

З. Б. Квачева¹, Е.И. Гурманчук², Н.И. Мезен², О.В. Петракова², С.В. Корень

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИДЕРМАЛЬНЫХ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В СУБПАССАЖАХ

¹ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии»

Министерства здравоохранения Республики Беларусь,

²Белорусский государственный медицинский университет

Для накопления достаточного количества кератиноцитов в условиях культуры с целью проведения лечения ожогового больного необходимо их субпассирование в течение нескольких недель (2-3 пересева). Чтобы клетки были способны к размножению, они должны находиться не в терминальной стадии своего развития. Поэтому выделение и стимулирование к делению стволовых клеток и клеток-предшественников кератиноцитов (транзиторных клеток) кожи в условиях культуры - необходимое условие накопления клеточной биомассы.

Цель исследования: определение условий роста и накопления эпидермальных кератиноцитов, стимулированных фактором роста кератиноцитов (KGF), при культивировании их в субпассажах.

Материалы и методы

В экспериментах мы исследовали один из индукторов размножения кератиноцитов - KGF, аналог EGF в дозе 20 нг/мл. Использовали образец кожи голени ожогового больного (42 года). После отделения дермы с частью клеток базальной мембраны (базальные кератиноциты), ее измельчали до фрагментов 1x1 мм, из которых клетки были диссоциированы протеолитическими ферментами. После их осаждения центрифугированием и ресуспендирования, концентрация клеток была доведена до 500 тыс в 1мл питательной среды ДМЕМ с 10% сыворотки эмбрионов коров и добавлением KGF в среду роста. Суспензия клеток была рассеяна на пластиковые флаконы, покрытые коллагеном.

В постановке непрямого метода флуоресценции использовали первичные антитела (кроличья антисыворотка к фибронектину), рабочее разведение 1:100 (Sigma, США);

вторичные антитела (козы антикроличьи, меченные ФИТС) рабочее разведение 1:100 (Sigma, США); моноклональные антитела к альфа-интегрину - CD49f (Stem Cell Technologies, Канада).

Для постановки метода проточной цитофлуориметрии использовали моноклональные антитела к альфа-6-интегрину (CD49F) меченные FITC. Анализируемые клетки культивировались в течение 2-х недель в CO₂ инкубаторе. Содержимое культуральных флаконов переливали в пробирки с добавлением 15-20 мл PBS и центрифугировали при 1000 оборотах в течение 5 минут. Надосадочную жидкость сливали, осадок ресуспензировали в 50 мкл PBS. Добавляли антитела в образцы и помещали на 20 минут в холодильник при 4 С. После контакта с антителами часть клеток исследовали в флуоресцентном микроскопе общепринятым методом. Другую часть клеток анализировали на проточном цитофлуориметре **фирмы Beckman Dickinson FACT Callibur**.

Жизнеспособность клеток оценивали при окраске их 0,5% водным раствором трипанового синего. Пролиферативную активность клеток, культивируемых с использованием разных вариант сред, оценивали по среднестатистическим данным накопления клеток в 3-х культуральных флаконах одного и того же исследуемого варианта ростовой среды и пересчету их концентрации на 1мл среды.

Наблюдение за ростом клеток и их морфологический анализ проводили каждые 3 дня (при смене ростовой среды) с использованием световой и фазово-контрастной микроскопии (увеличение в 100-600 раз).

При обработке экспериментальных данных вычисляли среднеарифметические величины, их доверительные интервалы и проводили оценку достоверности различий между исследуемыми группами с помощью критерия Стьюдента [5].

Результаты и обсуждение

В течение 2-3 дней после посева наблюдалось прикрепление части клеток к субстрату и образование небольших размеров колоний и плавающих конгломератов клеток (рис. 2.6 А). Через 6-12 дней роста количество прикрепленных и плавающих клеток во флаконах

увеличивалось в 1,5-2 раза по отношению к посеянным. В это время отмечено появление прикрепленных и плавающих конгломератов клеток крупных размеров (рис. 2.6 Б). Через 12 дней их роста производился пересев накопившихся клеток в соотношении 1:2 с добавлением в питательную среду KGF в той же дозе. Через 4 дня после посева клеток наблюдали удвоение популяции посеянных клеток, затем к 12 дню после посева прирост клеток был менее значительный (30-50 %). Индекс пролиферации (отношение числа выросших клеток к посеянным) составлял к этому времени 2,8-3. При наблюдении за культурами в течение 3-х пересевов пролиферативная активность клеток сохранялась на уровне 1-го пассажа.

В настоящее время исследования продолжаются, данная культура поддерживается в жизнеспособном состоянии.

2.4.2 Фенотипический состав, степень дифференцировки клеток

Был проведен морфологический анализ культивируемых клеток первичных культур и культур кератиноцитов 3-го пассажа (7–28 дней *in vitro*). На основании формы, размеров клеток и их способности формировать колонии в условиях культуры их разделяют на три группы, которые описаны в научной литературе [8]. Согласно данной классификации нам удалось на основании морфологического анализа выявить 3 данных типа кератиноцитов в наших культурах, стимулированных KGF. Морфологические их типы представлены на рисунке 2.7. К ним относятся голоклоны (рис. 2.7 В), параклоны (рис. 2.7 А) и мероклоны (рис. 2.7 Б). Голоклоны и мероклоны (транзиторные кератиноциты) характеризуются небольшими размерами, способностью к большей пролиферативной активности. Выявлена способность к асимметричному делению голоклонов, которые относят к стволовым клеткам, расположенным на базальной мембране. Мероклоны по своим свойствам занимают промежуточное положение между выше описанными клонами кератиноцитов. На более поздних сроках роста культур 16-30 дней наблюдалась дифференцировка кератиноцитов: морфологически они становились похожи на истинные дифференцированные кератиноциты, их количество увеличивалось при удалении из ростовой среды KGF и культивирования только с СЭЖ (рис 2.8).

В настоящее время интенсивно ведутся исследования по установлению маркеров стволовых и прогениторных клеток кожи для их идентификации и сепарации.

Многообещающими в этом направлении является обнаружение на поверхности стволовых и клеток-предшественников рецепторов большинства белков внеклеточного матрикса базальной мембраны, включая коллаген, фибронектин, витронектин, ламинин. Данные рецепторы - интегрины, представляющие собой поверхностные гетеродимерные, трансмембранные линкерные белки, которые обеспечивают адгезию клеток к компонентам

внуклеточного матрикса. Одновременное множественное, но слабое связывание интегринов со своими лигандами позволяет клеткам исследовать свое окружение, сохраняя способность двигаться, что было бы невозможно при слишком прочных взаимодействиях [22,24].

С использованием **прямого метода флуоресцирующих антител** нами была исследована экспрессия рецептора альфа-интегрина на поверхности культивируемых клеток - маркера незрелых кератиноцитов и стволовых клеток базальной мембраны, имеющих наибольшее количество данных рецепторов к белкам внуклеточного матрикса базальной мембраны. Были применены коммерческие моноклональные антитела к данному рецептору (CD49f), меченные ФИТЦ. Как видно из рис. 2.9, на поверхности культивируемых клеток обнаружено разное количество альфа-интегрина, что свидетельствует о принадлежности их к стволовым клеткам и клеткам-предшественникам, имеющим рецепторы к белкам внуклеточного матрикса базальной мембраны. Отмечено небольшое содержание или полное отсутствие интегринов на поверхности кератиноцитов, находящихся в стадии терминальной дифференцировки (рис. 2.9).

Методом проточной цитофлуориметрии и НМФА с использованием моноклональных антител (CD49f) к альфа-6-интегринам, имеющих сродство к белкам внуклеточного матрикса базальной мембраны установлено, что часть культивируемых клеток несут на себе разное количество рецепторов. Это свидетельствует об их принадлежности к стволовым клеткам и клеткам – ткани предшественников кератиноцитов. Методом проточной цитофлуориметрии выявлено, что содержание клеток, несущих на себе данные рецепторы колеблется от 25 до 35 %. Разработана технология получения культуры стволовых клеток, клеток-предшественников, кератиноцитов кожи с использованием в качестве индуктора пролиферации KGF в дозе 20 нг/мл.

Выводы

- Разработана технология получения культуры стволовых клеток, клеток-предшественников, кератиноцитов кожи с использованием в качестве индуктора пролиферации KGF в дозе 20 нг/мл.
- Исследовано пролиферативная активность и фенотипический состав клеток эпидермиса, культивируемых в присутствии KGF в субпассажах. Установлено, что культивируемые клетки несут на себе разное количество рецепторов - альфа-6-интегринов, имеющих сродство к белкам внуклеточного матрикса базальной мембраны, что подтверждает их разную степень стволовости (моноклональные антитела CD49f, метод флуоресцирующих антител).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Васильев А.В., Волошин А.В., Терских В.В. Роль фидерных клеток в прикреплении и росте кератиноцитов человека и крысы // Цитология. 1991. Т. 33, № 12. С. 84-89.
2. Васильев А.В., Волошин А.В., Воротеляк Е.А., Терских В.В. Миграция колоний эпидермальных кератиноцитов человека в культуре // Докл. РАН. 1993. Т. 329, № 2, С. 232-235
3. Малахов С.Ф., Парамонов Б.А., Емельянов А.В., Васильев А.В., Терских В.В. Новые подходы к лечению тяжелых ожогов: трансплантация выращенных в культуре кератиноцитов // Военно-медицинский журнал 1997 Том 318 №9 стр.16-19.
4. Смирнов С.В., Киселев И.В., Роговая О.С. и др. Восстановление кожного покрова путем трансплантации выращенных кератиноцитов. Бюл экспер биол 2003;135:711-713.
5. Полтавцева Р.А, Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшая школа. – 1967. – 322 с.
6. Терских В.В., Васильев А.В. Эпидермальные кератиноциты человека и животных: Проблемы культивирования и трансплантации. – М.: Наука, 1995.- 104 с
7. Хэй Р. Сохранение и оценка качества клеток // в кн.: культура животных клеток / Под ред. З.Фрешни. – М.: Мир, 1989. – с.108-164.
8. Rheinwald J.C., Green H. Serial cultivation of stains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells // Cells – 1975 - № 6 – p.331-344
9. Keratinocyte culture and uses thereof / Hunziker et al. // Unated States Patent № 6 548 058, 2003.
10. Li A. , Simmons P. J. , Kaur P. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol. 95, – P. 3902-3907.
11. Human keratinocyte culture / Staiano-Colco L., Higgina P. J., Darzynklewicz Z. // J. Clin. Invest. – 1986. – Vol. 77, №2. – P. 396-404.
12. Gross M., Furstenberger G., Marks F. Isolation, characterization, and in vitro cultivation of keratinocyte subfractions from adult NMRI mouse epidermis: Epidermal target cells for phorbol esters // Ibid. 1987. Vol 171, № 2. P. 460-474.
13. Shaw A.J. Epithelial cell culture. The practical approach series. – Series ed. D. Richwood, B.D. Hames. – Reconstruction of human skin epidermis in vitro. – 1996. – p. 179-200.

14. Musselman K., Alexandron B., Kane B. Maintenance of the keratocyte phenotype during cell proliferation stimulated by insulin // *J Biological Chemistry*. 2005. Vol. 280, №38 P. 32634-32643

15. Dawson R., Upton Z., Malda J. Preparation of cultured skin for transplantation using insulin-like growth factor 1 in conjunction with insulin-like growth binding protein 5, epidermal growth factor and vitronectin // *Transplantation*. 2006. V 81., № 12. P. 1668-1676.

16. Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide induction of keratinocyte proliferation, NF-kappa B, and cyclin D1 is inhibited by indomethacin / Preciado D., Caicedo E., Jhanjee R., Silver R., Harris G., Juhn S.K., Choo D.I., Ondrey F. // *J Immunol.* – 2005. – Vol.174 – №5. – P.2964-2973.

17. Role of NF-kappaB in constitutive expression of MAIL in epidermal keratinocytes / Oonuma T., Morimatsu M., Ochiai K., Iwanaga T., Hashizume K. // *J Vet Med Sci.* – 2007. – Vol. 69, №3. – P.279-284.

18. Effect of a lipopolysaccharide from E. coli on the proliferation of fibroblasts and keratinocytes in vitro / Yang H., Kaneko M., He C., Hughes M.A., Cherry G.W. // *Phytother. Res.* – 2002. – Vol. 16. – №1. – P. 43-47.

19. Upregulation of TNF-alpha Production by IFN-gamma and LPS in Cultured Canine Keratinocytes: Application to Monosaccharides Effects / Ibisch C., Bourdeau P., Cadiot C., Viac J., Gatto H // *Vet Res Commun.* – 2007. – № 1.

20. Yabe T., Huang C.C. Effect of lipoteichoic acid on proliferation and differentiation of keratinocytes // *Otolaryngol Head Neck Surg.* – 1989. – Vol.101, №6. – P. 646-650.

21. Ekuni D., Firth J.D., Putnins E.E. Regulation of epithelial cell growth factor receptor protein and gene expression using a rat periodontitis model // *J Periodontal Res.* – 2006. – Vol.41 – №4. – P.340-349.

22. [Buck C.A.](#) , [Horwitz A.F.](#) Integrin, a transmembrane glycoprotein complex mediating cell-substratum adhesion // [J. Cell Sci.](#) , Suppl. 8, 231-250, [1987](#) .

23. Giancotti F.G., Ruoslahti E. (1990) Elevated levels of the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells // *Cell* - 1990. – Vol.60 - №5. – P.849-859.

24. Morasso Maria I., Tomic-Canic Marjana. Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, Differentiation and wound healing // *Biol Cell.* - 2005. – Vol.97 - №3. – P.173-183.

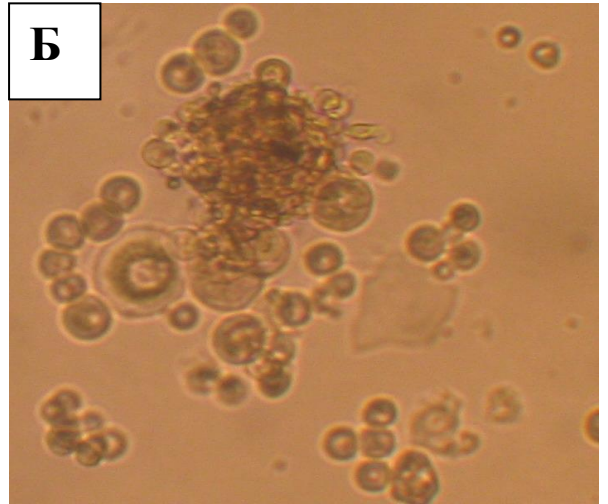
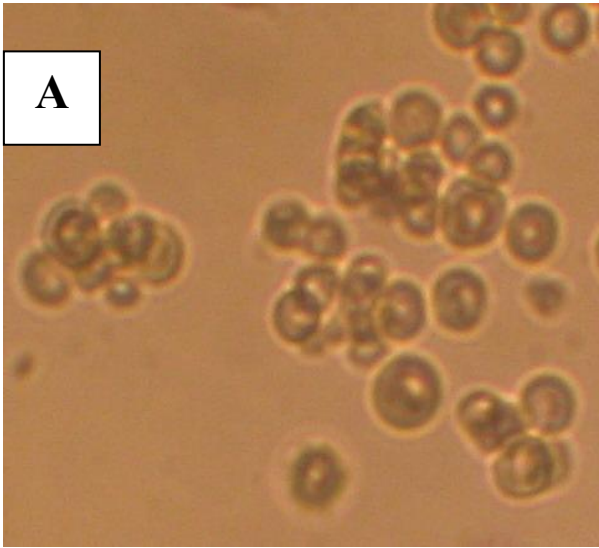


Рисунок 2.6 - Морфология культуры клеток эпидермиса человека, стимулированных KGF в дозе 20 нг/мл (М; 42 года) А – единичные колонии кератиноцитов, 3 дня роста *in vitro*; Б – Формирование крупных колоний кератиноцитов, 12 дней *in vitro*; Световая микроскопия, х 400, живая культура

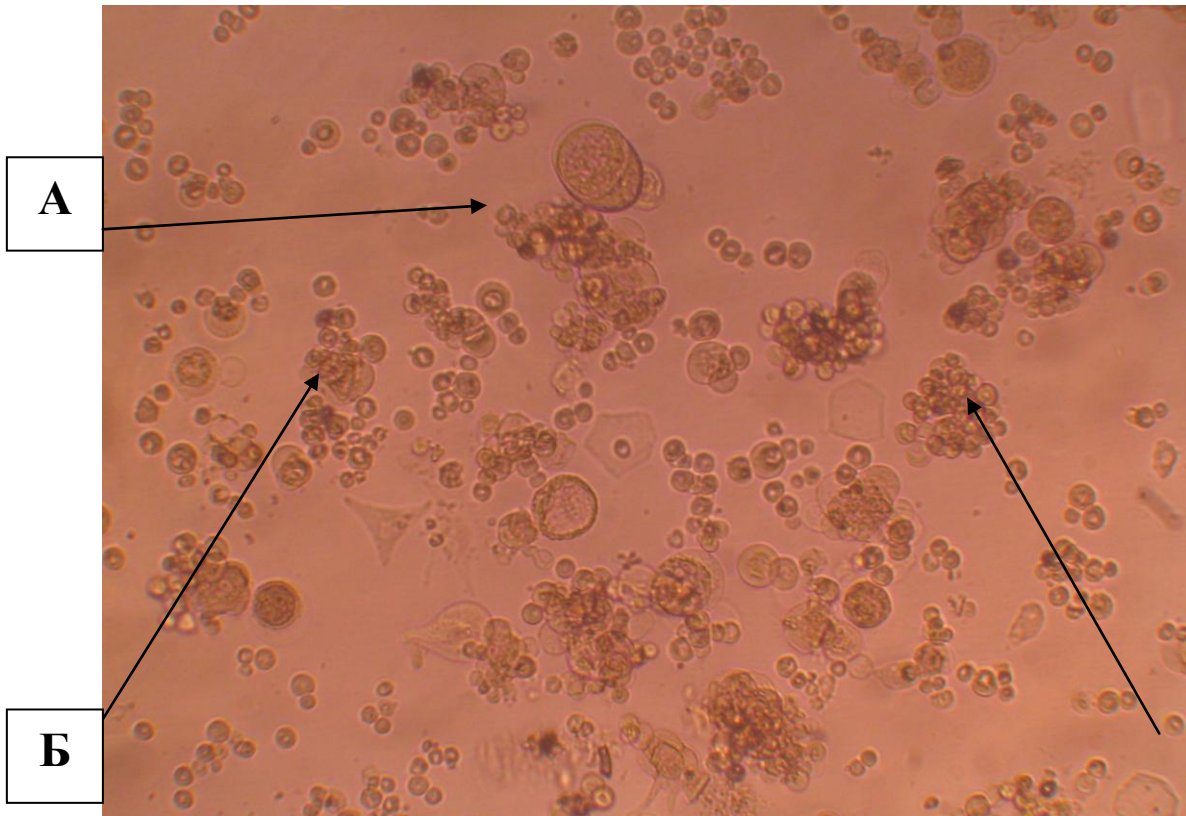


Рисунок 2.7 – Фенотипы (клоны) кератиноцитов, культивируемых в присутствии KGF (20 нг/мл) живая культура (М, 42 года); 10 дней *in vitro* А – параклоны, Б – мероклоны, В – голоклоны. Световая микроскопия, x200

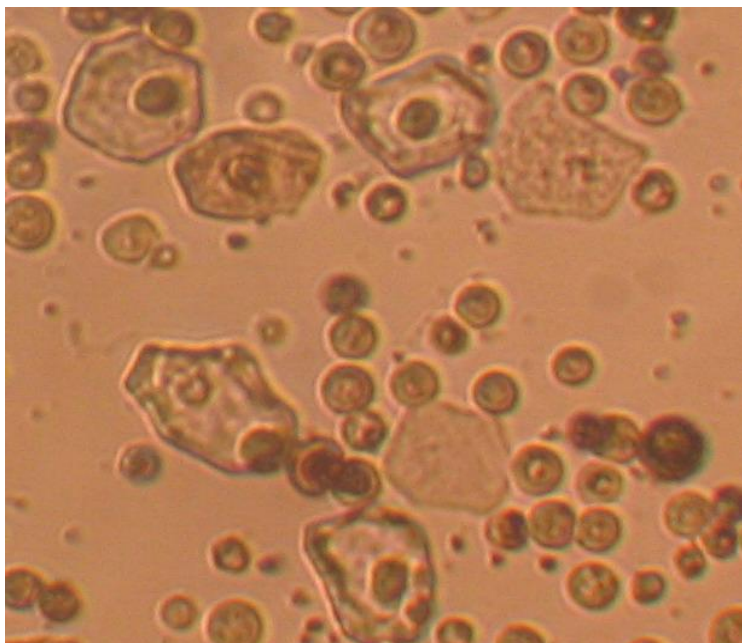


Рисунок 2.8 – Колонии кератиноцитов в процессе дифференцировки (М, 42 года), 28 дней *in vitro*. Световая микроскопия, x 400, живая культура

Рисунок 2.9 – Выявление рецепторов к альфа-интегринам в популяции кератиноцитов, культивируемых в присутствии KGF (М, 42 года), 28 дней *in vitro*, МФА, люминесцентная микроскопия, x400

