

Черношей Д. А.

*Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск*

Сыманович О. Ю.

*Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск*

Хватова Л. А.

*Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск*

Музыченко А. П.

*Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск*

РАЗРАБОТКА 3D ИММУНОКОМПЕТЕНТНОЙ МОДЕЛИ КОЖИ НА ОСНОВЕ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ОСНОВНЫХ КЛЕТОК КОЖИ В ФИБРИНОВОМ ГЕЛЕ

Культивирование клеток и тканей человека получило значительное распространение в последнее время вследствие развития регенеративной медицины, необходимости совершенствования и постепенного вытеснения животных моделей и других факторов [2–4]. Тем не менее, для целей изучения патогенеза иммунозависимых заболеваний, разработки и тестирования лекарственных препаратов и методов диагностики и терапии необходимым элементом является иммунокомпетентность модели. Подобные модели могут сыграть важную роль для изучения отдельных механизмов патогенеза, взаимного влияния различных типов клеток, послужить основой для индивидуализации терапии, прогнозирования течения заболевания и его исхода [5]. Целью работы явилась разработка иммунокомпетентной модели-эквивалента кожи с применением основных типов клеток (кератиноциты, фибробласты, дендритные клетки и лимфоциты) на основе фибринового геля.

Материалы и методы. Выделение и культивирование клеток кожи проводили по [1] с модификациями. Для выделения кератиноцитов кожу обрабатывали диспазой, отделяли эпидермис, измельчали, обрабатывали смесью 0,25 % раствора трипсина и 0,01 % раствора ЭДТА, нейтрализовали 10 % ЭТС. Полученные клетки отмывали, подсчитывали и определяли жизнеспособность. Культивирование проводили в среде MCDB 153 с различными добавками.

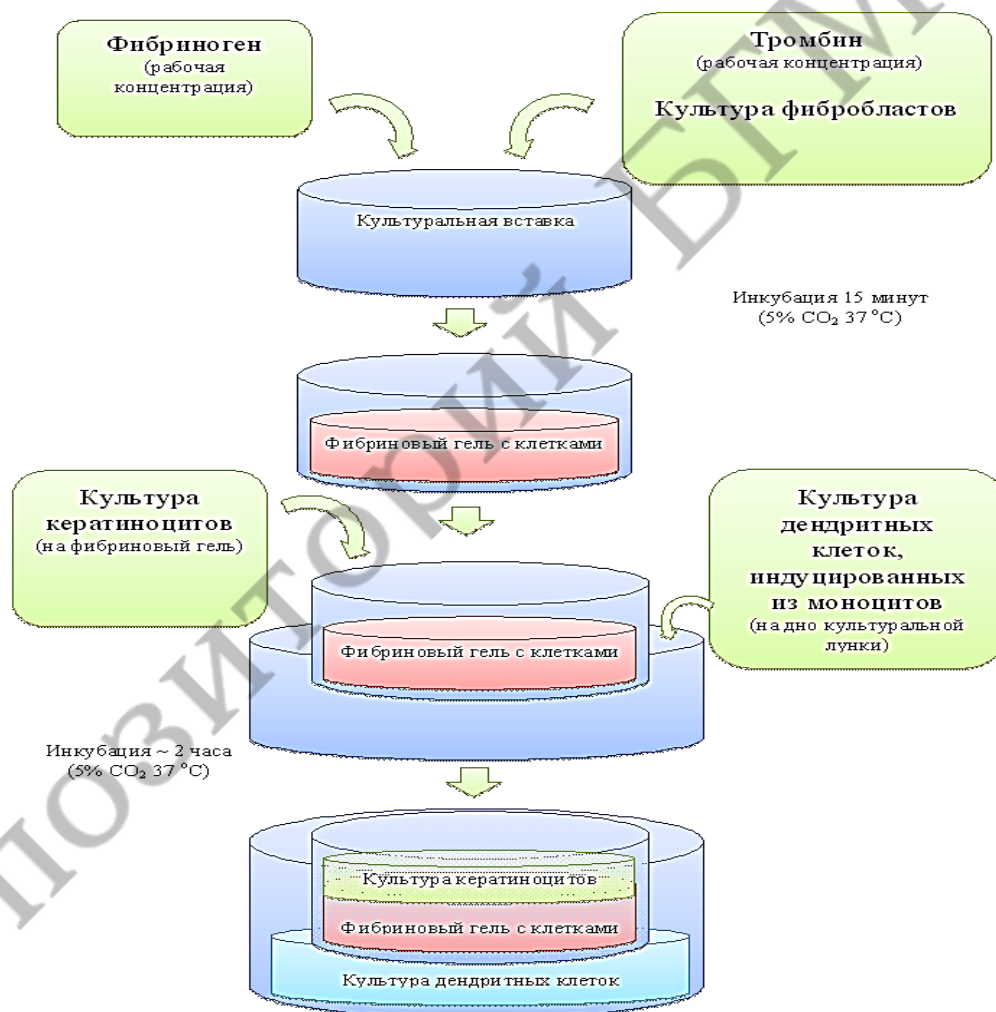
Для выделения фибробластов дерму измельчали, обрабатывали коллагеназой. Полученные клетки отмывали, подсчитывали и культивировали в среде DMEM с добавлением 10 % ЭТС.

Для получения дендритных клеток моноциты периферической крови выделяли адгезионным методом и культивировали в среде AIM V, содержащей GM-CSF (1000 IU/ml) и IL4 (500 IU/ml). Созревание индуцировали TNF-alpha (50 нг/мл).

Приготовление модели кожи на основе фибринового геля. Фибриновый гель получали с помощью набора «Фибринолат» РНПЦ трансфузиологии и медицин-

ских биотехнологий, РБ согласно инструкции производителя. Конечные концентрации фибриногена и тромбина в геле составляли 40 мг/мл и 5 Ед/мл (для фибриногена и тромбина соответственно). Фибробласты вносили в раствор тромбина (конечная концентрация 1 млн/мл), далее в культуральную вставку одновременно вносили рабочий раствор фибриногена и раствор тромбина с фибробластами (1 : 1). После застывания гель погружали в питательную среду. На следующий день на поверхность геля помещали культуру кератиноцитов (105/см²), а на дно лунки культуру дендритных клеток. Полученную систему культивировали - в среде DMEM с 10 % ЭТС с 10 % аминокaproновой кислотой и антибиотиками (рис.).

Рис. Этапы построения 3-D модели эквивалента кожи человека



Методы оценки количественных и качественных характеристик популяций клеток в 3-D эквиваленте кожи на основе фибринового геля. После культивирования гель окрашивали флуоресцеиндиацетатом (FDA): гель помещали в раствор FDA на 30 минут, дважды промывали фосфатным буфером, выкладывали в пластиковую чашку Петри и помещали в трансиллюминатор. Флуоресценцию измеряли на трансиллюминаторе, фотографировали на фотоаппарат системы документирования

гелей, далее преобразовывали в черно-белый формат, инвертировали изображение и измеряли плотность объектов относительно геля без клеток с помощью программы PhotoM 1.21.

Общую ДНК экстрагировали из геля с помощью набора для выделения нуклеиновых кислот и определяли спектрофотометрически. Для построения калибровочной кривой использовались гели, содержащие моноклеары периферической крови практически здоровых лиц в количестве 10^5 – 2×10^6 . Во избежание потерь клеток при культивировании, процедуры окрашивания и выделения ДНК проводились в день приготовления геля.

Результаты и обсуждение. Оценка жизнеспособности клеток при культивировании в 3-D модели. Для определения живых и функционально активных клеток применяли окрашивание с помощью FDA. Общее количество клеток, и живых, и мертвых, определяли спектрофотометрически по общему количеству ДНК. Для построения калибровочных кривых клетки вносили в гели в разных концентрациях и измеряли интенсивность флуоресценции FDA-позитивных клеток и количество ДНК/гель.

При изучении жизнеспособности клеток в 3-D модели эквивалента кожи на основе фибринового геля также ориентировались на интенсивность флуоресценции и количество общей ДНК в геле.

**Изменение показателей, характеризующих жизнеспособность клеток
в модели эквивалента кожи**

	Жизнеспособность клеток в модели (3–4 дня)			Жизнеспособность клеток в модели (7 дней)	
	среднее значение	m		среднее зна- чение	m
Количество ДНК, мкг	1,06	0,084	Количество ДНК, мкг	1,27	0,088
Интенсивность флуоресценции	0,53	0,069	Интенсивность флуоресценции	0,63	0,059

Увеличение количества FDA положительных клеток кожи (кератиноцитов и фибробластов), как и увеличение оптической плотности, характеризующей общее количество ДНК в геле, свидетельствуют об отсутствии негативного влияния компонентов геля на жизнеспособность клеток.

Рост данных показателей является результатом подбора оптимальных условий культивирования, и как следствие увеличения пролиферативной активности клеток.

Заключение. В результате проведенной работы получена 3D иммунокомпетентная модель кожи на основе совместного культивирования основных типов клеток кожи, а также дендритных клеток и лимфоцитов в фибриновом геле. Охарактеризована стабильность системы и жизнеспособность (биохимическая активность) клеток. Разработанная модель в дальнейшем будет применена для изучения функциональной активности различных клеток кожи в норме и при патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Epidermal cells methods and protocols* / Ed. K. Turksen. Humana Press, 2010.
2. *A 3D skin tissue-engineered model for inflammatory and toxicity testing* / J. Chunthapong [et al.] // *European Cells and Materials*. 2008. Vol. 16. P. 42.
3. *Human skin in organ culture and human skin cells (keratinocytes and fibroblasts) in monolayer culture for assessment of chemically induced skin damage* / D. J. Varani [et al.] // *Toxicol. Pathol.* 2007. Vol. 35. P. 693.
4. *An in vitro skin irritation test (SIT) using the EpiDerm reconstructed human epidermal (RHE) model* / H. Kandárová [et al.] // *J. Vis. Exp.* 2009. Vol. 29. P. e1366.
5. *The development of a 3D immunocompetent model of human skin* / Y. S. David [et al.] // *Bio-fabrication*. 2013. Vol. 5. P. 17.

Репозиторий БГМУ