включает ферментативную обработку и последующую механическую дезагрегацию ткани [3].

Целью данного исследования являлись апробация методики получения и культивирования первичных

фибробластов кожи человека, а также их долгосрочное хранение в условиях жидкого азота.

Материалы и методы исследования. Материалом исследования являлись образцы кожи человека. Забор кожи для получения фибробластов проводили путем биопсии панчером диаметром 4 мм, с предварительным местным обезболиванием 2%-ным раствором лидокаина. Для получения культуры фибробластов была использована модернизированная методика, описанная в [10]. После биопсии биоптат кожи диаметром 4 мм немедленно помещали в транспортировочную среду, состоящую из DMEM с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) и 1× раствора антибиотика-антимикотика.

В лаборатории биоптат кожи помещали в чашку Петри, содержащую небольшое количество транспортировочной среды, и разрезали при помощи скальпеля на 12-18 кусочков одинакового размера.

В заранее желатинизированный 6-луночный культуральный планшет добавляли 700 мкл культуральной среды, состоящей из DMEM (Gibco, LifeTechnologies) с высоким содержанием глюкозы, а также содержащей глутамин и пируват, с добавлением 10%-ной FBS (Gibco, LifeTechnologies) и антибиотиков (пенициллин, стрептомицин) (Gibco, LifeTechnologies). В каждую лунку помещали 2-3 кусочка кожи на расстоянии 5 мм друг от друга, после этого планшет инкубировали в CO₂ инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO₂. Питательная среда менялась по мере необходимости, каждые 4-5 дней в течение первых 15 дней инкубирования.

Кератиноциты начинали появляться на 5-й–7-й день культивирования, в то время как фибробласты – на 14-й–19-й день. Первый пассаж проводили после

ЯНЦ КМП: **АЛЕКСЕЕВ Владислав Амирович** – м.н.с., vldslvalexseev@gmail.com, **АПСОЛИХОВА Галина Александровна** – м.н.с., g.apsolikhova@gmail.com, **ПАВЛОВА Надежда Ивановна** – м.н.с., аспирант ЯГСХА, Solnishko_84@inbox.ru, **БОБОВА Туяна Сергеевна** – к.м.н., с.н.с., tuyana_markova@mail.ru, **СОЛОВЬЕВА Наталья Алексеевна** – к.м.н., ученый секретарь, Sonata608@yandex.ru, **КУРТАНОВ Харитон Алексеевич** – к.м.н., зав. лаб., hariton_kurtanov@mail.ru; **ПОПОВ Евгений Николаевич** – ведущий эксперт технопарка «Якутия», polard2013@yandex.ru.

образования монослоя клеток (25-30 дней), все последующие – 1 раз в 3-4 дня. Смену среды производили через 2-3 дня. В процессе культивирования контроль за состоянием культуры и морфологией клеток осуществляли с помощью инвертированного микроскопа (Leica). При пересадке культуры для отслаивания клеток использовали раствор 0,25%-ного трипсина (Gibco, LifeTechnologies). Для длительного поддержания в культуре и накопления их биомассы клетки рассевались в соотношении 1:3 с добавлением свежей ростовой среды. Заморозка клеток для длительного хранения осуществлялась в криобриках (Nunc) с добавлением в питательную среду 10% DMSO и последующим медленным охлаждением до -86°C в низкотемпературном морозильнике в течение 24 ч, далее образцы погружались в жидкий азот для длительного хранения. Размораживание образцов осуществлялось при комнатной температуре до полного испарения остатков жидкого азота с последующим оттаиванием в водяной бане при температуре 37°C и высеивом в заранее подготовленную питательную среду на площадь, оптимальную количеству имеющихся клеток.

Результаты и обсуждение.

Описанный здесь метод получения культуры первичных фибробластов кожи основан на естественной миграции клеток из биоптата. За счет исключения этапа обработки первичного материала, включающего механическую и ферментативную дезагрегацию, которая является травматичной процедурой для клеток, не происходит гибели значительной части клеток на начальном этапе и сокращается период их адаптации к новым условиям.

С использованием данного метода отдельные кератиноциты начинали мигрировать из биоптата на 5-й–7-й день культивирования (рис.1), а фибробласты – на 14-й–19-й день (рис.2), тогда как при ферментативной обработке биоптата кожи отдельные фибробласты начинают пролиферировать уже на 3-й–4-й день после начала культивирования [6].

Получаемая клеточная популяция гетерогенна, так как выделенные фибробласты находятся на разных стадиях развития (небольшие верете-

новидные активно делящиеся клетки-предшественники; более крупные веретенновидные созревающие клетки; крупные плащевидные зрелые фиброциты) (рис.3).

Культура фибробластов на 30-й день находилась в интенсивной фазе роста (увеличение количества клеток за 72 ч в 2-2,5 раза), что может свидетельствовать о её высоком пролиферативном потенциале, который будет сохраняться при длительном культивировании.

В ходе культивирования фибробласты сохраняли контактное торможение деления клеток, характерное для нормальных нетрансформированных фибробластов: при достижении монослоя клеток пролиферативная активность фибробластов резко падала (рис.4).

Морфологию фибробластов, которые представлены в виде веретенообразных вытянутых клеток с прозрачной цитоплазмой и монослоя, оценивали с помощью инвертированного микроскопа.

Основываясь на морфологическом состоянии клеточной культуры после размораживания, процент выживаемости клеток после однократного цик-

ла замораживания-размораживания и длительного хранения в условиях жидкого азота составил примерно 80-90%.

Заключение. Таким образом, нами отработана воспроизводимая методика получения, культивирования и длительного хранения фибробластов кожи человека. Соблюдение правил асептики и антисептики при получении биологического материала является абсолютным требованием и залогом успешного результата. Для исключения передачи инфекции при использовании клеточного материала фибробласты необходимо тестировать на отсутствие вирусной и микробной контаминации при помощи ПЦР-анализа и иммуноферментного метода. Данная методика является оптимальной для проведения культивирования фибробластов кожи человека в условиях научно-исследовательских лабораторий и медицинских учреждений. Исходя из всего вышесказанного, можно утверждать, что применение фибробластов кожи в клинической медицинской практике является перспективным направлением для лечения различных повреждений кожи. Полученные данные говорят о том, что представленная

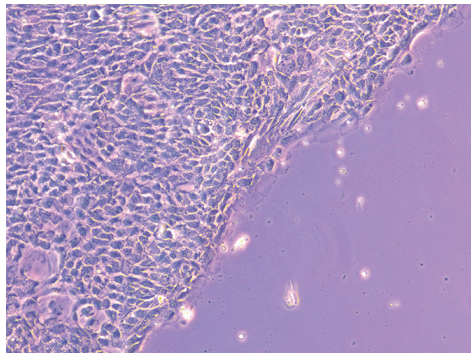


Рис.1. Локус роста кератиноцитов в первичной культуре фибробластов кожи человека (0-й пассаж, 7-е сут культивирования). Фазовый контраст, увеличение $\times 100$

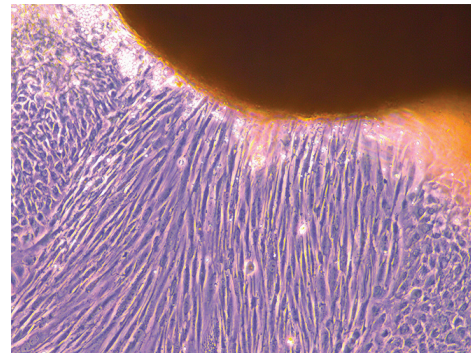


Рис.2. Смесь фибробластов и кератиноцитов кожи человека в первичной клеточной культуре (0-й пассаж, 19-е сут культивирования); виден край биоптата кожи. Фазовый контраст, увеличение $\times 100$

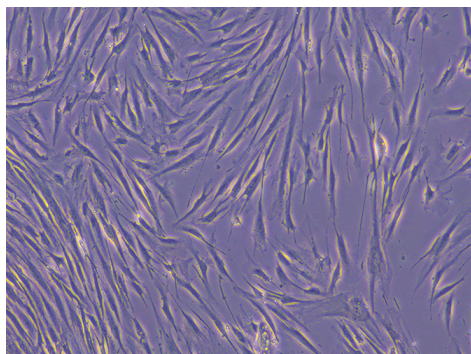


Рис.3. Первичная культура фибробластов кожи человека (0-й пассаж, 25-е сут культивирования), обладающая морфологической гетерогенностью. Фазовый контраст, увеличение $\times 100$

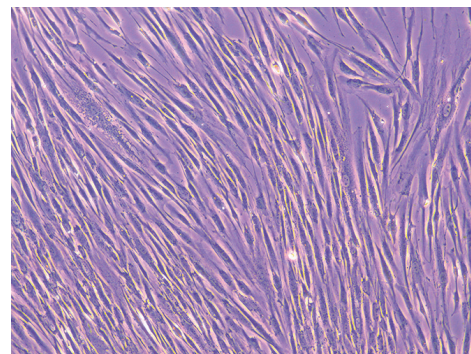


Рис.4. Сформированный монослой культуры фибробластов кожи человека (28-е сут культивирования). Фазовый контраст, увеличение $\times 100$

в статье методика является эффективной, менее трудозатратной и щадящей по отношению к клеткам по сравнению с другими методиками, включающими этапы ферментативной обработки.

Литература

1. Бозо И.Я. «Фибробласт» - специализированная клетка или функциональное состояние клеток мезенхимного происхождения? / И.Я. Бозо, Р.В. Деев, Г.П. Пинаев // Цитология. – 2010. – Т. 52, №2. – С. 99-109.
2. Bozo I.Ja. «Fibroblast» - a specialized cell or the functional state of mesenchymal origin cells? / I.Ja. Bozo, R.V. Deev, G.P. Pinaev // Cytology. – 2010. – V.52, №2. – P. 99-109.
3. Жукова О.В. Патогенез и гистоморфологические особенности рубцовых изменений кожи / О.В. Жукова, Н.Н. Потекаев, А.Г. Стенько, А.А. Бурдина // Клиническая дерматология и венерология. – 2009. – №3. – С. 4-9.
4. Zhukova O.V. Pathogenesis and histomorphological features of scar skin changes / O.V. Zhukova, N.N. Potekaev, A.G. Stenko, A.A. Burdina // Clinical Dermatology and Venereology. – 2009. – №3. – P. 4-9.
5. Makeev O.G. Отчет о трехлетних клинических испытаниях аутологичных дермальных фибробластов для коррекции дефектов кожи / О.Г. Макеев, А.И. Улыбин, П.С. Зубанов, Е.Г. Малишевская // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2008. – №4. – С. 63-70.
6. Makeev O.G. Report about a three-year clinical trial of autologous dermal fibroblasts for the correction of skin defects / O.G. Makeev, A.I. Ulybin, P.S. Zubanov, E.G. Malishevskaya // Herald of Ural Medical Academic Science. – 2008. – №4. – P. 63-70.
7. Миронова С.П. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия) / С.П. Миронова, Н.П. Омеляненко, Л.И. Слуцкий. – М.: Известия, 2009. – Т. 1. – С. 69-70.
8. Mironova S.P. Connective tissue (histophysiology and biochemistry) / S.P. Mironova, N.P. Ome-lyanenko, L.I. Slutsky. – M.: Proceedings, 2009. – V. 1. – p. 69-70.
9. Саркисов Д.С. Теоретические и практические аспекты использования культивированных фибробластов при восстановлении целостности кожного покрова / Д.С. Саркисов, А.А. Алексеев // Вестн. РАМН. – 1994. – №7. – С.6-11.
10. Sarkisov D.S. Theoretical and practical aspects of the use of cultured fibroblasts in restoring the integrity of the skin / D.S. Sarkisov, A.A. Alekseev // RAMS Herald. – 1994. – №7. – P.6-11.
11. Технология получения и культивирования аллогенных и аутологичных фибробластов человека для заместительной клеточной терапии / Г.А. Данлыбаева, Р.А. Аманжолов, В.Т. Кумашева [и др.] // Биотехнология. Теория и практика. – 2011. – №2. – С. 77-81.
12. The technology of obtaining and culturing of allogeneic and autologous human fibroblasts for cell replacement therapy / G.A. Danlybaeva, R.A. Amanzholov, V.T. Kumasheva [et al.] // Biotechnology. Theory and practice. – 2011. – №2. – P. 77-81.
13. Autologous full-thickness skin substitute for healing chronic wounds / S. Gibbs, H.M. van den Hoogenband, G. Kirtschig [et al.] // British Journal of Dermatology. – 2006. – 155 (2). – С. 267-274.
14. Clinical study with allogeneic cultured dermal substitutes for chronic leg ulcers / M. Yonezawa, H. Tanizaki, N. Inoguchi [et al.] // International Journal of Dermatology. – 2007. – №46. – P. 36-42.
15. Human skin stem cells and the ageing process / Christos C. Zouboulis, James Adjaye, Hirohiko Akamatsu [et al.] // Experimental Gerontology. – 2008. – №43. – P. 986-997.
16. Skin punch biopsy explant culture for derivation of primary human fibroblasts / M. Vangipuram, D. Ting, S. Kim [et al.] // J Vis Exp. – 2013. – №7. – P.3779-3791.

А.Н. Бадасян, О.С. Олифинова, А.А. Сергиевич ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ ТЕРАПИИ НА ТЕЧЕНИЕ СПАЕЧНОГО ПРОЦЕССА В БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА

УДК 616.002

В работе представлены результаты влияния антиоксидантов (эмоксипина и мексидола) на течение спаечного процесса в брюшной полости у экспериментальных животных в сравнительном аспекте после моделирования спаечной болезни. Установлено, что у крыс, получавших указанные препараты, отмечается достоверное снижение спайкообразования, происходит оптимизация антиоксидантной защиты, увеличивается количество ремезотелизированных клеток на десерозированных участках брюшины в сравнении с животными в контрольной группе.

Ключевые слова: спаечный процесс, антиоксиданты, лабораторные животные.

In the present work results of influence of antioxidants (emoxypin and mexydol) on formation of adhesions in an abdominal cavity at experimental animals in comparative aspect after modelling of adhesive illness are presented. It is established that in the groups received specified preparations authentic decrease of formation of adhesions is marked with optimization of antioxidant system. The quantity of remezotelized cells on deserosaled sites of peritoneum in comparison with control group are increases.

Keywords: adhesive process, antioxidants, laboratory animals.

Несмотря на успехи и достижения современной медицины, спаечная болезнь в настоящее время остается одной из нерешенных и актуальных проблем абдоминальной хирургии. Частота заболевания, трудности своевременного распознавания, отсутствие

четких критериев лечебной тактики и во многом неудовлетворительные исходы делают проблему спаечного синдрома постоянно актуальной [3, 4, 7]. За последние десятилетия предложено множество способов профилактики образования сращений в брюшной полости, однако до сих пор в современной хирургии нет достаточно эффективных средств для предотвращения спайкообразования в послеоперационном периоде [5, 6, 8].

В последнее время при изучении причин развития различных заболеваний, в том числе и воспалительных, существенную роль в их возникновении

и формировании исследователи приписывают нарушениям в про- и антиоксидантном балансе организма [2].

Целью исследования явилось определение эффективности влияния препаратов, обладающих антиоксидантными свойствами (эмоксипина и мексидола), в сравнительном аспекте на предупреждение и течение спайкообразования у лабораторных животных в брюшной полости после моделирования спаечной болезни в условиях эксперимента.

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось на 60 белых неинбредных взрослых крысах

Амурская ГМА: **БАДАСЯН Армен Нерсесович** – ассистент кафедры, arm_bad@mail.ru, **ОЛИФИРОВА Ольга Степановна** – зав. кафедрой; **СЕРГИЕВИЧ Александр Александрович** – зав. медико-биологической лабораторией ШИКС ДВФУ (г. Владивосток), altexes@mail.ru, sergievich.aa@dvfu.ru.