

Исследование роста и развития в культуре эпителиальных клеток слизистой оболочки гортани человека при их стимуляции фактором роста кератиноцитов

*ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»,
ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии»*

Основной причиной хронических заболеваний верхних дыхательных путей является нарушение функции мерцательного эпителия с последующим развитием процессов, приводящих к повреждению слизистой оболочки. Трансплантация культуры клеток эпителия на повреждённую поверхность слизистой оболочки верхних дыхательных путей позволит добиться восстановления целостности и функции эпителиального покрова, тем самым предупредить рецидивирование и хронизацию заболеваний. В последние годы перспективным и быстроразвивающимся направлением в трансплантологии для восстановления утраченной структуры и функции повреждённых органов является использование клеточных культур и тканей. Исследования показали, что трансплантация лишь клеток отдельных органов и небольших фрагментов тканей в определённой степени может решить задачи органной пересадки. При этом удаётся избежать нежелательных эффектов, которые присущи трансплантации целых органов, а пересадка 3-5% клеток или тканей от объёма соответствующего органа могут полностью обеспечить его функцию [1,2]. В настоящее время активно используются и разрабатываются методы клеточной терапии в кардиологии, коррекции нейродегенеративных заболеваний и травматических повреждений с использованием трансплантации стволовых клеток и клеток предшественников [3]. Наиболее широкое практическое применение получили культуры клеток эпидермиса для восстановления кожного покрова ожоговых больных [4,5,6,7]. Используя культивируемый эпителий, удавалось путём поэтапной имплантации восстановить до 50% эпидермиса при ожогах 90% всей поверхности тела [4]. Современные клеточные технологии для восстановления кожного покрова основаны на выращивании в культуре эпителиальных пластов кератиноцитов или фибробластов для приготовления живых эквивалентов кожи и их трансплантации на поражённые участки кожи [6,7]. Имеются данные по использованию аллогенных фибробластов в оториноларингологии [8]. В настоящее время разработаны технологии культивирования большинства клеток вне организма. Предложены питательные среды для их роста с использованием различных факторов роста: эпидермальный фактор роста, фактор роста тромбоцитов, фактор роста кератиноцитов и т.д. [9, 10, 11, 12, 13, 14]. Shaw и др. подробно описаны методики получения первичных и пассируемых культур клеток эпителиальной ткани, однако используемые способы требуют совершенствования, оптимизации. Исследования по культивированию эпителия слизистой оболочки верхних дыхательных путей не многочисленны и для избирательного роста эпителиальных клеток необходимо определение видовой специфичности клеток в культуре.

Цель исследования: оптимизация условий культивирования эпителиальных клеток слизистой оболочки гортани при использовании фактора роста кератиноцитов (KGF).

Материал и методы

Источником для получения культур эпителиальных клеток гортани явились 2 биопсийных образца слизистой гортани человека, полученные от пациентов разного возраста (19 и 40 лет). Образцы слизистой оболочки гортани получали из удаленных тканей (для гистологического исследования) во время хирургических вмешательств в асептических условиях. Образцы ткани помещались во флаконы с питательной средой ДМЕМ (Дульбекко модифицированная питательная среда Игла), содержащей антибиотики: гентамицин (150 мкг/мл) и амфотерицин Б (10 мкг/мл), тотчас же транспортировались в лабораторию, хранились при +40С не более 4-х часов.

Для отделения эпителия слизистой оболочки, образцы ткани подвергали обработке 0,25 % раствором диспазы в течение 18-20 часов при +4 оС. Затем отделяли поверхностный слой по линии базальной мембраны. Кусочки ткани эпителия слизистой оболочки измельчали на отдельные фрагменты, обрабатывали 0,25 % раствором трипсина (Sigma, США) в течение 30 мин при + 37 С. 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 об/мин 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 1мл ростовой среды.

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

В работе применяли Дульбекко модифицированную питательную среду Игла с низким содержанием Ca²⁺ (0,05мМ), (Sigma, США). В качестве добавок к питательной среде использовали:

КGF, 20 нг/мл (Stem Cell Technologies, Канада);
эмбриональная сыворотка, 10% (Sigma, США).

Для культивирования эпителиальных клеток использовали пластиковые (полистирол) флаконы, с площадью ростовой поверхности 25 см², обработанные коллагеном типа 1А и обладающие высокой адгезивной способностью, предназначенные для культивирования эпителиальных клеток (фирма Costar, США).

В постановке прямого метода флуоресценции антител и метода проточной цитофлуориметрии использовали моноклональные антитела к альфа интегринам CD49f, меченные FITC (Stem Cell Technologies, Канада);

Для анализа методом прямой иммунофлуоресценции и проточной цитофлуориметрии клетки в культуральной среде центрифугировали в пробирках 10 минут при 1200 об/мин, надосады удаляли. Осадок ресуспендировали в форфатном буфере Дульбеко объёмом 200 мкл. К осадку в виде клеток добавляли моноклональные антитела CD49f (Stem Cell Technologies, Канада) и ставили на 30 минут в холодильник при +2-4 оС. После контакта с антителами часть клеток исследовали в флуоресцентном микроскопе общепринятым методом. Другую часть клеток анализировали на проточном цитофлуориметре FacsCalibur (Becton Dickinson).

Результаты и обсуждение

Для получения культуры, обогащенной эпителиальными клетками, важным условием является подбор ростовой среды с факторами роста, которые стимулировали бы преимущественный рост эпителиальных клеток. С этой целью нами оценено

влияния фактора роста кератиноцитов на эпителиальные клетки слизистой гортани в условиях культуры. При использовании в качестве питательной среды Дульбеко модифицированную среду Игла с низким содержанием кальция и магния и с 10% сывотки эмбрионов коров, а также добавлением KGF в дозе 20 нг\мл, обеспечивался интенсивный рост и пролиферация клеток. При этом небольшая часть диссоциированных клеток слизистой гортани адгезировалась и распластывалась на флаконе покрытом коллагеном типа 1, остальные клетки образовывали пролиферирующие колонии (конгломераты) клеток в суспензии. Количество колоний клеток увеличивалось и достигало своего максимального количества на 7-14 день. Для длительного поддержания в культуре и накопления их биомассы, клетки рассеивались в соотношении 1:2 с добавлением свежей ростовой среды, содержащей KGF в той же дозе. Культивирование клеток и наблюдение за ними проводили в течение 2,5-х месяцев с 5-ю пересевами (пассажами). Индекс пролиферации клеток (отношение количества выросших клеток к посеянным) составлял от 2 до 3. Морфологический анализ клеток в динамике роста культур выявил постоянство их фенотипов, при использовании ростовой среды, содержащей KGF.

Как видно из данных, представленных на рисунке 1 а, конгломераты клеток представлены однотипными или находящимися в стадии деления округлыми клетками, являющимися предшественниками эпителиальных клеток, которые способны к размножению. Единичные клетки или группы адгезированных клеток представлены несколькими фенотипами – дифференцированными клетками, имеющими крупные размеры, кубовидной или полигональной формы, с небольшим центрально расположенным ядром (рис. 1 а, б). Выявлено, что крупных размеров кубовидной формы клетки содержат вакуоли и по всей вероятности принадлежат к секреторным клеткам, продуцирующим муцин (рис. 1 б).

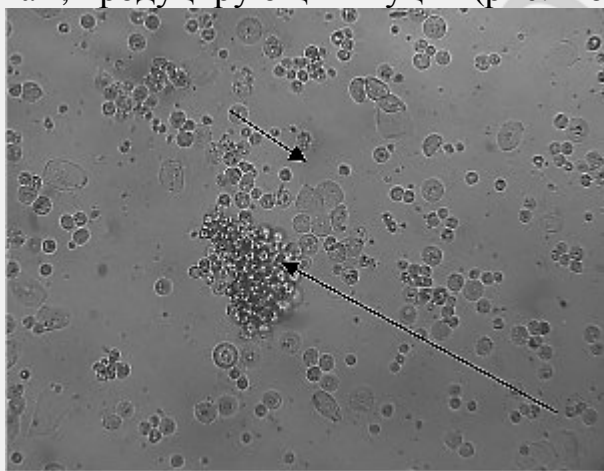


Рис. 1А. Морфология культуры клеток эпителия гортани человека. 7-й день культивирования; длинная стрелка-колония пролиферирующих клеток-предшественников; короткая стрелка-группа эпителиальных клеток в стадии терминальной дифференцировки. Световая микроскопия живой культуры, увеличение 200х

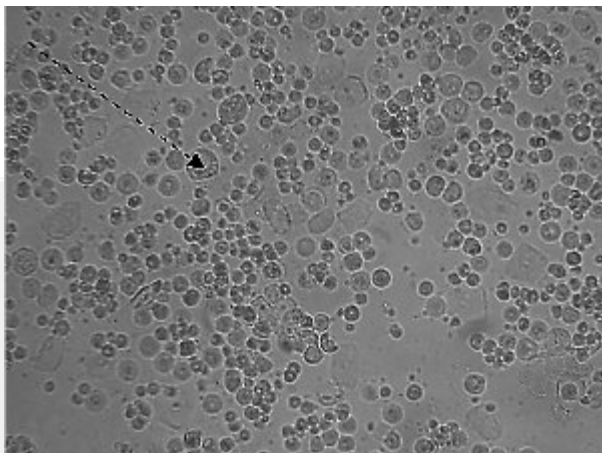


Рис. 1Б. Морфология культуры клеток эпителия гортани человека. 14-й день культивирования; прерывистая стрелка – секреторные клетки. Световая микроскопия живой культуры, увеличение 200x

Фибробластоподобных клеток визуально не выявлено. Для установления природы клеток проведено их фенотипирование с использованием моноклональных антител к альфа интегринам (CD49f). С использованием метода флуоресцирующих антител нами было установлена экспрессия рецептора альфа-интегрина на поверхности культивируемых клеток. Как видно из рисунка 2, клетки в разной степени экспрессируют данный маркер, что выражается интенсивностью свечения клеток. 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.

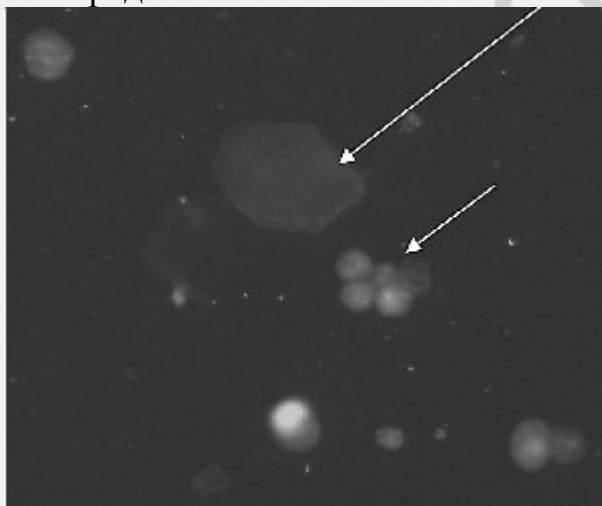


Рис. 2. Экспрессия молекулы CD49f на поверхности эпителиальных клеток слизистой оболочки гортани. Длинная стрелка-эпителиальные клетки в стадии терминальной дифференцировки; Короткая стрелка-колония пролиферирующих клеток-предшественников; Люминисцентная микроскопия, прямой метод флуоресцирующих антител, увеличение 400x

Методом проточной цитофлуориметрии был проведен количественный анализ клеток, экспрессирующих маркер CD49f. Как видно из цитограммы светорассеяния клеток (рис. 3), культура представлена гетерогенной популяцией клеток. Для последующего анализа, в цитограмме было выделено 3 области (R1, R2 и R3), соответственно размеру клеток. В каждой из областей клетки анализировались и высчитывался процент клеток экспрессирующих молекулы адгезии CD49f. Как видно

из цитограммы флюоресценции в координатах FL1 и FL2 (рис. 4) наблюдается высокая степень экспрессии данного маркера на поверхности эпителиальных клеток. Среднее значение количества клеток экспрессирующих маркер CD49f составляет 96%.

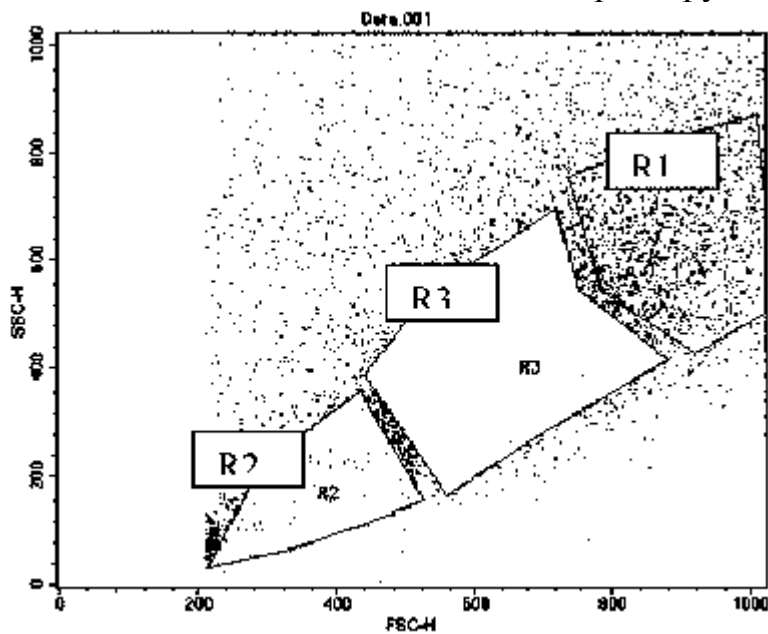


Рис. 3. Цитограмма светорассеяния эпителиальных клеток слизистой гортани в культуре (14 дней роста *in vitro*). Метод проточной цитофлуориметрии.

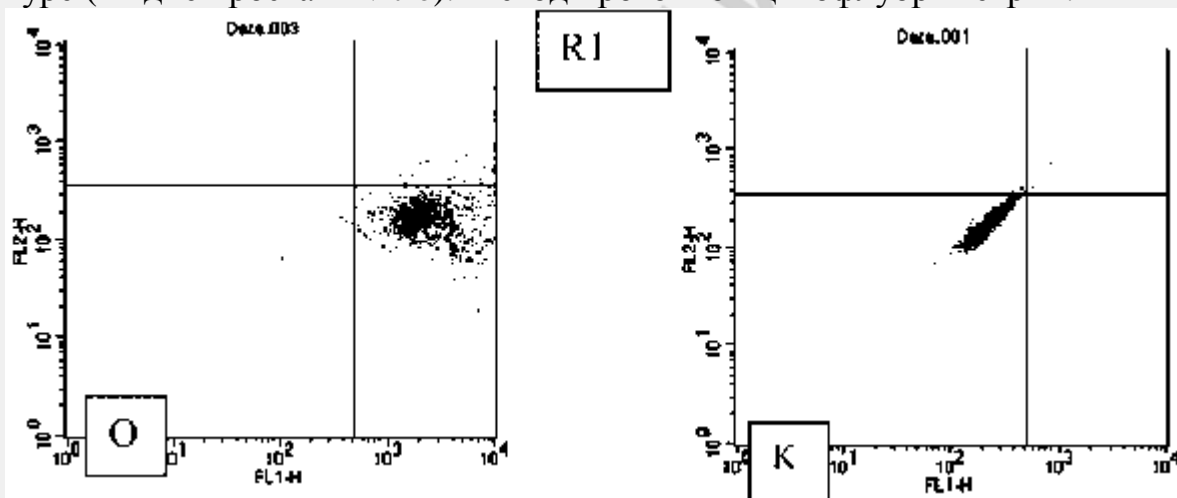


Рис. 4. Цитограммы флюоресценции в координатах FL1 и FL2 эпителиальных клеток слизистой гортани в культуре области R1(14 дней роста *in vitro*). К – контроль, О – опыт. Метод проточной цитофлуориметрии.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Клетки слизистой оболочки гортани имеют рецепторы к фактору роста кератиноцитов, который стимулируют их пролиферацию и их накопление в условиях культуры.

2. Фенотипический состав полученных в культуре эпителиальных клеток с использованием моноклональных антител CD49F выявил их гетерогенный состав: клетки предшественники эпителиальных клеток (с высокой пролиферативной активностью) формируют колонии, обладающие адгезией к субстрату и продуцирующие муцин.

3. Разработанные условия культивирования обеспечивают накопление биомассы клеток, которые в течение 10-14 дней обеспечивают прирост в 2-3 раза.

Дальнейшие исследования позволят изучить возможность применения данной культуры клеток в эксперименте и клинической практике.

Литература

1. Грищенко, В. И. Клеточная и тканевая трансплантация // Лікування та діагностика. 2001. № 3. С. 14 – 18.
2. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса в оториноларингологии: первые итоги и перспективы / А. С. Журавлёв, Е. В. Пуцина, М. В. Калашник, Альмашни Зияд // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. 2003. № 3. С. 27 – 31.
3. Пыко, И. В. Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга: свойства, функции, возможности использования в регенеративной и восстановительной терапии / И. В. Пыко, С. В. Корень, З. Б. Квачева, А. С. Федулов // Медицинский журнал. 2007. № 4. С. 18 – 22.
4. Грин, Г. Использование культур клеток для лечения болезней // В мире науки. 1992. № 1. С. 52 – 59.
5. Терских, В. В. Эпидермальные кератиноциты человека и животных: Проблемы культивирования и трансплантации / В. В. Терских, А. В. Васильев. М.: Наука, 1995. 104 с.
6. 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. С. 16 – 19.
7. Туманов, В. П. Лечение ожоговых ран при использовании культивированных клеток кожи человека // Педиатрия. 1999. № 5. С. 52 – 59.
8. Проблемы применения аллотрансплантатов в оториноларингологической практике / Д. А. Затолока, Т. А. Путилина, А. С. Затолока, В. В. Батов // Клинико-лабораторные аспекты метаболической терапии: сб. ст. II Респ. конф. Витебск, 1999. С. 165 – 167.
9. Иммуобилизованные клетки и ферменты. Методы: пер. с англ. / под ред. Дж. Вудворда. М.: Мир, 1988. 215 с.
10. Культура животных клеток. Методы: пер. с англ. / под ред. Р. Фрешни. М.: Мир, 1989. 333 с.
11. Epithelial cell culture. A Practical Approach / Edited by A.J. Shaw. Oxford University Press, 1996. 218 p.
12. 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.
13. Peter, H. Michelson. Keratinocyte growth factor stimulates bronchial epithelial cell proliferation in vitro and in vivo / Peter H. Michelson, Margaret Tigue, Ralph J. Panos, Peter H.S. Sporn // Am.&Physiol Lang Cell Mol. 2007. Vol.277, P. 737 – 742.
14. Robinson, C. B. Culture of Conducting Airway Epithelial Cells in Serum-Free Medium / C. B. Robinson, R.Wu // J.Tiss. Cult. Meth. 1991. Vol. 13. P. 95 – 102