

*З. Б. Квачева¹, Е.И. Гурманчук², Н.И. Мезен², М.В. Левченя¹, О.В. Петракова²,
Ю.А. Кабанова¹, С.В. Корень¹, Е.Н. Романюк¹, С.Б. Синило², Л.М. Сычик²*

Изучение условий развития эпидермальных клеток кожи и их пролиферации в условиях монослойной культуры

*1ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии»
Министерства здравоохранения Республики Беларусь,
2 Белорусский государственный медицинский университет*

Изложены результаты исследований по влиянию ряда ростовых факторов и других митогенов и их комбинаций на развитие эпидермальных клеток кожи и их пролиферацию в условиях культуры. Ключевые слова: кератиноциты, культура клеток, ростовые факторы.

Серьезными ограничениями широкого применения культивируемых кератиноцитов (аутологичных и аллогенных) в медицине при заместительной терапии ожоговых и других больных являются методические трудности в получении «обогащенных» культур кератиноцитов, несмотря на то, что их содержание в эпидермисе взрослого человека составляет около 90% [1,2,3,4, 6,7,9,10,11]. Одной из причин этого является невысокая пролиферативная активность этих клеток в условиях культуры (1-10% клеток размножаются, а остальные уже приступили к терминальной дифференцировке) по сравнению с фибробластами. Вследствие этого соотношение их в культуре может изменяться в пользу последних. Проводятся разработки ростовых сред для культивирования кератиноцитов, где вместо сыворотки добавляли экстракт мозга быка, факторы роста, инсулин и некоторые другие митогены. Факторы роста играют важную роль в регуляции пролиферации, дифференцировки кератиноцитов как в организме, так и в культуре [12,14,15,16,17,18]. Имеющиеся литературные данные свидетельствуют, что различные факторы роста действуют на кератиноциты кооперативно и их эффект также зависит от разных внеклеточных факторов и условий культивирования клеток, источника, из которого получены клетки и многих других еще подлежащих исследованию факторов. Суммарный эффект на культивируемые кератиноциты может отличаться от эффекта каждого конкретного фактора роста и поэтому необходимо проведение дальнейших исследований по оптимизации условий роста эпидермальных кератиноцитов, в особенности с учетом возраста доноров [13].

Цель исследования: оптимизация условий культивирования кератиноцитов при использовании ряда ростовых факторов и других митогенов и их комбинаций (фактор роста фибробластов, эпидермальный фактор роста, инсулин, липополисахарид, сыворотка эмбрионов коров (СЭК)).

Материалы и методы

Источниками клеток явились 24 биопсийных образца кожи (0,5x0,5см), полученных от 14 человек разного возраста (18-75 лет) при оперативных вмешательствах по жизненным показаниям. Забор образцов кожи осуществлялся хирургом с согласия донора в асептических условиях. Образцы ткани помещались во флаконы с питательной средой ДМЕМ (Дульбекко модифицированная питательная среда Игла), содержащей антибиотика гентамицин (50 мкг/мл) и амфотерицин Б (10 мкг/мл), тотчас же транспортировались в лабораторию, хранились при +40С не более 4 часов.

Для отделения эпидермиса от дермы, образцы ткани выдерживали в 0,25% растворе диспазы в течение 18-20 часов при +40С. Затем отделяли эпидермис от дермы по линии базальной мембраны с захватом клеток базальной мембраны. Ткань эпидермиса измельчали

на отдельные фрагменты, заливали 0,25% раствором трипсина и 0,1% раствором коллагеназы 1 типа (1:1), (Sigma, США) на 30 мин при + 37°C. По истечении указанного времени флаконы извлекали из термостата, ферменты нейтрализовали добавлением 10% эмбриональной сыворотки. Полученные суспензии клеток пропускали через стерильные фильтры с диаметром пор 200 мкм, затем клетки осаждали центрифугированием при 1200 оборотов в течение 10 минут. Осадки ресуспендировали в питательной среде ДМЕМ с 10% сыворотки и гентамицином – 50 мкг/мл. Количественный выход жизнеспособных клеток определяли при их окраске 0,5% раствором трипанового синего и подсчете в камере Горяева. Посевная доза клеток составляла 500 тысяч в 1 мл ростовой среды.

Культивирование клеток проводили в CO₂-инкубаторе при 37°C. Смену среды осуществляли через каждые 3 дня. Наблюдение за ростом клеток проводили в течение 10-12 дней с использованием светового микроскопа.

В работе применяли ДМЕМ с низким содержанием Ca²⁺ (0,05мМ) (Sigma, США), с отдельными добавками или их комбинациями. В качестве добавок к питательной среде использовали: эпидермальный фактор роста (hEGF, 10 нг/мл) (Stem Cell Technologies, Канада); фибробластный фактор роста (FGF-b, 20 нг/мл) (Stem Cell Technologies, Канада), липополисахарид (LPS, 1 мкг/мл), (Sigma, США); инсулин (ИС, 10 мкг/мл), (Sigma, США); эмбриональная телячья сыворотка, протестированная на отсутствие ингибиторов и наличие ростовых качеств в отношении эпителиальных клеток (производство ГУ НИИЭМ).

Для культивирования кератиноцитов использовали пластико-вые (полистирол) флаконы, с площадью ростовой поверхности 25 см², обладающие высокой адгезивной способностью, предназначенные для культивирования эпителиальных клеток (фирма Costar, США), а также обычные пластиковые флаконы, предназначенные для монослойного культивирования широкого спектра перевиваемых линий клеток, обработанные нами коллагеном 1 типа А или фибронектином (Sigma, США).

В постановке непрямого метода флуоресценции использовали первичные антитела (кроличья антисыворотка к фибронектину), рабочее разведение 1:100 (Sigma, США); вторичные антитела (козьи антикроличьи, меченные ФИТС) рабочее разведение 1:100 (Sigma, США); моноклональные антитела к альфа-интегринам - CD49f (Stem Cell Technologies, Канада).

Для постановки метода проточной цитофлуориметрии использовали моноклональные антитела к альфа-6-интегрину (CD49F) меченные ФИТС. Анализируемые клетки в виде осадка ресуспендировали в 50 мкл PBS. После добавления антител образцы помещали на 20 минут в холодильник при + 4°C. 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. 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

Популяция кератиноцитов эпидермиса кожи весьма гетерогенна. Кроме того, установлено, что в эпидермальных пролиферативных нишах базальной мембраны имеются стволовые клетки и клетки-предшественники. Координированное взаимодействие между

различными клетками кожи (фибробласты, кератиноциты, меланоциты, клетки Лангерганса и др.), как и клетками других тканей и органов осуществляется с помощью межклеточных взаимодействий. С их помощью происходит согласованная регуляция метаболизма, дифференциации, пролиферации и проявления физиологических функций специализированных клеток. Важная роль в регуляции межклеточного взаимодействия принадлежит цитокинам и ростовым факторам, которые, взаимодействуя со специфическими рецепторами, обеспечивают процессы пролиферации клеток, их миграции, дифференцировки и т.д. [8,19,21,22,23,24].

Поэтому нами для оптимизации условий получения культур кератиноцитов был проведен сравнительный анализ изучения их роста в питательной среде с добавками ростовых факторов, митогенов и их комбинаций. Были составлены следующие варианты ростовых сред на основе питательной среды DMEM: DMEM + hEGF, DMEM + FGFb, DMEM + LPS, DMEM + ИС, DMEM + hEGF + ИС, DMEM + hEGF + FGFb + ИС, DMEM + hEGF+ СЭК, DMEM+ СЭК.

Проведено исследование роста клеток на составленных вариантах сред из образцов кожи двух возрастных групп: 1-я - от 18 до 35 лет и 2-я - от 55 до 75 лет. Для этого были приготовлены суспензии клеток эпидермиса в ростовой среде DMEM с 10% СЭК, засеяны во флаконы, поверхность которых покрыта белком внеклеточного матрикса - коллагеном. После 3-хдневной инкубации в термостате во всех флаконах наблюдалось формирование отдельных колоний клеток различных размеров и формы. В это время была осуществлена смена ростовой среды на их варианты, содержащие как отдельные факторы роста и митогены, так и их комбинации (по три флакона с культурой на каждый вариант среды). Следующие смены сред осуществляли каждые 3 дня в течение 12 дней роста культур. Наблюдение за пролиферативной активностью культур и их морфологическая оценка проводились в день смены среды. По истечении 12 суток производился морфологический анализ выросших клеток, их фенотипирование, а также подсчет накопленных в процессе роста клеток во флаконах разных групп. Каждая опытная группа культур росла с использованием одного из вариантов сред, куда добавлялся один из исследуемых стимуляторов роста клеток.

Как видно из данных, представленных на рис.1, наибольшая пролиферативная активность клеток наблюдалась во флаконах, где в питательную среду были добавлены hEGF или FGF-b и культивировались клетки, полученные от молодых людей (18-35 лет). В меньшей степени те же ростовые факторы вызывали накопление клеток в культурах, где источником материала для культивирования явилась кожа людей возраста 55-75 лет. Что касается действия LPS на культивируемые клетки, то увеличение их количества было выявлено через 24 ч после его добавления в культуры клеток от обеих возрастных групп.

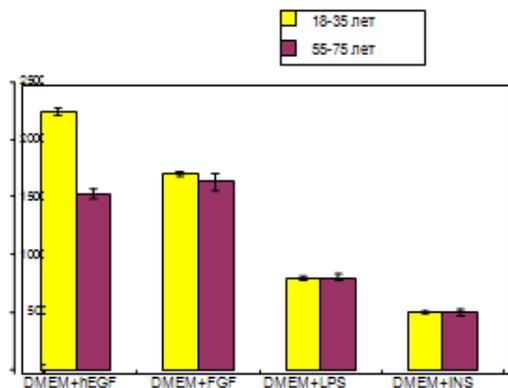


Рисунок 1. Влияние ростовых факторов на пролиферативную активность культивируемых клеток кожи в зависимости от возраста донора.

В последующем, культивирование только с одним препаратом не вызывало пролонгированного прироста биомассы клеток. На 7-е - 10-е сутки наблюдения даже отмечались патологические изменения в клетках: вакуолизация, разрежение колоний клеток и их округление. При окраске клеток трипановым синим, выявлено 47% нежизнеспособных клеток. Не наблюдался также выраженный прирост клеток и интенсивное образование новых колоний при добавлении в питательную среду только одного инсулина в дозе 10 мкг/мл, что возможно связано с недостаточной для стимуляции дозой препарата или другими факторами.

Результаты изучения влияния на пролиферативную активность комбинации факторов и митогенов представлены на рис. 2. Как видно из данных, сочетанное применение разных факторов и митогенов в большей степени стимулировало пролиферативную активность клеток эпидермиса при их длительном культивировании, чем использование отдельных факторов. Высокое накопление клеток отмечено при использовании всех исследуемых комбинаций факторов в ростовой среде: hEGF+FGFb+Ins и hEGF+Ins. Однако в культурах клеток, источником которых были пожилые люди пролиферативная активность была достоверно ниже ($p < 0,05$) и она достигала уровня роста клеток первой возрастной группы только если была добавлена СЭК. Это означает, что кроме используемых ростовых факторов для 2-й группы клеток для их роста необходимы еще и другие стимуляторы роста, которые, по всей видимости, и присутствовали в дополнительно добавленной СЭК.

Для получения обогащенной кератиноцитами культуры эпидермиса немаловажным является подбор ростовой среды такого состава, которая бы стимулировала преимущественный рост кератиноцитов, а не фибробластов, присутствие и пролиферация которых нежелательна, так как при трансплантации последние формируют келоидные рубцы, что нежелательно. В связи с этим, нами оценено влияние всех исследованных вариантов ростовых сред на фенотипический состав культивируемых в течение 12 дней клеток эпидермиса людей разного возраста.

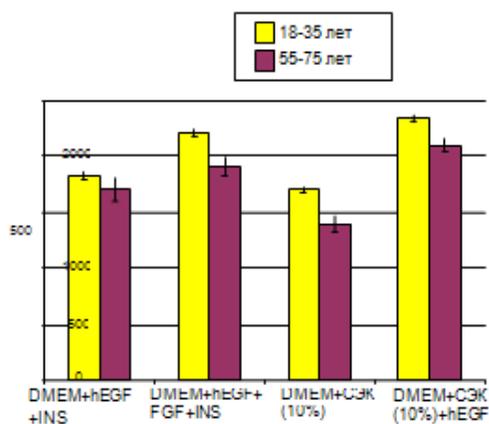
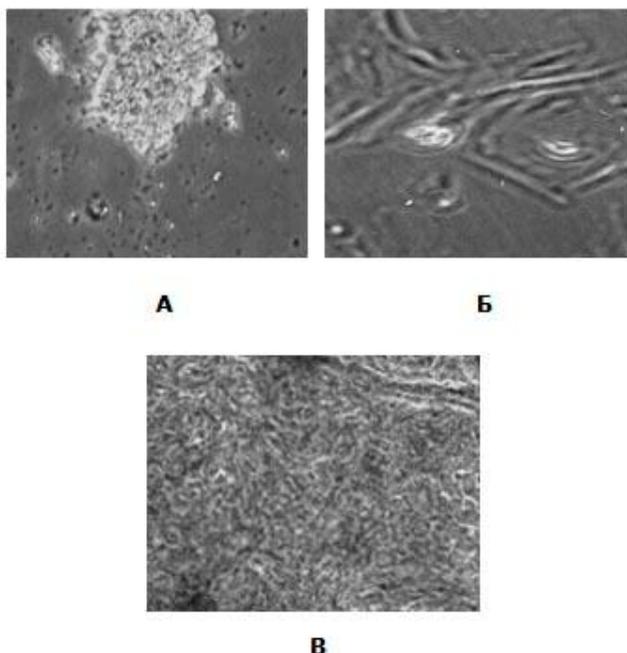


Рисунок 2. Влияние комбинаций ростовых факторов и митогенов на пролиферативную активность культивируемых клеток эпидермиса в зависимости от возраста донора

При морфологическом анализе живой культуры в динамике ее роста выявлена способность к формированию новых очагов одно- и многоядерных типичных для кератиноцитов морфотипов клеток, а также наличие удлинённых, веретеновидных, располагающихся единично или однослойными очагами, характерных для фибробластов клеток (микрофотография 1А,Б,В). Использование в НМФА моноклональных антител к

фибронектину позволило идентифицировать фибробластные клетки и определить, что их процентное содержание в исследуемых культурах составляло 2-3 %.



Микрофотография 1. Морфология культуры клеток эпидермиса человека (20 лет, М). А – колония кератиноцитов, 3 суток in vitro; Б – единичные фибробласты, 3 суток in vitro; В – формирование многопластного слоя кератиноцитов, 14 дней in vitro. Фазово-контрастная микроскопия, x200.

Результаты комплексного анализа фенотипов клеток, культивируемых на разных ростовых средах, из образцов кожи людей разных возрастных групп были сходными и не выявили достоверного различия ($p > 0,05$) (рис. 3). Как видно из данных, исследуемые ростовые факторы, добавленные в питательную среду, неоднозначно влияют на фенотипический состав клеток. Так, при культивировании с hEGF процентное содержание кератиноцитов по сравнению с использованием других ростовых факторов и митогенов наибольшее и составляет 87-90%. В то время как при добавлении FGF или LPS содержание кератиноцитов достоверно снижено до 30-40% ($p < 0,05$).

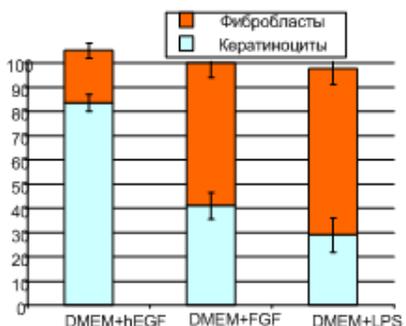


Рисунок 3. Влияние ростовых факторов на фенотипический состав культуры клеток кожи

При использовании комбинации ростовых факторов и митогенов наиболее обогащенные кератиноцитами культуры были получены при добавлении в питательную среду hEGF+INS (92% кератиноцитов) (рис. 4). Комбинация ростовых факторов hEGF+FGF+INS увеличивала пролиферативную активность культивируемых клеток эпидермиса,

однако процентное содержание кератиноцитов в таких культурах снижено до 60% . По данным литературы показано, что FGF стимулирует пролиферативную активность кератиноцитов [6,14]. Наши исследования показали, что инсулин в сочетании с hEGF увеличивает содержание кератиноцитов в культуре и этот фенотип клеток сохраняется на протяжении всего времени культивирования. Такое же митогенное действие инсулина на кератиноциты установлено другими исследователями при использовании его в комбинации с другими факторами, так например, с PDGF-DBB + FGF-2 [6]. Сыворотка эмбрионов коров наиболее богата ростовыми факторами, необходимыми для роста кератиноцитов [8,6,9]. Но как нестандартный компонент ростовой среды ее содержание может быть снижено или, если это необходимо, исключено из состава ростовой среды добавлением hEGF и инсулина. Особенно это возможно, как показали наши исследования, если взяты образцы кожи молодого организма.

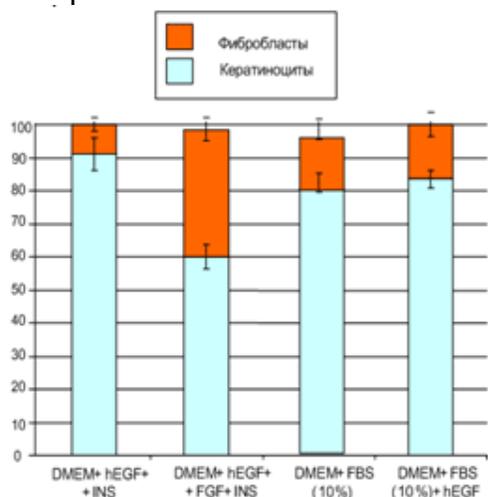
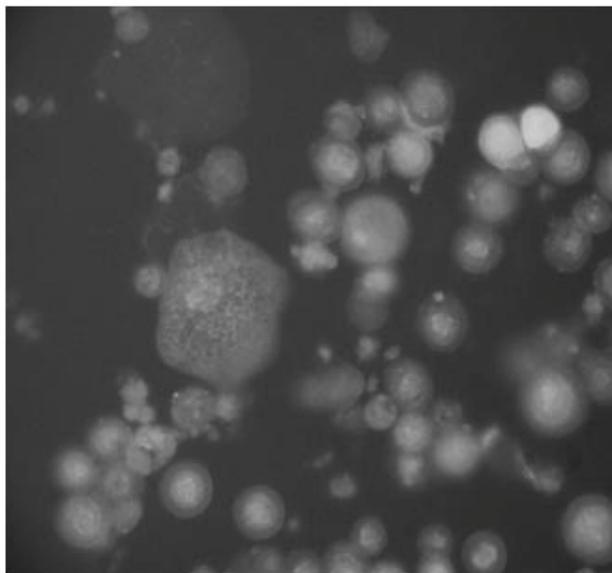


Рисунок 4. Фенотипический состав популяции клеток эпидермиса, культивируемых с разными ростовыми факторами и митогенами

Для установления состава популяции кератиноцитов клеток проведено их фенотипирование с использованием моноклональных антител к альфа-6-интегринам (CD49f) методом флуоресцирующих антител и проточной цитофлуориметрии. Наличие на поверхности клеток маркера альфа-6-интегрина свидетельствует о принадлежности данных клеток к незрелым кератиноцитам и стволовым клеткам [9,12,22,23].

Методом флуоресцирующих антител установлено, что клетки в разной степени экспрессируют данный маркер, что выражается интенсивностью свечения клеток, причём клетки базального слоя экспрессируют данный маркер особенно интенсивно. Отмечено небольшое содержание маркера или полное его отсутствие в дифференцированных, адгезированных и распластанных клетках полигональной формы, что подтверждает их переход в терминальную стадию дифференцировки. Небольших размеров округлые клетки, одиночные или в составе кластеров, имеют ярко выраженное свечение, что свидетельствует об их принадлежности к стволовым и клеткам предшественникам эпителиальных клеток (микрофотография 2).



Микрофотография 2. Морфология культуры клеток эпидермиса человека (42 года, М). Колонии кератиноцитов, 12 дней *in vitro*. Люминесцентная микроскопия, x400

Проточная цитометрия позволяет измерять интенсивность флуоресценции и рассеяния света от клеток, проходящих по одной в потоке жидкости через измерительную ячейку. Поскольку клетки анализируются по одной, в результате измерения имеется не только среднее значение параметра, но и его распределение в популяции. Высокая скорость измерения (до 10³ частиц в секунду) обеспечивает получение статистически достоверных результатов за короткое время. Содержание клеток, экспрессирующих данный маркер колеблется от 25% до 33%, что свидетельствует о наличии пролиферативного потенциала в популяции культивируемых клеток.

Выводы

1. Установлено разное влияние ростовых факторов и митогенов (hEGF, FGF-b, LPS, инсулин, СЭК), каждого в отдельности и в различных комбинациях, на пролиферативную активность и качественный состав (кератиноциты, фибробласты) культивируемых в течение 12 дней клеток эпидермиса кожи людей двух возрастных групп: 1-я - 18-35 лет, 2-я - 55-75 лет.

2. Установлено, что комбинация ростовых факторов и митогенов в большей степени, чем каждый из них, стимулирует пролиферативную активность клеток кожи, но она также изменяет и соотношение разных типов клеток, в некоторых случаях увеличивая содержание фибробластов в культурах hEGF+FGF-b+INS.

3. Наиболее оптимальными условиями для пролонгированной избирательной пролиферации кератиноцитов кожи людей 1-й возрастной группы было добавление в питательную среду ДМЕМ с низким содержанием Ca²⁺ EGF в дозе 10 нгмл и инсулина в дозе 10 мкгмл.

4. Для интенсификации роста кератиноцитов кожи людей 2-й возрастной группы (55-75 лет) необходимо к питательной среде с hEGF и инсулином добавление 5-10 % СЭК.

5. Стабилизирующее влияние оказывает инсулин на преимущественность роста кератиноцитов из образцов кожи всех возрастных групп.

Литература

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. Т. 318. № 9. С. 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. Maintnace of the keratocyte henotype during cell proliferation stimulated by insulin // J Biological Chemistry. 2005. Vol. 280. № 38. P. 32634–3263439.
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 dinding protein 5, epidermal growth factor and vitrontctin // 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-kappa B 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.