

УДК 611.841.2:576.362/.5.085.23

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2017.3.73-74

Отработка метода культивирования лимбальных эпителиальных стволовых клеток роговицы

А.С. Дубовиков¹, А.В. Конкиева¹, А.Н. Куликов¹, С.В. Чурашов¹, В.Ф. Черныш¹, М.И. Блинова², О.И. Александрова²

¹ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова (194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6),

² Институт цитологии Российской академии наук (194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр-т, 4)

Для анализа возможности культивирования лимбальных эпителиальных стволовых клеток (ЛЭСК) выполнен эксперимент на кроликах породы Шиншилла. Культивирование клеток, полученных из фрагментов ткани лимба выполнялось на питательной среде α MEM. На 8-е сутки был отмечен рост колоний эпителиоподобных и фибробластоподобных клеток. После обработки антителами против цитокератина 19 было подтверждено наличие ЛЭСК в выращенной популяции.

Ключевые слова: лимбальная трансплантация, питательная среда α MEM, эксперимент

Гибель стволовых клеток роговичного эпителия, расположенных в складках палисада Vogt, клинически проявляется лимбальной недостаточностью. При этом, ввиду отсутствия источника регенерации роговичного эпителия, на роговицу нарастает эпителий конъюнктивы, в ее строме образуются поверхностные и глубокие сосуды и происходит формирование сосудистого бельма [1, 2, 4]. Обязательным условием для оптической кератопластики на таких глазах служит восстановление нормального эпителиального покрова роговицы. Это возможно посредством лимбальной трансплантации – пересадки лимбальных эпителиальных стволовых клеток со второго здорового глаза пациента [3]. Однако при этом глаз-донор лишается достаточно большого сектора лимба, что нежелательно из-за возможности развития ятрогенной лимбальной недостаточности. Одним из современных методов, позволяющих избежать этого, считается забор на глаз-доноре небольших (1×2 мм) биоптатов лимбальной ткани, содержащих лимбальные эпителиальные стволовые клетки, и их культивирование *in vitro* в специальных условиях с целью создания клеточного пласта для пересадки [5]. До настоящего времени в мире нет общепринятого стандартного протокола культивирования ЛЭСК *in vitro* для этой операции [3].

Цель настоящего исследования состояла в экспериментальной проверке возможности культивирования лимбальных эпителиальных стволовых клеток в питательной среде.

Лимбальные биоптаты забирали на шести глазах трех здоровых кроликов породы Шиншилла весом 3,5 кг. Выделенное глазное яблоко орошали раствором бетадина и промывали стерильным физиологическим раствором. Под микроскопом роговичную часть лимба иссекали по всей окружности в виде ленты шириной 2 мм и толщиной около 0,2 мм (рис. 1).

Дубовиков Анатолий Сергеевич – клинический ординатор ВМА им. С.М. Кирова; e-mail: dubovikovanatolyi@gmail.com

Выделение клеток из фрагментов ткани выполняли ферментативным способом по методу Sefat et al. [6] в собственной модификации: фермент диспаза был заменен на коллагеназу I типа (Gibco, USA), питательная среда DMEM – на среду α MEM (Lonza, Belgium), которая используется для выращивания мезенхимальных клеток костного мозга. Культивирование осуществляли без фидерного слоя. Все процедуры выполнялись в асептических условиях.

После выделения ткани лимба тщательно промывали в растворе PBS (натрий-фосфатный буфер) и измельчали до 1 мм². Полученные фрагменты переносили в пенициллиновый флакон с раствором коллагеназы I типа в среде α MEM в конечной концентрации 1 мг/мл. Флакон помещали на 1 час в термостат при 37 °С (через каждые 5–10 мин флакон встряхивали). После этого содержимое флакона переносили в пробирку объемом 15 мл и центрифугировали в течение минуты со скоростью 2000 об./мин. Надосадочную жидкость сливали. Осадок ресуспензировали в среде α MEM



Рис. 1. Забор лимбального биоптата.

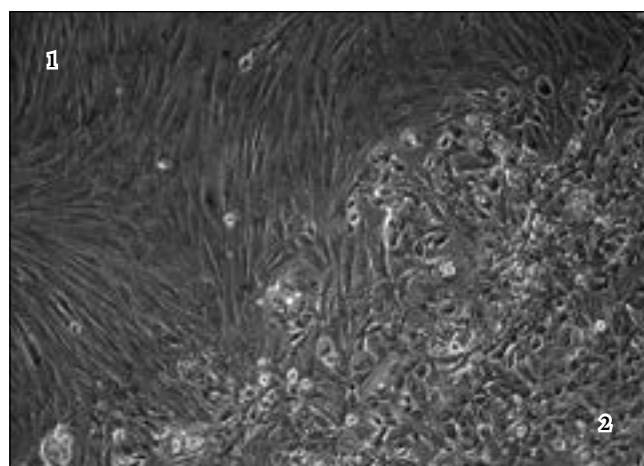


Рис. 2. Клеточная популяция на 8-е сутки:

1 – фибробластоподобные клетки, 2 – эпителиоподобные клетки. Фазово-контрастная микроскопия, $\times 100$.

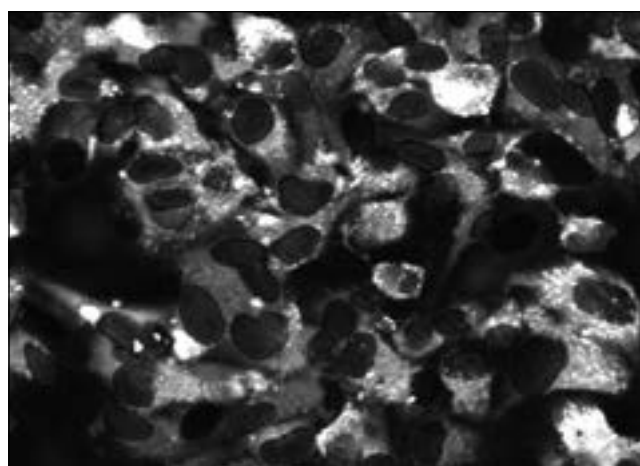


Рис. 3. Клетки с цитоплазмой позитивной на цитокератин 19: реакция с антителами к цитокератину 19 (ядра клеток окрашены ДАПИ). Флуоресцентная микроскопия, $\times 400$.

с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки коров (HyClone, USA). Полученную суспензию в 5 мл питательной среды высевали в чашку Петри и культивировали при 37 °С в углекислом инкубаторе (в атмосфере 5 % CO₂). Через 5 суток 2 мл среды заменяли на свежую. На 8-й день по формировании полного монослоя клеток выполнялся пересев в новые чашки. Для этого питательная среда удалялась, к монослою клеток добавляли 1 мл смеси растворов трипсин/ЕДТА в концентрации 0,25 % (Gibco, USA), и на 1 мин для открепления клеток чашку помещали в термостат при 37 °С. В чашку с открепившимися клетками добавлялась ростовая питательная среда α MEM с 10 % эмбриональной сыворотки коров. Полученную суспензию, перенесенную в пробирку, центрифугировали в течение 5 мин при скорости 1000 об./мин. Супернатант удаляли, осадок клеток ресуспензировали в ростовой питательной среде, и клетки рассеивали в две новые чашки. Было выполнено несколько пассажей.

После посева клетки в течение часа прикрепилась к поверхности чашки Петри. За первые пять суток культивирования они несколько раз делились, а небольшие агрегаты успевали образовать колонии. На восьмые сутки отмечался рост колоний. В них присутствовали два типа элементов различной морфологии: фибробластоподобные и эпителиоподобные клетки (рис. 2). Полученные колонии были криоконсервированы в атмосфере жидкого азота для дальнейшей идентификации: окраска антителами против цитокератина 19 подтвердила наличие лимбальных эпителиальных стволовых клеток в выращенной популяции (рис. 3).

Таким образом, описанная в настоящей работе модифицированная методика выделения и культивирования позволяет получить популяцию лимбальных эпителиальных стволовых клеток в количестве, приемлемом для целей трансплантации.

Литература / References

1. Бездетко П.А., Ильина Е.Н., Наумова О.В. [и др.]. Особенности формирования роговичного эпителия после пересадки

ауто трансплантата при лимбальной недостаточности в эксперименте // Офтальмологічний журнал. 2010. № 1. С. 64–68. (Bezdetko P.A., Ilina E.N., Naumova O.V. [et al.]. Features of the formation of corneal epithelium after autograft transplantation with limbal insufficiency in the experiment // Journal of Ophthalmology. 2010. No. 1. P. 64–68.)

2. Черныш В.Ф., Бойко Э.В. Ожоги глаз. Состояние проблемы и новые подходы. СПб.: Изд-во Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, 2008. 136 с. (Chernysh V.F., Boyko E.V. Eye burns. The problem state and new approaches. Saint Petersburg: Military Medical Academy named after S.M. Kirov Press, 2008. 136 p.)
3. Du Y., Carlson E.C., Funderburgh M.L. [et al.]. Stem cell therapy restores transparency to defective murine corneas // Stem Cells. 2009. Vol. 27, No. 7. P. 1635–1642.
4. Ocular surface disease: Medical and surgical management / M.J. Mannis, E.J. Holland (eds). New York: Springer-Verlag, 2013. 283 p.
5. Pellegrini G., Traverso C.E., Franzi A.T. [et al.]. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium // Lancet. 1997. Vol. 349. P. 990–993.
6. Sefat F., McKean R., Deshpande P. [et al.]. Production, sterilisation and storage of biodegradable electrospun PLGA membranes for delivery of limbal stem cells to the cornea // 3rd International Conference on Tissue Engineering, ICTE2013. Procedia Engineering, 2013. P. 101–116.

Поступила в редакцию 09.12.2016.

ELABORATION OF THE METHOD OF CULTIVATION OF THE LIMBIC EPITHELIAL STEM CELLS OF THE CORNEA

A.S. Dubovikov¹, A.V., Konkieva¹, A.N. Kulikov¹, S.V. Churashov¹, V.F. Chernysh¹, M.I. Blinova², O.I. Aleksandrova²

¹ Military Medical Academy named after S.M. Kirov (6 Akademika Lebedeva St. Saint-Petersburg 194044 Russian Federation), ² Institute of Cytology of the Russian Academy of Science (4 Tikhoretskiy Ave. Saint-Petersburg 194064 Russian Federation)

Summary. To analyze the possibility of culturing limbal epithelial stem cells, an experiment was performed on rabbits of the Chinchilla breed. Cultivation of cells obtained from fragments of limb tissue was performed on α MEM nutrient environment. On the 8th day, the growth of colonies of epithelial-like and fibroblast-like cells was noted. After treatment with antibodies against cytokeratin 19, the presence of limbal epithelial stem cells in the grown population was confirmed.

Keywords: limbal transplantation, α MEM nutrient environment, experiment