

И.О. Гаврилюк¹, О.И. Александрова², А.Ю. Кузнецова¹,
Т.В. Машель^{2,3}, А.С. Селезнев¹, В.Ф. Черныш¹,
С.В. Чурашов¹, М.И. Блинова², А.Н. Куликов¹

Механическая подготовка амниотической мембраны при создании биоинженерных конструкций для восстановления эпителия роговицы

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

³Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург

Резюме. «Золотым стандартом» среди биологических и синтетических скаффолдов для культивирования является амниотическая мембрана. Ее подготовка для нужд тканевой инженерии связана со сложностями транспортировки и консервации нативной амниотической мембраны. Забор амниотической мембраны выполняли после планового кесарева сечения. Отделенную амниотическую мембрану фиксировали согласно разработанному нами способу [5]. Скаффолды были разделены на 3 группы по 5 мембран в каждой: хранение в условиях гипотермии, криоконсервирование при -20°C и -80°C . В качестве тест-системы использовали стволовые клетки эпителия роговицы кроликов, в качестве контроля – клетки, культивируемые в стандартных условиях. Жизнеспособность определялась с использованием фазово-контрастной микроскопии и микротитрационной пробы. Высказано предположение о том, что угнетение состояния культивируемых на амниотической мембране клеток к 14-м суткам связано с жизнеспособностью собственных клеток амниотической мембраны. Для проверки этого предположения была проведена микротитрационная проба для всех групп скаффолдов. Описанный способ иммобилизации амниотической мембраны обеспечивает транспортировку, консервацию и возможность культивирования стволовых клеток на амниотической мембране. Для культивирования стволовых клеток в течение первых суток подходят все три вида консервации амниотической мембраны. С целью создания биоинженерных конструкций для восстановления эпителия роговицы необходимо продолжение исследований, направленных на поиск оптимального способа дезэпителизации амниотической мембраны.

Ключевые слова: амниотическая мембрана, тканевая инженерия, культивирование клеток, роговица, клеточно-тканевой трансплантат, регенерация роговицы, стволовые клетки, скаффолд, реконструктивная хирургия.

Введение. Одной из нерешенных проблем современной офтальмологии является лечение пациентов, страдающих тотальным фиброваскулярным паннусом, возникшим по причине развития синдрома лимбальной недостаточности [7, 8, 10]. Зрительная реабилитация таких пациентов в настоящее время возможна только при помощи операции оптической кератопластики, которая в свою очередь неэффективна без удаления тотального фиброваскулярного паннуса и восстановления нормального эпителиального покрова роговицы [2]. Наиболее перспективные для этого методики основаны на трансплантации культивированных стволовых клеток эпителия роговицы (СКЭР) или стволовых клеток эпителия полости рта (СКЭПР) на роговичную поверхность [2–4]. Успех такого способа реэпителизации роговицы напрямую зависит от использования не только эффективных факторов роста и подходящего источника клеточного материала при культивировании, но и оптимального субстрата для стволовых клеток (СК) [11].

В настоящее время считается, что «золотым стандартом» среди предложенного множества био-

логических и синтетических скаффолдов для культивирования является амниотическая мембрана (АМ) [11]. Она не только обладает противовоспалительными свойствами и содержит различные факторы роста и цитокины, индуцирующие эпителизацию и заживление ран, но и способна ингибировать патологическое субэпителиальное рубцевание. Кроме того, АМ гистологически напоминает боуменову мембрану роговицы и способна интегрироваться в роговичную строму [1, 6, 9, 12]. Вероятно, именно поэтому в иностранной литературе имеется множество сообщений о создании и применении биоинженерных конструкций (БИК) в виде клеточно-тканевых трансплантатов на основе АМ с культивированными СКЭР и СКЭПР. Однако методики подготовки АМ для этих целей не детализированы или вовсе не описаны.

Отсутствие в нашей стране отработанного протокола механической подготовки АМ для нужд тканевой инженерии связано со сложностями транспортировки и консервации нативной амниотической мембраны с целью создания на ее основе БИК с

культивированными СК. Это связано с тем, что при транспортировке, консервировании, а также культивировании клеток на ее поверхности неиммобилизованная АМ, имеющая толщину около 30 мкм, легко деформируется и сворачивается в тканевой конгломерат. Ее сложно поддерживать в расправленном состоянии. Это затрудняет определение подходящей для культивирования и трансплантации стороны АМ и может быть причиной неэффективной ее консервации, сложности посева клеток на ее поверхность и неравномерного распределения культивируемых клеток.

Цель исследования. Обосновать возможность механической подготовки амниотической мембраны при создании биоинженерных конструкций для восстановления эпителия роговицы.

Материалы и методы. Забор амниотической оболочки выполняли в стерильных условиях операционной после планового кесарева сечения. Перед забором АМ получали согласие рожениц. АМ выделяли путем механического отделения ее от спонгиозного слоя амниона (рис. 1).



Рис. 1. Механическое отделение АМ

Далее полученную мембрану механически фиксировали (рис. 2) в расправленном состоянии к гладким краям стерильной чашки Петри диаметром 3 см со срезанным дном при помощи стерильного зажимного хомута [5].

Подготовленные таким образом скаффолды из нативной АМ помещались в транспортный раствор (1 г цефтриаксона на 100 мл раствора NaCl) и доставлялись в Центр клеточных технологий института цитологии Российской академии наук с целью определения возможности банкирования (методом криоконсервации) фиксированных АМ и культивирования на них стволовых клеток.

Для определения возможности криобанкирования подготовленные скаффолды на основе АМ были разделены на 3 группы по 5 мембран в каждой: 1-я основная (хранение в условиях гипотермии при +4°C), 2-я основная (криоконсервирование при -20°C) и 3-я основная (криоконсервирование при -80°C). Среда для криоконсервации состояла из среды Дульбекко с добавлением питательной среды «F12» фирмы «Gibco» (Соединённые Штаты Америки – США) и диметилсульфоксида в соотношении 1:1.

Для определения возможности культивирования СК на исследуемых скаффолдах в качестве тест-системы использовали популяции СКЭР кроликов. Клетки высевали на поверхность фиксированной АМ и культивировали их в инкубаторе при 37°C в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа в течение двух недель. В качестве контроля использовали клетки, культивируемые в стандартных условиях. Жизнеспособность клеток оценивали по их морфологии и функциональной активности с использованием фазово-контрастной микроскопии (ФКМ) и микротитрационной пробы (МТП). Прижизненное наблюдение с фотофиксацией в процессе культивирования клеток осуществляли под инвертированным

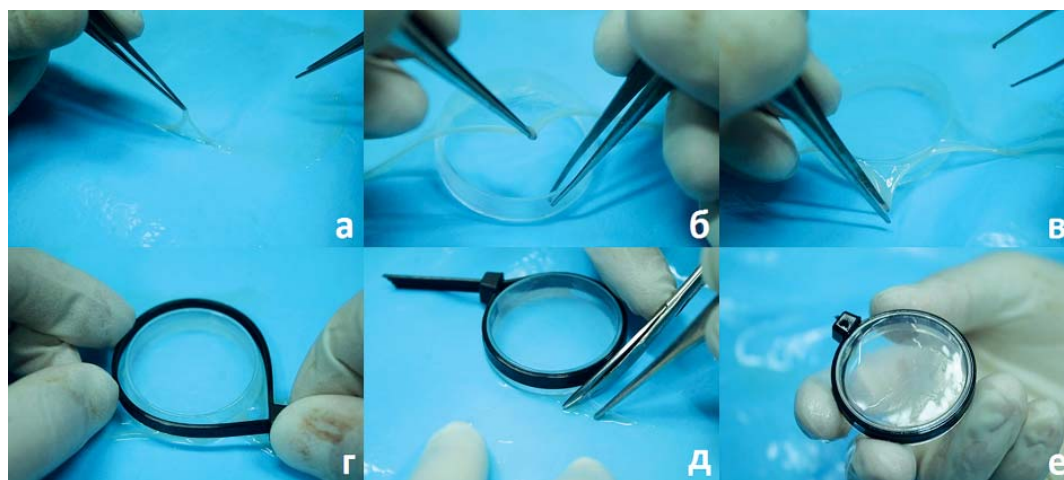


Рис. 2. Этапы фиксации АМ согласно патенту № RU 2680471. а, б, в – нативная АМ в расправленном состоянии укладывается на гладкие края стерильной чашки Петри диаметром 3 см со срезанным дном; г – АМ механически фиксируется при помощи стерильного зажимного хомута; д – нефиксированной части АМ отсекается; е – вид фиксированной АМ

микроскопом «Eclipse TS100» фирмы «Nikon» (Япония), оснащенным фотокамерой. МТП проводили с помощью анализатора «Fluorofot» фирмы «Charity» (Россия) при длине волны 570 нм и референтной длине волны 630 нм.

Математическую обработку полученных данных проводили методами вариационной статистики при помощи программы Microsoft Excel 2007 с определением показателей: среднего значения (M), ошибки среднего (m), достоверности различий между группами сравнения с вычислением критерия Стьюдента (t) и уровня значимости (α), доверительного интервала (p). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Подготовленные скаффолды АМ после транспортировки, криоконсервирования и разморозки остались надежно фиксированными, хорошо расплавленными и сохраняли прежние оптические свойства, что создавало благоприятные условия для посева и культивирования клеток. Скаффолды помещали в чашки Петри большего диаметра и наносили на их поверхность суспензию СКЭР в модифицированной среде Дульбекко с добавлением питательной среды «F12» фирмы «Gibco» (США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки. Клетки хорошо адгезировали на поверхность скаффолдов всех групп и через одни сутки были хорошо распластаны. Однако при дальнейшем культивировании были выявлены различия в морфологии клеток и характере их прикрепления к скаффолдам (рис. 3).

На 3-и сутки культивирования в контроле клетки хорошо распластаны и сформировали субконфлюэнтный монослой. Ни на одном из скаффолдов монослой сформирован не был. Наиболее близким к контролю было морфологическое состояние клеток

в третьей группе. Во второй группе часть клеток была распластана, но наблюдалось много округлившихся клеток. В первой группе распластанных клеток на 3-и сутки культивирования не выявлено.

На 14-е сутки во второй группе наблюдались лишь единичные распластанные клетки. В третьей группе клеток мало, они распластаны хуже, чем на 3-и сутки культивирования, их морфология свидетельствует об угнетенном состоянии.

Таким образом, к 14-м суткам культивирования жизнеспособные клетки остались в небольшом количестве только на АМ криоконсервированной при -80°C . Можно предположить, что угнетенное состояние культивируемых на АМ клеток связано с жизнеспособностью собственных клеток АМ.

Для проверки этой гипотезы была проведена МТП для всех групп скаффолдов, чтобы выявить метаболическую активность клеток амниотического эпителия.

Выявлено, что наименьшее количество выживших клеток АМ наблюдается в скаффолдах криоконсервированных при -80°C (рис. 4).

Применение описанного способа иммобилизации нативной АМ обеспечивает транспортировку, консервацию и применение ее в качестве носителя культивированных СК путем создания надежной фиксации подложки-носителя клеток в жидких системах, что предотвращает ее деформацию в результате движения жидкостей в условиях транспортировки и консервации. Способ позволяет применить нативную или консервированную АМ в качестве носителя клеток.

Среди технических особенностей такого способа, обеспечивающих надежную фиксацию нативной АМ, можно выделить следующие. Во-первых, стерильная чашка Петри является прочной, ареагенной деталью, входящей в состав одноразового стерильного

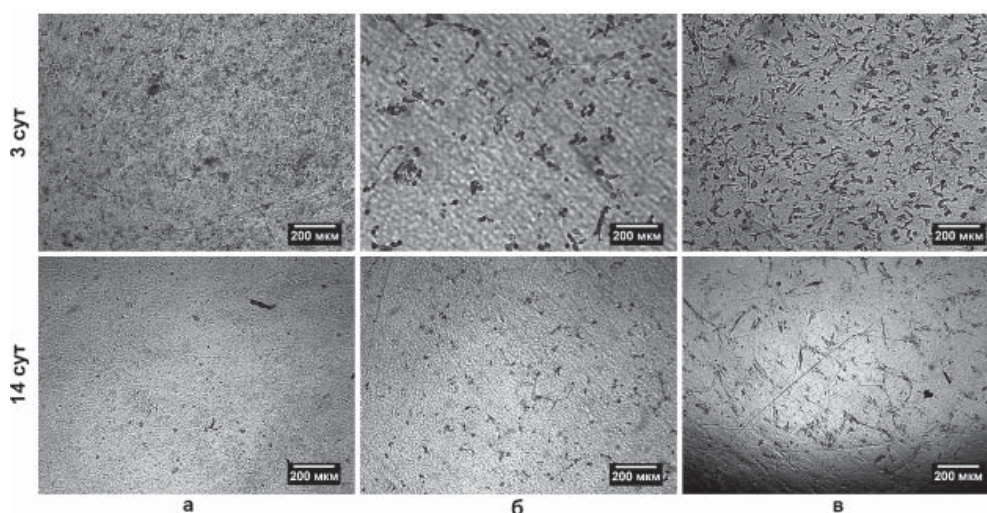


Рис. 3. СКЭР на 3-и и 14-е сутки культивирования на АМ в трех группах: а – нативная АМ $+4^{\circ}\text{C}$; б – криоконсервированная АМ -20°C ; в – криоконсервированная АМ -80°C . Ув. $\times 4$ (фазово-контрастная микроскопия)

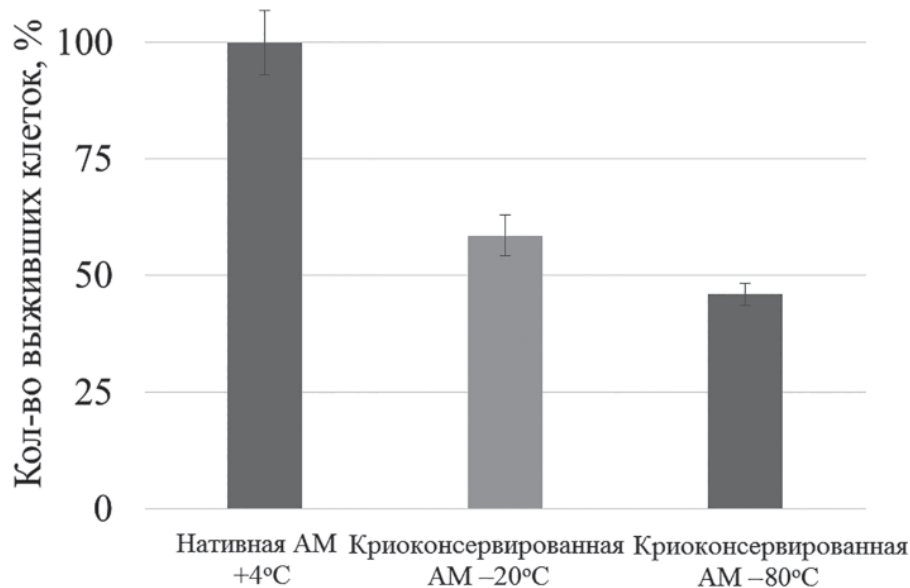


Рис. 4. Результаты МТП для трех групп скаффолдов на основе АМ. За 100% приняты показатели нативной АМ

зажимного устройства, которая изготавливается в стерильных условиях или вторично стерилизуемая. Она не влияет на условия культивирования клеток, из-за широкой наружной поверхности дает возможность надежно зафиксировать нативную АМ и исключает контаминацию АМ и/или культивируемых на ней клеток. Во-вторых, одноразовый стерильный зажимной хомут позволяет надежно зафиксировать нативную АМ без риска нарушения ее стерильности, при этом его ширина соответствует ширине наружной поверхности ободка подготовленной чашки Петри, что создает условия для максимально надежной фиксации. При этом АМ фиксируется с запасом, равным по размеру не меньше, чем ширина одноразового стерильного зажимного хомута, что исключает возможность соскальзывания АМ с гладких краев ободка чашки Петри.

Надежная плотная фиксация АМ обеспечивает герметичность конструкции (АМ с устройством для зажима), что создает оптимальные условия для посева и культивирования клеток, обеспечивая создание БИК на основе АМ.

Заключение. Для культивирования клеток в течение первых суток подходят все три вида консервации АМ. При более длительных сроках культивирования наблюдается угнетение культивируемых клеток. Для длительных сроков культивирования наиболее подходящей из исследуемых вариантов является криоконсервирование АМ при -80°C . Угнетение культивируемых клеток связано с жизнеспособностью собственных клеток АМ. Поэтому с целью создания БИК для восстановления эпителия роговицы необходимо продолжение исследований, направленных на поиск оптимального способа дезэпителизации АМ.

Литература

1. Бойко, Э.В. Об использовании амниотической мембраны с целью конъюнктивной пластики в эксперименте

/ Э.В. Бойко [и др.] // Офтальмохирургия. – 2004. – № 3. – С. 8–12.

- Гаврилюк, И.О. К вопросу о заборе, выделении и культивировании стволовых клеток эпителия слизистой полости рта / И.О. Гаврилюк [и др.] // Современ. технол. в офтальмол. – 2018. – № 4. – С. 60–63.
- Дубовиков, А.С. Исследование возможности применения культивированных на амниотической мембране лимбальных эпителиальных эпителиальных стволовых клеток для лечения лимбальной недостаточности в эксперименте / А.С. Дубовиков [и др.] // Современ. технол. в офтальм. – 2017. – № 4. – С. 72–75.
- Дубовиков, А.С. О применении культивированных на амниотической мембране стволовых клеток роговичного эпителия для устранения лимбальной недостаточности в эксперименте / А.С. Дубовиков [и др.] // Практик. мед. – 2017. – Т. 2, № 9 – С. 67–71.
- Пат. № 2680471 Российская Федерация, МПК C12N 5/00. Способ иммобилизации нативной амниотической мембраны для транспортировки, консервации и применения ее в качестве носителя культивированных клеток / А.С. Дубовиков [и др.]; опубл. 21.02.2019. – Бюлл. № 6. – С. 4–45.
- Ситник, Г.В. Современные клеточные биотехнологии в офтальмологии. Амниотическая мембрана как субстрат для культивирования стволовых эпителиальных клеток / Г.В. Ситник // Белорус. мед. журн. – 2005. – № 3. – С. 13–16.
- Черныш, В.Ф. Ожоги глаз. Состояние проблемы и новые подходы / В.Ф. Черныш, Э.В. Бойко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 183 с.
- Burman, S. Ophthalmic application of preserved human amniotic membrane: a review of current indications / S. Burman [et al.] // Cell and Tissue Banking. – 2004. – Vol. 5. – P. 161–175.
- Endo, K. Human amniotic membrane, like corneal epithelial basement membrane, manifests the alpha-5 chain of type IV collagen / K. Endo // Invest. Ophthalmol. – 2004. – Vol. 45. – P. 1771–1774.
- Lavker, R. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle / R. Lavker [et al.] // Experimental eye research. – 2004. – Vol. 78. – P. 433–446.

11. Nakamura, T. Ocular surface reconstruction using stem cell and tissue engineering / T. Nakamura [et al.] // Prog. Retin. Eye Res. – 2016. Vol. 51. – P. 187–207.
12. Solomon, A. Suppression of interleukin 1alpha and interleukin beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix / A. Solomon [et al.] // Br. J. Ophthalmol. – 2001. – Vol. 85. – P. 444–449.

I.O. Gavriljuk, O.I. Aleksandrova, A.Yu. Kuznetsova, T.V. Mashel,
A.S. Seleznev, V.F. Chernysh, S.V. Churashov, M.I. Blinova, A.N. Kulikov

Mechanical preparation of the amniotic membrane in the creation of bioengineered structures for the restoration of corneal epithelium

Abstract. The «gold standard» among biological and synthetic scaffolds for cultivation is the amniotic membrane. Its preparation for the needs of tissue engineering is associated with the difficulties of transporting and preserving the native amniotic membrane. The amniotic membrane was taken after elective caesarean section. The separated amniotic membrane was fixed according to our method [5]. Scaffolds were divided into 3 groups of 5 membranes each: storage under hypothermia, cryopreservation at -20°C and -80°C . Stem cells of the corneal epithelium of rabbits were used as a test system, and cells cultured under standard conditions were used as a control. Viability was determined using phase contrast microscopy and microtiter test. It has been suggested that the inhibition of the state of cells cultured on the amniotic membrane by the 14th day is associated with the viability of the own cells of the amniotic membrane. To verify this assumption, a microtiter test was carried out for all scaffold groups. The described method of immobilization of the amniotic membrane provides transportation, preservation and the possibility of culturing stem cells on the amniotic membrane. For the cultivation of stem cells during the first day, all three types of preservation of the amniotic membrane are suitable. In order to create bioengineered structures for restoration of the corneal epithelium, further research is needed to find the optimal way to de-epithelialize the amniotic membrane.

Key words: amniotic membrane, tissue engineering, cell culture, cornea, cell-tissue transplant, corneal regeneration, stem cells, scaffold, reconstructive surgery.

Контактный телефон: 8-911-029-93-81; e-mail: vmada-nio@mail.ru