

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-142-156

МОДЕЛЬ БИМЕДИЦИНСКОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА КРУПНОМ ЛАБОРАТОРНОМ ЖИВОТНОМ

М.Н. Егорихина, Д.Я. Алейник, Ю.П. Рубцова, И.Н. Чарыкова, А.А. Стручков, А.А. Ежеская, В.И. Загреков, Л.Н. Соснина, Е.В. Загайнова

ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород, Российская Федерация

Цель: разработать модель биомедицинского клеточного продукта, согласующуюся со стратегией «гомологичный препарат» на основе протоколов подготовки клеточной составляющей и скаффолда-носителя для доклинических исследований на крупном лабораторном животном (свинье). **Материалы и методы.** Биомедицинские клеточные продукты – эквиваленты кожи (ЭК) формировали с использованием криопреципитата плазмы крови здоровых доноров и мезенхимальных стволовых клеток (MSCs) жировой ткани человека. Для формирования модельных эквивалентов кожи (мЭК) использовали криопреципитат плазмы крови свиней и MSCs жировой ткани свиней. Наблюдение за состоянием клеток в культуре и в составе эквивалентов проводили с использованием методов светлого поля, фазового контраста (Leica DMI 3000B) и флуоресцентной микроскопии (имиджер Cytoation 5; BioTek, USA). Скаффолды эквивалентов тестировали на цитотоксичность (МТТ-тест, метод прямого контакта). Характеристику плотности распределения клеток проводили авторским способом (Пат. № 2675376 РФ). **Результаты.** Разработан модельный эквивалент кожи (мЭК) для проведения доклинических исследований на крупном лабораторном животном (свинье). В мЭК замещены компоненты, переходящие из алогенных условий в ксеногенные при трансплантации животному. Представлен комплексный подход для подготовки мЭК, включающий забор первичного биоматериала свиньи, выделение и характеристику MSCs жировой ткани, подготовку скаффолда-носителя, соответствующего стратегии «гомологичный препарат». Проведена оценка цитотоксичности скаффолда мЭК. Показано, что мЭК обеспечивает аналогичную эквиваленту кожи (ЭК) механическую поддержку клеток и сопоставимое развитие клеточных событий при культивировании. **Вывод.** Разработана модель биомедицинского клеточного продукта, согласующаяся со стратегией «гомологичный препарат» для доклинических исследований на крупном лабораторном животном (свинье). Представлен комплексный подход, для разработки модельного эквивалента основанный на протоколах подготовки и тестирования клеточной составляющей, скаффолда-носителя и готового модельного эквивалента.

Ключевые слова: эквивалент кожи, скаффолд, мезенхимальные стволовые клетки, доклинические исследования, гомологичная модель.

BIOMEDICAL CELL PRODUCT MODEL FOR PRECLINICAL STUDIES CARRIED OUT ON A LARGE LABORATORY ANIMAL

M.N. Egorikhina, D.Ya. Aleinik, Yu.P. Rubtsova, I.N. Charykova, A.A. Struchcov, A.A. Ezhevskaya, V.I. Zagrekov, L.N. Sosnina, E.V. Zagaynova

Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Objective: to develop a model of a biomedical cell product that is consistent with the «homologous drug» strategy based on protocols for preparing the cell component and scaffold carrier for preclinical studies on a large laboratory animal (pig). **Materials and methods.** Biomedical cell products and skin equivalents (SE), were formed using plasma cryoprecipitate prepared from blood plasma of healthy donors and mesenchymal stem cells (MSCs) of human adipose tissue. Cryoprecipitate from pig blood plasma and human adipose tissue-derived MSCs were used

Для корреспонденции: Егорихина Марфа Николаевна. Адрес: 603600, Нижний Новгород, ул. Семашко, д. 22. Тел. (903) 657-09-59. E-mail: egorikhina.marfa@yandex.ru

For correspondence: Egorikhina Marfa Nikolaevna. Address: 22, Semashko str., Nizhny Novgorod, 603600, Russian Federation. Tel. (903) 657-09-59. E-mail: egorikhina.marfa@yandex.ru

to form model skin equivalents (mSE). Bright-field microscopy, phase-contrast microscopy (Leica DMI 3000B) and fluorescence microscopy (Cytation 5 imager; BioTek, USA) were used to monitor the state of cells in the culture and in the composition of the equivalents. Scaffolds for equivalents were tested for cytotoxicity (MTT test, direct contact method). The cell distribution density was characterized by author's method (Patent No. 2675376 of the Russian Federation). **Results.** An mSE was developed for preclinical studies on a large laboratory animal (pig). In the mSE, components that change from halogen to xenogenic conditions during transplantation to the animal were replaced. A comprehensive approach to preparing mSE was presented. It includes sampling of primary pig biomaterial, extraction and characterization of adipose tissue-derived MSCs, preparation of a scaffold carrier for the corresponding «homologous drug» strategy. Cytotoxicity of the mSE scaffold was evaluated. It was shown that mSE provides mechanical support (similar to SE) to cells, as well as comparable development of cellular events during cultivation. **Conclusion.** A model of a biomedical cell product was developed. This model is consistent with the «homologous drug» strategy for preclinical studies on a large laboratory animal (pig). The paper presented a comprehensive approach to developing a model equivalent based on protocols for preparation and testing of the cellular component, the scaffold carrier and the ready-to-use model equivalent.

Keywords: skin equivalent, scaffold, mesenchymal stem cells, preclinical studies, homologous model.

ВВЕДЕНИЕ

Экспериментальные модели *in vivo* для тестирования новых методов лечения остаются золотым стандартом на доклинических этапах разработки лекарств и новых продуктов тканевой инженерии. В настоящее время наиболее распространено проведение доклинических исследований *in vivo* на мелких лабораторных животных, таких как мыши, крысы и кролики. В то же время не вызывают сомнения преимущества использования моделей крупных животных, которые обусловлены наличием у них органов, по размеру и фенотипу сопоставимых с человеческими. Последнее дает возможность применять оборудование и методики, которые разработаны и используются у людей для имплантации, ведения наблюдения и анализа результатов применения продуктов тканевой инженерии в доклинических исследованиях на животных [1]. Длительные сроки жизни крупных лабораторных животных позволяют проводить продолжительные исследования. Результаты исследований на животных, имеющих близкие к человеку физиологические параметры и сопоставимые темпы метаболизма, могут быть с достаточной степенью достоверности экстраполированы на людей.

При выборе животной модели для исследования биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) необходимо уделять особое внимание видоспецифическим особенностям животных и назначению БМКП. Например, при проведении исследований БМКП, предназначенных для восстановления поврежденных или утраченных кожных покровов, следует учитывать существование огромного разнообразия видов животных, отличающихся по структуре и анатомии кожи. Межвидовые анатомические и гистологические различия кожи имеют важнейшее значение при подборе модели животного со структурой кожи, близкой или аналогичной коже человека [2]. Относительно недавно свинья получила широкое признание в качестве модели для изучения восстановления

кожных покровов человека, поскольку анатомическая и физиологическая структура кожи свиньи очень похожа на человеческую. В противовес свobodнокожим животным (к ним относят кроликов, крыс, мышей), у свиней, как и у человека, имеется сильная связь дермы с фасцией [3]. Толщина и строение эпидермиса и дермы свиньи сопоставимы с таковыми у людей [4]. Еще одна важная черта сходства в строении кожи человека и свиньи – это отсутствие густого шерстяного покрова. Паттерны эпидермальных ферментов, кератиновые белки, гистологическое расположение дермального коллагена IV, фибронектина и виментина, время оборота эпидермальной ткани кожи свиньи и человека имеют высокую степень сопоставимости [5]. Кроме того, ориентация и распределение кровеносных сосудов в дерме свиньи аналогичны распределению сосудов в коже человека [6]. Поэтому многие специалисты считают, что свинья является наиболее релевантной животной моделью для исследования эффективности применения эквивалентов кожи и изучения заживления ран.

В то же время при проектировании дизайна доклинических исследований следует учитывать не только физиологическую близость выбранной модели животного, но и имеющиеся отличия. Например, известно, что иммунная система свиней достаточно близка к человеческой. Однако она имеет и ряд существенных отличий [7]. A. Summerfield et al. (2015) показали, что иммунокомпетентные клетки кожи свиньи также обладают комплексом характеристик, отличающих их от человеческих [8]. Развитие регенеративного процесса кожных покровов неразрывно связано с работой иммунной системы. Еще более значим иммунный ответ при трансплантации в область раневого дефекта продуктов тканевой инженерии. Общеизвестно, что продукты тканевой инженерии не являются инертными, а обладают высокой биологической активностью. Последняя может быть связана как с клеточным компонентом,

так и с неклеточным компонентом (искусственным внеклеточным матриксом/скаффолдом). Наличие биологической активности неизменно приводит к вопросу о гистосовместимости и иммуногенности таких продуктов. При разработке тканеинженерных конструктов наличие гистосовместимости и гипоиммуногенности учитываются относительно организма человека. Так, например, часто одним из ключевых компонентов БМКП являются мезенхимальные стволовые клетки (Mesenchymal Stem Cells – MSCs). Они обладают рядом свойств, стимулирующих развитие регенеративного процесса поврежденных тканей, и характеризуются гипоиммуногенностью, связанной с отсутствием рецепторов HLA класса II и иммуномодулирующим действием MSCs [9]. Последнее расширяет потенциал применения таких конструктов в аллогенных условиях. Однако при проведении доклинических исследований на животных моделях продукты тканевой инженерии из аллогенных условий переходят в ксеногенные, что априори повышает риск развития конфликта организма реципиента с имплантируемым конструктом. Поэтому при проведении доклинических исследований необходимо учитывать наличие филогенетических различий даже при использовании очень близкой к человеку модели животного. При проведении доклинических исследований, направленных на доказательство эффективности применения БМКП, с целью минимизации отрицательных результатов, обусловленных реакцией организма на ксеногенный компонент, разрабатываемые продукты могут быть модифицированы в направлении стратегии «гомологичный препарат». В связи с этим актуальны разработки моделей гомологичных БМКП для определенных видов лабораторных животных.

Цель исследования: разработать модель биомедицинского клеточного продукта, согласующуюся со стратегией «гомологичный препарат» на основе протоколов подготовки клеточной составляющей и скаффолда-носителя для доклинических исследований на крупном лабораторном животном (свинье).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1.1. Общие принципы работы

Все манипуляции по выделению и культивированию клеток, работы с кровью и ее производными, работы по формированию и культивированию гидрогелевых скаффолдов проводили в помещении класса С в стерильных условиях ламинаров (класс А) в лаборатории биотехнологий ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России. Ростовые среды в процессе культивирования клеток и гидрогелевых скаффолдов регулярно контролировали на стерильность, контаминацию микоплазмами и вирусами, наличие грибковой флоры. Протокол исследования был одоб-

рен локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России и утвержден ученым советом ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России. Каждый человек, включенный в исследование, представил добровольное информированное согласие.

1.2. Получение первичного донорского материала

В качестве источника человеческой плазмы крови использовали периферическую кровь 3 здоровых добровольцев. Кровь забиралась утром натощак из кубитальной вены в полимерные контейнеры «RAVIMED» (Польша) с раствором гемоконсерванта CPDA-1®. Плазму крови выделяли путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 20 мин. После центрифугирования проводили отбор плазмы крови. Полученную плазму крови замораживали и хранили при температуре –40 °С. В качестве исходного материала для получения мезенхимальных стволовых клеток использовали жировую ткань, полученную в процессе косметических операций в отделении реконструктивной и пластической хирургии Университетской клиники ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России. Материал был получен от трех молодых женщин, средний возраст которых составил 29,3 года (от 20 до 34 лет).

1.3. Выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток человека

Мезенхимальные стволовые клетки человека выделяли из жировой ткани человека (Human Adipose-derived Stem Cells – hASCs) с помощью тепловой ферментативной обработки коллагеназой (Sigma-Aldrich, Германия) и культивировали в полной ростовой среде (среда α – MEM, 20% телячьей эмбриональной сыворотки (ТЭС), глутамин, антибиотики пенициллин/стрептомицин) при абсолютной влажности, +37 °С, 5% CO₂ (CO₂-инкубатор, Sanyo, Япония). Были использованы среды и реактивы фирмы Gibco® (UK), пластик фирмы Costar (США). По достижении субконфлюэнтного монослоя (60–70%) культуру пересевали. Для экспериментов использовали культуры 3–4-го пассажа. В работе использовали hASCs с подтвержденным дифференцировочным потенциалом в адипогенном, остогенном и хондрогенном направлении. Жизнеспособность клеток перед введением в эксперимент составляла 98–99%. Иммунофенотип клеток был характерен для мезенхимальных стволовых клеток (MSCs): клетки экспрессировали CD 90, CD 105, CD 73, CD 44, CD 10 и не экспрессировали CD 45, CD 14, CD 34, HLA DR, что соответствовало критериям, определенным Международным обществом по клеточной терапии для мезенхимальных стволовых клеток.

1.4. Оценка концентрации и жизнеспособности клеток в культуре

Концентрацию и жизнеспособность клеток подсчитывали с помощью счетчика клеток Countes (Invitrogen, США) используя прижизненный краситель трипановый синий (Sigma-Aldrich, Германия).

1.5. Определение иммунофенотипа мезенхимальных стволовых клеток человека

Перед началом эксперимента определяли фенотип клеток с помощью панели моноклональных антител CD 90 FITC, CD 105 PE, CD 73 PE, CD 44 FITC, CD 45 PC5, CD 34 PC7, CD 14 PC5, CD 10 PC7, HLA-DR PC7 (Becton Dickinson, США) с соответствующими изотипическими контролями на проточном цитофлуориметре BD FACS CANTO II (Becton Dickinson, США).

1.6. Забор материала для получения мезенхимальных стволовых клеток свињи и плазмы крови свињи

В качестве тестовой культуры использовали мезенхимальные стромальные клетки, выделенные из жировой ткани свињи (Pig Adipose-derived Stem Cells – pASCs). Для разработки модельного эквивалента кожи использовали плазму крови свињи. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России (протокол № 8). Все процедуры работы с животными проводились в условиях вивария в операционной с соблюдением правил асептики и антисептики и требований European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (N 123 of 18 March 1986; ETS No. 170, June 22, 1998, Strasbourg).

В качестве источника pASCs использовали трех поросят породы Ландрас (возраст 8 недель, вес 13–15 кг, женского пола). Животные вводились в эксперимент после прохождения карантина в течение 14 дней. До начала операции животных тщательно мыли с использованием мыльного раствора. В операционной за 10–20 минут до начала общего обезболивания выполняли премедикацию внутримышечным введением препарата «КсилаВет» (Pharmamagist Ltd, Венгрия). Операцию забора материала проводили под сочетанным обезболиванием: после внутривенного введения Пропофола (B-Braun, Германия) животных интубировали, поддержание анестезии осуществляли Севораном (Abbott, UK). При проведении обезболивания использовали наркозный аппарат Fabius CS (Dräger Medical GmbH, Германия), мониторинг частоты пульса и насыщения артериаль-

ной крови кислородом проводили монитором Nihon Kohden (Япония).

Операционное поле последовательно обрабатывали 5% спиртовым раствором йода, затем 70% этиловым спиртом. Для получения MSCs жировой ткани забирали подкожно-жировую клетчатку в области спины животного в объеме 10–30 см³. Забор тканей производили с использованием электродерматома ACCULAN® 3Ti Dermatome GA 670 (Braun, Германия). С операционного поля последовательно электродерматомом снимали слой кожи и верхний слой подкожно-жировой клетчатки (1,2 мм). После этого забирали образцы подкожно-жировой клетчатки (толщина лоскута 1,2 мм, ширина лоскута до 10 мм; глубина залегания слоя до 2,4 мм). Образцы подкожно-жировой клетчатки многократно тщательно промывали для удаления примесей крови в растворе Хенкса с антибиотиками (100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, Sigma, Германия).

Забор крови для получения плазмы крови проводили из бедренной вены. Катетеризацию вены проводили под контролем УЗИ (SonoSite SLL Ultrasound System, USA). Кровь забирали в контейнеры «RAVIMED» (Польша) с раствором гемоконсерванта CPDA-1®. Процедура выделения плазмы крови свињи соответствовала процедуре выделения плазмы крови человека, описанной в разделе 1.2. Эвтаназия осуществлялась путем воздушной эмболии под наркозом.

1.7. Выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток свињи

Клетки из жировой ткани выделяли с помощью механической дезагрегации и тепловой ферментативной обработки 0,2% раствором коллагеназы I типа (Sigma, USA) в течение часа. После этого клетки культивировали в полной ростовой среде в культуральных флаконах 25 см². Для работы использовали среды и реактивы фирмы Gibco® (UK), пластик фирмы Costar (США). Первую смену ростовой среды проводили через 72 часа. В последующем смену среды проводили дважды в неделю. После формирования субконфлюэнтного монослоя (60–70%) культуру пересевали. В экспериментах использовали культуры 3–4-го пассажа. Культивирование клеток на всех этапах проходило в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) при 37 °C, 5% CO₂, абсолютной влажности.

1.8. Оценка дифференцировочного потенциала

Дифференцировочный потенциал клеток оценивали на культурах 3-го пассажа. Для проведения дифференцировки применяли набор Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit (R and D systems, США).

1.9. Определение иммунофенотипа клеток свиньи

Определение иммунофенотипа клеток свиньи проводили методом многоцветного анализа с помощью прямой реакции иммунофлуоресценции. В работе использовали панель моноклональных антител CD 44 FITC, CD 90 PerCP-Cy5.5, CD 10 PC7, CD 45 PE (Becton Dickinson, США) с соответствующими изотипическими контролями на цитофлуориметре FACS CANTO II (Becton Dickinson, USA). Настройка параметров измерения была выполнена однократно и стандартизирована при помощи частиц для проверки и настройки прибора BD™MCS&T Beads (BD Cytometer Setup and Tracking Beads). Окрашенные клетки инкубировали 30 минут и отмывали для дальнейшего определения иммунофенотипа. Результаты выражали как долю клеток, несущих соответствующий маркер (в процентах).

1.10. Формирование БМКП (эквивалентов кожи / гидрогелевых скаффолдов)

Для формирования БМКП – эквивалентов кожи (ЭК) / гидрогелевых скаффолдов (Пат. № 2653434 РФ... от 11.04.2017; [10]) использовали плазму крови, полученную от здоровых доноров. Замороженную плазму крови размораживали при +2 °С и центрифугировали при +4 °С в течение 15 мин при 1500 об/мин для осаждения криопреципитата. Далее отбирали 85% супернатанта от первоначального объема замороженной плазмы крови. Криопреципитат термостатировали при 37 °С до полного его растворения. Определяли количество фибриногена в плазме крови, криопреципитате плазмы крови и в супернатанте. Криопреципитат стандартизовали по количеству фибриногена до конечной концентрации 6 г/л. Для стандартизации использовали супернатант с низким содержанием фибриногена, оставшийся после выделения криопреципитата. Для формирования эквивалентов кожи / гидрогелевых скаффолдов использовали пул криопреципитата плазмы крови от трех доноров.

Для ПЭГилирования белковой части криопреципитата использовали PEG-NHS (Sigma-Aldrich, Германия). К ПЭГилированному криопреципитату добавляли 2% раствор уксуснокислого коллагена I типа (коллаген, выделенный из шкур трески (Пат. № 2567171 РФ... от 06.10.2014) [11]), предварительно нейтрализованного NaOH. К полученному композиту добавляли раствор гентамицина – 0,28 мг/мл композита (Therma Fisher, США). Затем в состав композита вводили суспензию клеток (hASCs) в фосфатно-солевом буфере (PBS) в соотношении 7 : 1 соответственно. Концентрация клеток – $1,2 \times 10^5$ на 1 мл композита. Полученный композит переносили в форму – чашку Петри диаметром 3,5 см, предвари-

тельно обработанную силиконом. Для полимеризации композита в него вводили тромбин-кальциевую смесь: 80 МЕ/мл бычьего тромбина (Sigma-Aldrich, Германия) в 1% растворе CaCl₂.

Полученные эквиваленты кожи (ЭК) выдерживали в форме в течение 20 минут при температуре +22–25 °С. Затем их перемещали в культуральные чашки (Corning 60 мм × 15 мм; США) и заливали 6 мл полной ростовой среды. Культуральные чашки с ЭК переносили в CO₂-инкубатор (37 °С, с увлажненной атмосферой и 5% содержанием CO₂) и культивировали в течение 6 суток со сменой ростовой среды дважды в неделю [12].

С целью формирования модельного эквивалента кожи (мЭК) в составе ЭК при его формировании криопреципитат плазмы крови человека и hASCs замещали криопреципитатом плазмы крови свиньи и rASCs. Методика получения криопреципитата плазмы крови свиньи (пул от трех животных) и метод формирования мЭК были идентичны методикам получения криопреципитата плазмы крови человека и формирования ЭК.

Исследования п. 1.12.1 и п. 1.12.2 проводили на бесклеточных гидрогелевых скаффолдах, сформированных на основе криопреципитата плазмы крови человека или на основе криопреципитата плазмы крови свиней. Скаффолды формировались согласно вышеописанному способу и в тех же условиях. При формировании бесклеточных скаффолдов суспензию клеток в PBS замещали равным объемом PBS. В исследованиях использовали образцы бесклеточных гидрогелевых скаффолдов непосредственно после изготовления.

1.11. Микроскопия

Состояние культур клеток человека и клеток свиньи оценивали в динамике на всех этапах культивирования. Для наблюдения за состоянием клеток в структуре гидрогелевых скаффолдов использовали метод светлого поля и фазового контраста. Микроскопию и видеоархивирование проводили с помощью инвертированного микроскопа «Leica DMI 3000B», оснащенного программой визуализации изображений LAZ.V.4.3.

Для визуализации клеток и подтверждения их жизнеспособности в структуре скаффолдов использовали флуоресцентную микроскопию, выполненную на имиджере Cyation 5 (BioTek, США). Для визуализации жизнеспособных клеток использовали Calcein AM (catalog № 564061, BD). Для визуализации ядер клеток использовали Hoechst 3334 (США). Окраска производилась в соответствии с протоколом производителя.

1.12. Исследование влияния гидрогелевых скаффолдов на культуру hASCs

1.12.1. Оценка цитотоксичности – МТТ-тест

Испытуемые образцы – бесклеточные гидрогелевые скаффолды (6 образцов скаффолдов на основе криопреципитата плазмы крови человека – скаффолд ЭК и 6 образцов скаффолдов на основе криопреципитата плазмы крови свиней – скаффолд мЭК; диаметр образцов 33 мм, толщина – 2 мм). Каждый образец помещали в культуральные чашки (Corning 60 мм × 15 мм; США) и заливали 6 мл полной ростовой среды. Образцы в среде помещали в CO₂-инкубатор и инкубировали при стандартных условиях 1 сутки (3 шт. скаффолдов ЭК, 3 шт. скаффолдов мЭК) и 8 суток (3 шт. скаффолдов ЭК, 3 шт. скаффолдов мЭК) для получения экстракта. В контрольные сроки (1 сутки, 8 суток) экстракт над образцами отбирали.

hASCs в концентрации 1×10^5 /мл засеивали на лунки плоскодонного 96-луночного планшета и культивировали в ростовой среде с 2% эмбриональной телячьей сывороткой при 37 °С, 5% CO₂ и абсолютной влажности в течение 3 дней. После 3 дней культивирования ростовая среда над клетками заменялась экстрактом от образцов и ростовой средой с 2% эмбриональной телячьей сывороткой в концентрации 0 : 1; 1 : 0; 1 : 1; 1 : 2; 1 : 4; 1 : 8 соответственно. Через 24 часа культивирования с экстрактом проводили МТТ-тест. Оптическую плотность регистрировали при 540 нм на анализаторе Sunrise (Австрия).

1.12.2. Оценка цитотоксичности – метод прямого контакта

Использовали образцы гидрогелевых бесклеточных скаффолдов диаметром 15 мм, толщиной 2 мм (9 образцов скаффолдов ЭК и 9 образцов скаффолдов мЭК). Образцы переносили на культуру hASCs и заливали 5 мл полной ростовой среды. hASCs за 24 часа до начала эксперимента высевали на культуральные чашки (Corning 60 мм × 15 мм; США) с плотностью 20 тыс./см². hASCs с образцами скаффолдов культивировали в CO₂-инкубаторе при стандартных условиях. Контролем служила культура hASCs, культивируемая в тех же условиях и той же концентрации, но без образцов. В контрольные сроки (24, 72, 144 часа) оценивали состояние hASCs (морфология, плотность, жизнеспособность). По окончании эксперимента (через 144 часа культивирования с образцами) определяли иммунофенотип клеток (п. 1.5).

1.12.3. Сравнительное исследование трехмерного культивирования hASCs в ЭК и скаффолде мЭК

Для проведения исследования были сформированы ЭК (5 образцов) и мЭК (5 образцов) соглас-

но способу, описанному в разделе 1.7, с введением в состав композита hASCs. Образцы помещали в культуральные чашки с полной ростовой средой и культивировали до 6 суток в CO₂-инкубаторе при стандартных условиях.

1.13. Характеристика плотности распределения клеток в эквивалентах

Для характеристики плотности распределения клеток в эквивалентах от исследуемых образцов (ЭК – 5 образцов; мЭК – 5 образцов) при помощи шаблона отделяли фрагменты площадью 0,64 см². Количество клеток определяли путем подсчета ядер через 24 часа с момента формирования ЭК и мЭК. Для этого выделенные фрагменты образцов переносили в 24 луночный планшет Black VisiplatTMTC (Wallac Oy, Финляндия). Далее проводили анализ количества клеток согласно способу количественного анализа клеточной составляющей скаффолда (Пат. № 2675376 РФ...от 17.07.2017 [13]). Способ включает прижизненное окрашивание ядер клеток в скаффолде с применением Hoechst 3334 (USA), флуоресцентную микроскопию с применением функции Z-stack (имиджер Cyation 5 с программным обеспечением Gen 5 Imedge+; BioTek, USA). Анализировали по 5 микрофотографий с каждого образца, снятых с разных полей зрения (увеличение: объектив 4×, окуляр 10×) на произвольных участках в толще образцов. Регистрировали объекты на участках в 530 мкм по оси Z. Для характеристики плотности распределения клеток в ЭК и мЭК анализировали сшитые Z-stack микрофотографии с подсчетом количества ядер клеток и последующим пересчетом количества клеток на 1 мм³.

1.14. Статистический анализ

Результаты исследований обработаны методами непараметрической статистики с применением критериев Манна–Уитни и парных сравнений Вилкоксона, при помощи пакета программ STATISTICA 6.0.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ

2.1. Характеристика pASCs

После выделения клеток из жировой ткани их адгезия к пластику фиксировалась через 24 часа. Как правило, к 6–10-му дню клетки формировали субконфлюэнтный монослой (60–70%). После формирования субконфлюэнтного монослоя культуры пересевали. На протяжении всего периода наблюдения клетки, выделенные и из жировой ткани свиньи, были морфологически однородными, характерной фибробластоподобной формы и хорошо распластывались на пластике. Клетки характеризовались четкими контурами, выраженными отростками, формирующими межклеточные контакты. По центру

клеток фиксировались овальные ядра с плотными ядрышками.

При проведении оценки дифференцировочного потенциала культивированных клеток, выделенных из жировой ткани свиньи, на 6–7-е сутки после введения дифференцировочной среды в клетках фиксировали появление жировых вакуолей, окрашивающихся специфическим красителем Oil Red. При дальнейшем культивировании в дифференцировочной среде количество клеток с жировыми вакуолями возрастало (рис. 1, б). Об остеогенной дифференцировке сви-

детельствовало появление солей кальция в клетках, которые окрашивались специфическим красителем ализариновым красным (рис. 1, г). На 13–15-е сутки остеогенная дифференцировка подтверждалась при окрашивании клеток, выделенных из жировой ткани, на остеокальцин. Образование типичных для хондрогенной дифференцировки небольших сфероидов (pellet) фиксировали в пробирках уже через сутки после добавления среды ДМЕМ/F12 с дифференцировочной добавкой. В образовавшихся сфероидах

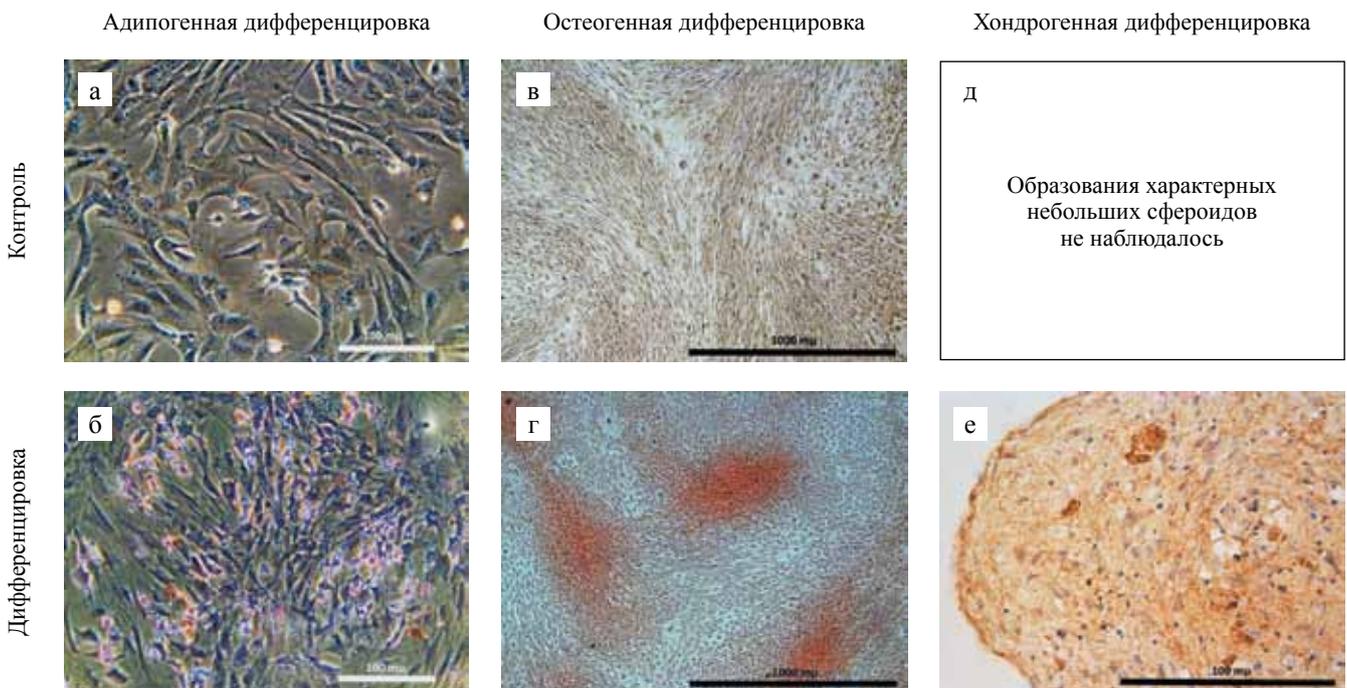


Рис. 1. Дифференцировка pASCs: а – контроль – культура pASCs третьего пассажа без использования дифференцирующей среды, субконфлюэнтный монослой образован типичными фибробластоподобными клетками, в клетках контрольной культуры образование жировых вакуолей не фиксируется; б – опыт – культура pASCs после культивирования в дифференцирующей среде, в клетках культуры четко определяются жировые вакуоли, что демонстрирует способность pASCs к адипогенной дифференцировке; в – контрольная культура pASCs представлена в виде субконфлюэнтного морфологически идентичными веретенообразными клетками, отложения кальция отсутствуют; г – культура pASCs экспериментальной серии после культивирования в специальной дифференцирующей среде, культура представляет собой субконфлюэнтный монослой, отчетливо визуализируются отложения кальция; е – окрашивание в сфероиде, сформированном культурой pASCs после культивирования в хондрогенной дифференцировочной среде отложений коллагена II типа поликлональными антителами (Abcam, ab34712), образование небольших сфероидов и отложение в них клетками коллагена II типа указывает на хондрогенную дифференцировку pASCs. а, б – окраска Oil Red, объектив 20×, окуляр 10×, фазовый контраст; в, г – окраска ализариновым красным, объектив 5×, окуляр 10×, световая микроскопия; е – объектив 40×, окуляр 10×, световая микроскопия

Fig. 1. Differentiation of pASCs. а, б – Adipogenic differentiation of pASCs, Oil Red stain, (15 days of cultivation; objective lens 20×, eyepiece 10×; phase contrast): а – control – culture of third passage pASCs without using a differentiating medium, the subconfluent monolayer is formed by typical fibroblast-like cells. In the cells of the control culture, the formation of fat vacuoles is not fixed; б – experience – culture of pASCs after cultivation in a differentiating medium. Fat culture vacuoles are clearly defined in culture cells stained with a specific Red Oil stain. The data obtained demonstrate the ability of pASCs to adipogenic differentiation; в, г – Osteogenic differentiation of pASCs. Osteogenic differentiation of pASCs, stained with alizarin red (15 days of cultivation; objective lens 5×, eyepiece 10×, light microscopy): в – the control culture of pASCs is presented as a subconfluent monolayer formed by morphologically identical spindle-shaped cells, with no calcium deposits; г – Culture pASCs of the experimental series after cultivation in a special differentiating medium. The culture is a subconfluent monolayer. Calcium deposits are clearly visualized, which are stained with a differentiating dye, alizarin red; е – Chondrogenic differentiation of ASCs. Staining of type II collagen deposits in the pellet with polyclonal antibodies (Abcam, ab34712; cell nuclei stained with hematoxylin and eosin (Sigma-Aldrich, Germany); objective lens 40×, eyepiece 10×). Ball formation and deposition of type II collagen in them indicates chondrogenic differentiation of ASCs

на 6-е сутки с помощью поликлональных антител фиксировали отложение коллагена II типа (рис. 1, е).

Фенотип клеток культур определяли в процессе роста культур со 2-го и до 6-го пассажа. В процессе исследования отмечено, что панлейкоцитарный антиген CD 45 на клетках, выделенных из жировой ткани, не определялся на всех этапах исследования (менее 1%). Выраженность экспрессии CD 44 на 2-м пассаже составляла в среднем 56%. В процессе роста культуры процент клеток, экспрессирующих CD 44, увеличивался и к шестому пассажу достигал 99,7%. Типичный маркер MSCs CD 90 экспрессировали на 2-м пассаже около 75% клеток. В процессе роста количество клеток, экспрессирующих CD 90, возрастало и к шестому пассажу составляло около 90% (рис. 2, а). Количество клеток, экспрессирующих CD 10, от пассажа к пассажу во всех культурах возрастало и к шестому пассажу составляло около 70%. Таким образом, фенотип клеток, выделенных из жировой ткани свиньи, можно представить как CD 90+, CD 44+, CD 10+, CD 45–, что соответствует фенотипу MSCs.

Фенотип ASCs, полученных от нескольких животных (рис. 2, б), и динамика изменений экспрессии основных маркеров были аналогичны. Фиксировалось нарастание экспрессии CD 44 и CD 90 до 3–4-го пассажа. На более поздних сроках экспрессия

этих маркеров оставалась на неизменно высоком уровне. Анализ экспрессии CD 10 показал, что выраженность экспрессии этого антигена продолжала увеличиваться вплоть до 6 пассажа. Экспрессия CD 45 клетками оставалась неизменно на крайне низком уровне (менее 1%).

2.2. Сравнительное исследование влияния гидрогелевых скаффолдов на культуру hASCs

Сравнительное исследование цитотоксичности бесклеточных гидрогелевых скаффолдов на основе криопреципитата плазмы крови человека (скаффолд ЭК) и на основе криопреципитата плазмы крови свиньи (скаффолд мЭК) показало отсутствие цитотоксического действия на МСК человека (табл. 1). Анализ результатов МТТ-теста выявил выраженное стимулирующее действие экстракта, полученного от исследуемых бесклеточных скаффолдов, на пролиферативную активность hASCs. Так, под действием экстракта, отобранного после первых суток инкубации от скаффолдов ЭК, количество метаболически активных клеток в культуре увеличивалось более чем в 1,5 раза по сравнению с контролем. Аналогичный эффект наблюдался под действием экстракта от скаффолдов ЭК, после 8 суток инкубации. Под действием экстракта, который был отобран от скаффолдов мЭК

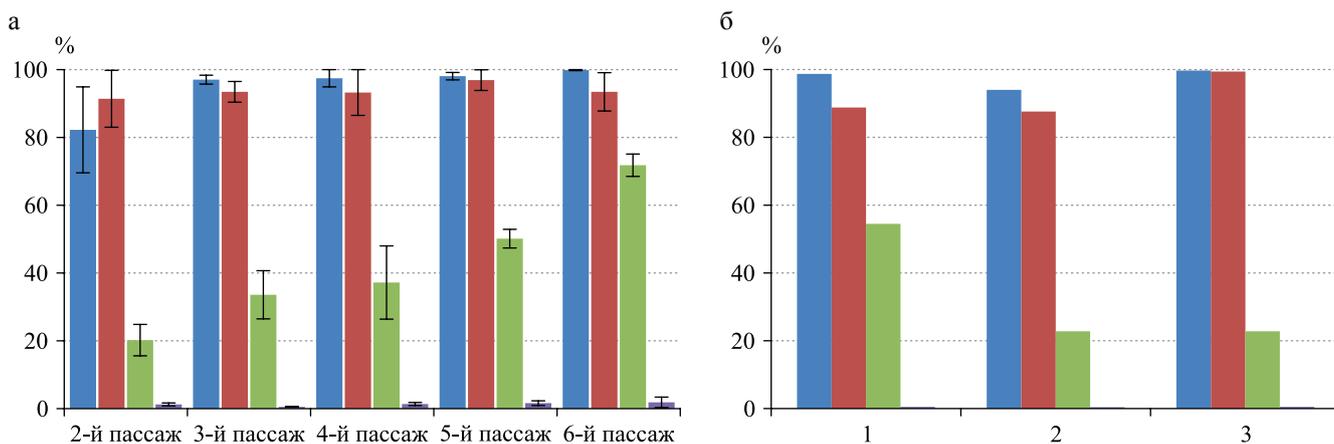


Рис. 2. Экспрессия маркеров дифференцировки на pASCs: а – пример изменения фенотипа клеток от одного из экспериментальных животных в процессе культивирования – от пассажа к пассажу прослеживается нарастание количества клеток, экспрессирующих CD 44 (синий), CD 90 (красный), CD 10 (зеленый). Количество клеток в культуре pASCs, экспрессирующих CD 45 (фиолетовый), было менее 1% в течение всего периода культивирования; б – сравнительная диаграмма фенотипа MSCs, выделенных из жировой ткани трех различных животных (3-й пассаж). Во всех экспериментальных культурах количество клеток, экспрессирующих CD 44 (синий), превышало 90%, CD 90 (красный) – 87% и CD 10 (зеленый) – 22%. Экспрессия панлейкоцитарного антигена CD 45 на клетках исследуемых культур составляла менее 1%

Fig. 2. Expression of differentiation markers on pASCs: а – is an example of a change in the phenotype of cells from one of the experimental animals during cultivation – from passage to passage there is an increase in the number of cells expressing CD 44 (blue), CD 90 (red), CD 10 (green). The number of cells in the culture of pASCs expressing CD 45 (purple) was less than 1% over the entire cultivation period; б – a comparative diagram of the phenotype of MSCs extracted from adipose tissue from three different animals (passage 3). In all experimental cultures, the number of cells expressing CD 44 (blue) exceeded 90%, CD 90 (red) – 87% and CD 10 (green) – 22%. The expression of the panleukocyte antigen CD 45 on the cells of the studied cultures was less than 1%

Таблица 1

Исследование цитотоксичности бесклеточных гидрогелевых скаффолдов
Cytotoxicity study of cell-free hydrogel scaffolds

Отбор экстракта	Скаффолд	Контроль 0 : 1	Экстракт 1 : 0	Экстракт 1 : 1	Экстракт 1 : 2	Экстракт 1 : 4	Экстракт 1 : 8
1-е сутки	ЭК	0,341 ± 0,007	0,518 ± 0,011*	0,537 ± 0,026*	0,442 ± 0,020*	0,423 ± 0,020*	0,334 ± 0,007
	мЭК	0,322 ± 0,011	0,568 ± 0,026*	0,442 ± 0,029*	0,403 ± 0,014*	0,370 ± 0,011*	0,393 ± 0,016*
8-е сутки	ЭК	0,327 ± 0,010	0,519 ± 0,021*	0,512 ± 0,014*	0,437 ± 0,011*	0,371 ± 0,020	0,348 ± 0,022
	мЭК	0,282 ± 0,006	0,557 ± 0,032*	0,505 ± 0,025*	0,405 ± 0,022*	0,364 ± 0,016*	0,323 ± 0,017

Примечание. * – $p < 0,05$, сравнение с контролем, критерий Вилкоксона; ■ – $p < 0,05$, сравнение ЭК с мЭК, критерий Манна–Уитни.

Note. * – $p < 0.05$, comparison with control, Wilcoxon test; ■ – $p < 0.05$, comparison of skin equivalent with modal skin equivalent, Mann–Whitney test.

Таблица 2

Сравнительное исследование влияния на культуру hASCs бесклеточного модельного эквивалента кожи

Comparative study of the effect on hASCs culture of cell-free model skin equivalent

Время культивирования	Плотность клеток ($\times 10^3/\text{см}^2$)	Абсолютное число клеток ($\times 10^3$)	Жизнеспособность клеток (% жизнеспособных клеток)
			Контроль
24 часа	26,73 ± 1,17	534,67 ± 23,33	98,70 ± 0,15
72 часа	39,47 ± 1,81	789,48 ± 36,15	99,52 ± 0,18
144 часа	40,64 ± 0,95	812,81 ± 18,94	99,58 ± 0,10
Скаффолд ЭК			
24 часа	27,894 ± 0,90	557,89 ± 17,97	99,25 ± 0,31
72 часа	39,29 ± 1,47	785,81 ± 29,30	99,55 ± 0,18
144 часа	45,17 ± 2,34	902,35 ± 46,95	99,63 ± 0,12
Скаффолд мЭК			
24 часа	27,96 ± 1,05	559,11 ± 21,03	99,77 ± 0,15
72 часа	38,68 ± 2,36	773,59 ± 47,14	99,13 ± 0,10
144 часа	42,51 ± 1,97	850,12 ± 39,34	99,65 ± 0,16

(1-е, 8-е сутки инкубации), количество метаболически активных клеток возрастало более чем в 1,8 раза по сравнению с контролем. Разведение экстрактов приводило к снижению их стимулирующего эффекта. В то же время даже при разведении экстрактов в два раза количество метаболически активных клеток статистически значимо возрастало по сравнению с контролем. При сравнении действия экстрактов от бесклеточных скаффолдов ЭК и мЭК на культуру hASCs значимых различий по результатам МТТ-теста выявлено не было.

При культивировании hASCs человека в присутствии бесклеточных гидрогелевых скаффолдов ЭК и мЭК отрицательного влияния скаффолдов на культуру hASCs выявлено не было. Плотность клеток в культуре и их абсолютное количество в опытных культуральных чашках (скаффолд ЭК, скаффолд мЭК) статистически значимо не отличались от контроля на всех сроках исследования (табл. 2). Клетки в опытных культуральных чашках и контрольных чашках хорошо распластывались на пластике и

формировали субконфлюэнтный слой. hASCs были морфологически однородны, характерной фибробластоподобной формы с четкими контурами, выраженными отростками, клетки формировали межклеточные контакты. Все клетки характеризовались высокой жизнеспособностью (табл. 2). Фенотип клеток из контрольных и опытных культуральных чашек после окончания эксперимента не отличался и соответствовал фенотипу MSCs. Клетки экспрессировали CD 90, CD 105, CD 73, CD 44, CD 10 и не экспрессировали CD 45, CD 34, CD 14, CD HLA DR.

hASCs жировой ткани человека, инкапсулированные в скаффолды ЭК и мЭК, при трехмерном культивировании характеризовались одинаковой активностью. Так, уже через 24 часа клетки проявляли активную матрикс-клеточную адгезию и начинали выбрасывать клеточные отростки (рис. 3, а, б). В процессе дальнейшего культивирования наблюдался динамичный трехмерный рост клеток с формированием множественных отростков и межклеточных контактов. На шестые сутки в скаффолдах ЭК и мЭК

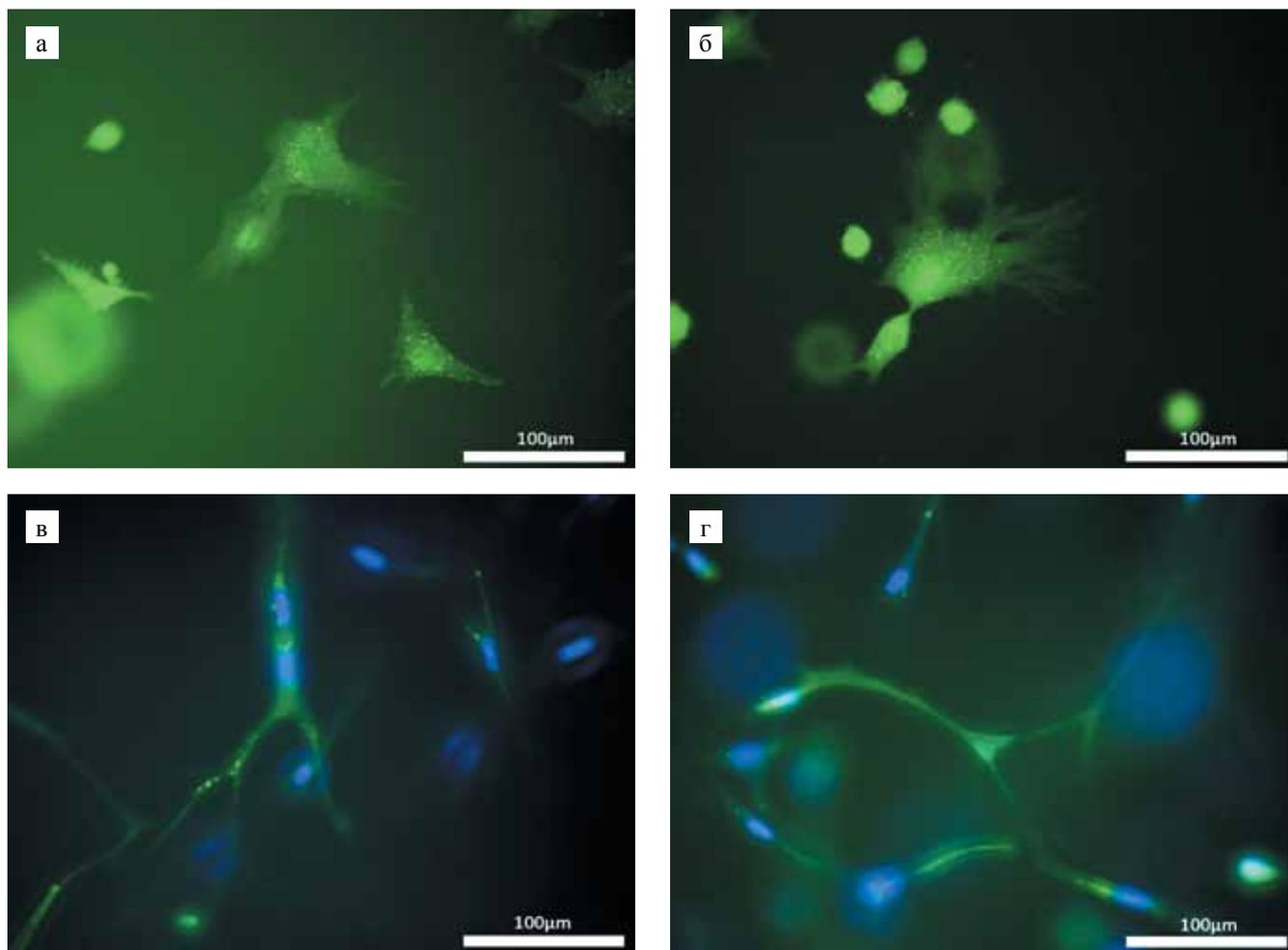


Рис. 3. Культивирование hASCs в ЭК (а, в) и скаффолде на основе криопреципитата плазмы крови свиньи (б, г). Клеточные события при культивировании hASCs в ЭК и в скаффолде на основе криопреципитата плазмы крови свиньи имели аналогичный характер: а, б – 24 часа культивирования: клетки расправляются, выбрасывают клеточные отростки; в, г – 6-е сутки культивирования: трехмерный рост клеток с формированием множественных отростков и межклеточных контактов. Флуоресцентная микроскопия: специфическим флуоресцентным красителем Calcein AM (зеленый) окрашиваются жизнеспособные клетки; б, г – ядра клеток (синий) окрашены флуорохромом Hoechst 3334. *Примечание.* Вне фокуса клетки и ядра, лежащие в других слоях трехмерной структуры скаффолдов ЭК и мЭК (относительно слоя, в котором клетки в фокусе)

Fig. 3. Cultivation of hASCs in Skin Equivalents (а, в) and scaffold based on pig blood plasma cryoprecipitate (б, г). Cellular events during cultivation of hASCs in skin equivalents and in a scaffold based on pig blood plasma cryoprecipitate were of a similar nature: а, б – 24 hours of cultivation: the cells flatten, eject cell processes; в, г – 6th day of cultivation: three-dimensional cell growth with the formation of multiple processes and intercellular contacts. Fluorescence microscopy: Calcein AM specific fluorescent dye (green) stains viable cells; б, г – cell nuclei (blue) are stained with Hoechst 3334 fluorochrome. *Note.* Out of focus are cells and nuclei lying in other layers of the three-dimensional structure of skin equivalent scaffolds and MSE (regarding the layer in which the cells are in focus)

фиксировали формирование и развитие клеточной сети (рис. 3, в, г). Жизнеспособность клеток, культивируемых в скаффолдах ЭК и мЭК, подтверждена окрашиванием Calcein AM.

2.3. Сравнительная характеристика ЭК и мЭК

Модельные эквиваленты кожи, сформированные на основе криопреципитата плазмы крови свиньи с rASCs, имели характеристики, аналогичные эквива-

лентам кожи, сформированным на основе криопреципитата плазмы крови человека и hASCs. ЭК и мЭК представляли собой формоустойчивую, эластичную, прозрачную, гидрогелевую структуру (рис. 4, а, б). Клетки были распределены относительно равномерно по всей структуре эквивалентов, как в ЭК, так и в мЭК (рис. 4, в, г). Количество клеток, определяемое на 1 мм³ через 24 часа после формирования эквивалентов, статистически значимо не отличалось в ЭК и мЭК и составляло $135,70 \pm 24,78$ и $124,93 \pm 22,81$ соответственно.

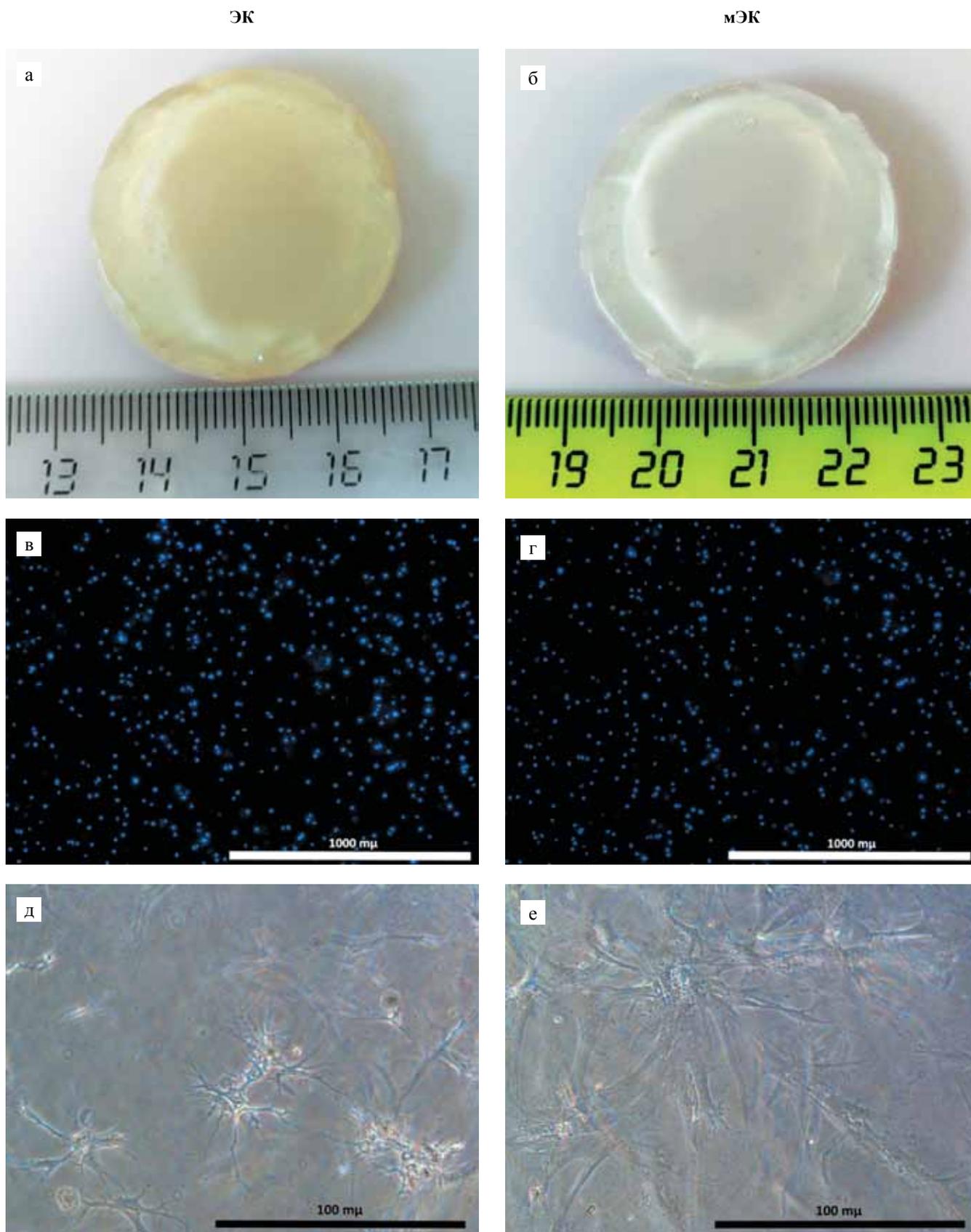


Рис. 4. ЭК и мЭК: а, б – внешний вид эквивалентов; в, г – ядра клеток, флуоресцентная микроскопия: сшитые микрофотоснимки z-стек (530 мкм), ядра клеток (синий) окрашены специфическим флуорохромом Hoechst 3334; д, е – MSCs, культивируемые в эквивалентах (3-и сутки культивирования; фазовый контраст, объектив 40×, окуляр 10×)

Fig. 4. Skin equivalents and model skin equivalents: а, б – is the appearance of the equivalents; в, г – cell nuclei, fluorescence microscopy: crosslinked microphotographs z-stack (530 μm), cell nuclei (blue) stained with specific Hoechst 3334 fluorochrome; д, е – MSCs cultured in equivalents (3 days of cultivation; phase contrast, objective lens 40×, eyepiece 10×)

В процессе культивирования ЭК и мЭК значимых различий в развитии клеточных событий выявлено не было. Через 24 часа после формирования эквивалентов наблюдали матрикс-клеточную адгезию, начало формирования клеточных отростков и распластывание клеток. В процессе дальнейшего культивирования МСК жировой ткани человека и МСК жировой ткани свиньи проявляли активный трехмерный рост (рис. 4, д, е). Клетки формировали разнонаправленные множественные отростки и межклеточные контакты, что в дальнейшем приводило к организации клеточной сети.

3. ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка биомедицинских клеточных продуктов неизбежно связана с прохождением этапов доклинических исследований на лабораторных животных. В то же время проведение исследований на крупных лабораторных животных является менее распространенной практикой, чем проведение исследований на мелких лабораторных животных, таких как грызуны. В связи с этим при подготовке протоколов исследований не всегда имеется возможность опереться на аналогичные работы и в полной мере руководствоваться стандартными или общепринятыми методами.

Для разработки комплексного подхода к формированию модели БМКП, согласующейся со стратегией «гомологичный препарат», для доклинических исследований на крупном лабораторном животном (свинье) в качестве объекта исследований был выбран эквивалент кожи. Основными составляющими эквивалента кожи, представленного в этой работе, являются криопреципитат плазмы крови человека, коллаген трески I типа, бычий тромбин и мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани человека. Криопреципитат плазмы крови и hASCs в составе ЭК находятся в аллогенных условиях по отношению к реципиенту (человеку). При использовании ЭК в исследованиях на модели свиньи эти компоненты перейдут из аллогенных условий в ксеногенные по отношению к реципиенту-модели (свинье). Известно, что одни и те же клеточные продукты и продукты тканевой инженерии могут иметь значительно более высокую иммуногенность в ксеногенных условиях по сравнению с аллогенными. В ряде экспериментальных исследований было показано, что результаты использования ксеногенных MSCs значительно уступают результатам, полученным при использовании аллогенных или аутогенных клеток, и могут приводить к развитию негативных явлений. Например, P. Niemeyer et al. (2010) обнаружили, что в группе животных, получавших лечение ксеногенными MSCs, результаты регенерации костной ткани были хуже по всем исследуемым параметрам по сравнению с группой животных, получавшей лечение аутогенными MSCs [14]. Для того чтобы из-

бежать в будущем, при проведении доклинических исследований, искажения результатов, связанных с видоспецифическим иммунным ответом, мы разработали модель эквивалента кожи для проведения доклинических исследований на свиньях. Исходя из соответствия стратегии «гомологичный препарат», при разработке модельного эквивалента кожи в составе ЭК при его формировании было необходимо заместить криопреципитат плазмы крови человека и hASCs на криопреципитат плазмы крови свиньи и rASCs. Морской коллаген и бычий тромбин, входящие в состав ЭК, по нашему мнению, не требовали замещения, в связи с тем что являются ксеногенными компонентами как по отношению к человеку, так и по отношению к свинье.

Проведя анализ литературы, мы не обнаружили общепринятого протокола по выделению, культивированию и характеристике rASCs. Нами были подготовлены и апробированы относительно простые в реализации и подходящие для экспериментальной работы протоколы, основные положения которых изложены в п. 1.6–1.9 раздела «Материалы и методы». Представленные подходы дают возможность провести забор биоматериала определенной области жировой ткани, что позволяет получать однородный первичный материал и стандартизовать технику забора тканей. Использование дерматома позволяет получить лоскуты жировой ткани с определенной глубины. Толщина лоскутов (до 1,2 мм) упрощает обработку первичного материала, не требуя грубой первичной механической гомогенизации или дополнительных манипуляций для формирования тонких лоскутов до этапа механической дезагрегации, как, например, при заборе больших объемов жировой ткани [15].

Выбранные подходы позволили провести характеристику клеток, полученных из жировой ткани свиньи, по основным параметрам, необходимым для их идентификации и использования в экспериментальной работе: жизнеспособность, морфология, дифференцировочный потенциал, иммунофенотип. Полученные нами данные по выделению и характеристике MSCs из жировой ткани свиньи, как и приведенные в литературе [16,17], демонстрируют способность rASCs к остеогенной, адипогенной и хондрогенной дифференцировке, проявлению типичных морфологических характеристик и определенного иммунофенотипа.

Одним из основных компонентов представленного в работе ЭК является криопреципитат плазмы крови. В модельном ЭК криопреципитат плазмы крови человека замещали криопреципитатом плазмы крови свиньи. Манипуляции, связанные с выделением плазмы крови свиньи и подготовкой криопреципитата, технологически полностью соответствовали тем, которые использовались при подготовке криопре-

цитоплата плазмы крови человека для формирования ЭК. В основу способа формирования ЭК заложена реакция ферментативного гидролиза, осуществляемая в присутствии тромбина. Основным структурообразующим белком при формировании скаффолда ЭК является фибриноген криопреципитата плазмы крови, количество которого в композите более чем в 22 раза превышает количество коллагена. Таким образом, процесс формирования ЭК имитирует процесс свертывания крови. Свертывающая система крови свиней не имеет кардинальных отличий от свертывающей системы крови человека [18]. Исходя из этого при формировании мЭК мы использовали тот же способ, что и при формировании ЭК. Возможность использования мЭК в доклинических исследованиях предполагает, что мЭК не должны иметь принципиальных отличий в своих свойствах по сравнению с ЭК. Для проверки этого положения была проведена сравнительная оценка цитотоксичности и влияния на культуру hASCs бесклеточных скаффолдов ЭК и мЭК, выступающих в качестве скаффолда-носителя клеток. Данные МТТ-теста подтвердили отсутствие цитотоксичности скаффолдов мЭК. Результаты МТТ-теста показали, что количество метаболически активных клеток в присутствии экстрактов от скаффолдов ЭК и мЭК значительно возрастало. Эти данные свидетельствуют о повышении пролиферативной активности клеток в присутствии скаффолдов. Оба скаффолда сформированы на основе криопреципитата плазмы крови. В плазме крови человека и в плазме крови свиньи содержится достаточно много биологически активных веществ (аминокислоты, белки, микроэлементы и прочее) [19]. Известно, что концентрация многих биологически активных веществ (БАВ) в криопреципитате плазмы крови значительно выше, чем в плазме крови [20]. Компоненты плазмы крови могут принимать непосредственное участие в регуляции клеточного роста. Так, например, в плазме крови присутствуют катионы кальция. M.N. Lee et al. показали, что повышение в культуральной среде концентрации Ca^{2+} приводит к повышению пролиферативной активности MSCs [21]. В образцах скаффолдов исследуемых эквивалентов также присутствует экзогенный кальций, входящий в состав тромбин-кальциевой смеси, используемой при изготовлении скаффолдов. Таким образом, выявленный стимулирующий эффект, вероятнее всего, связан с действием биологически активных веществ, экстрагируемых из скаффолдов.

Результаты теста прямого контакта подтвердили отсутствие отрицательного воздействия скаффолдов ЭК и мЭК на жизнеспособность, адгезию, морфологию, пролиферацию и иммунофенотип hASCs. В то же время результаты этого теста не показали стимулирующего действия бесклеточных скаффолдов на пролиферацию hASCs. Вероятнее всего, это объяс-

няется низкой концентрацией БАВ, вымываемых из скаффолдов в этом эксперименте. Известно, что при культивировании клеток наличие и концентрация БАВ в культуральной среде во многом определяет рост культуры [22]. Так, при постановке МТТ-теста экстракт отбирали от скаффолдов диаметром 33 мм, инкубируемых в 6 мл среды. При постановке теста на биосовместимость были использованы образцы скаффолдов диаметром 15 мм и 5 мл среды. При этом количество клеток, на которые действовали БАВ, выделяемые образцами, в МТТ-тесте было значительно меньше по сравнению с количеством клеток в тесте прямого контакта. Таким образом, результаты теста прямого контакта можно в определенной мере сопоставить с результатами МТТ-теста с высоким разведением экстракта (1 : 8). При высоком разведении экстракта количество метаболически активных клеток мало отличалось от контроля, а результаты действия экстракта на клетки были сопоставимы с культивированием клеток в ростовой среде.

Известно, что мезенхимальные стволовые клетки, инкапсулированные в гидрогелевые скаффолды, проявляют трехмерный рост [23]. Для того чтобы выяснить, в какой мере мЭК-скаффолд обеспечивает трехмерный рост клеток и насколько клеточные события в мЭК будут сопоставимы с ЭК, одни и те же культуры hASCs инкапсулировали в оба вида скаффолдов. hASCs, инкапсулированные в скаффолды, поддерживали жизнеспособность и проявляли трехмерный рост. Оба скаффолда являются гидрогелями. Известно, что гидрофильная природа гидрогелей облегчает обмен питательными веществами и продуктами жизнедеятельности между клетками в условиях трехмерной структуры, способствуя поддержанию высокой жизнеспособности клеток [24]. Клеточные события, наблюдаемые в скаффолдах ЭК и мЭК, не имели значимых отличий в период наблюдения. Известно, что жизнеспособность, рост, морфология, миграция, пролиферативная активность и т. д. во многом определяются составом и структурой скаффолда [25]. Последнее позволяет предполагать, что состав и структура скаффолдов ЭК и мЭК, влияющие на поведение клеток, сопоставимы.

Последнее положение также подтверждают данные, полученные при формировании ЭК и мЭК. Так, известно, что свойства скаффолда, как механически поддерживающей структуры для клеток, определяются его внутренней архитектурой. При формировании ЭК и мЭК клетки распределялись относительно равномерно по всей структуре эквивалентов с одинаковой плотностью. Структуры ЭК и мЭК сформированы прежде всего фибриновой сетью. Самосборка фибриновых волокон зависит от концентрации фибриногена, тромбина и кальция [26]. Данные литературы свидетельствуют о том, что ПЭГилирование белка также оказывает значитель-

ное влияние на формирующиеся фибриновые волокна [27]. В состав композита для формирования скаффолдов также входит коллаген. Коллаген различного происхождения достаточно широко применяется в скаффолд-технологиях и хорошо зарекомендовал себя в качестве структурообразующего биополимера для формирования моно- и поликомпонентных скаффолдов [28, 29]. Таким образом, используемый при формировании эквивалентов коллаген также может принимать участие в образовании структуры ЭК и мЭК. В то же время концентрации и соотношения вышеперечисленных компонентов при создании мЭК были такими же, как и при формировании ЭК. Трехмерное культивирование rASCs в составе мЭК подтвердило сопоставимость клеточных событий, развивающихся в мЭК с ЭК.

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что условия формирования эквивалентов (состав, соотношение и концентрации основных компонентов, участвующих в образовании структуры, методический подход) позволяют получить структуры, аналогичным образом осуществляющие механическую поддержку клеток и позволяющие создать сопоставимые условия для размещения и взаимодействия MSCs.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представлен комплексный подход при разработке модели биомедицинского клеточного продукта на примере эквивалента кожи для проведения доклинических исследований на крупном лабораторном животном, учитывающий стратегию «гомологичный препарат». При подготовке модельного БМКП компоненты ЭК (разработанного для применения у человека), переходящие из алогенных условий в ксеногенные, при трансплантации животному были замещены. Подтверждено соответствие характеристик клеток, выделенных из жировой ткани свиньи, требованиям, предъявляемым к MSCs. В перспективе комплекс методов и подходов, использованных в работе для выделения, культивирования и характеристики rASCs, получения свиной плазмы может быть полезен при проведении работ, основанных на использовании клеток животных, например, при разработке протоколов для ксенотрансплантации клеток и конструкций на их основе. Показано отсутствие цитоксичности бесклеточного скаффолда мЭК. Подтверждено, что скаффолд мЭК обеспечивает аналогичные со скаффолдом ЭК условия для размещения и трехмерного роста клеток. Клеточные события, развивающиеся в процессе культивирования мЭК и ЭК, также были сопоставимы. Следовательно, мЭК на основе криопреципитата плазмы крови свиньи и rASCs может быть использован при проведении исследований на крупных лабораторных животных (свиньях) в качестве модели соответствующей стра-

тегии «гомологичный препарат». Мы надеемся, что комплекс методов и алгоритм работы, использованные при разработке модельного эквивалента, будут полезны при подготовке и проведении доклинических исследований подобных биомедицинских клеточных продуктов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *La Francesca S, Aho JM, Barron MR, Blanco EW, Soliman S, Kalenjian L et al.* Long-term regeneration and remodeling of the pig esophagus after circumferential resection using a retrievable synthetic scaffold carrying autologous cells. *Sci Rep.* 2018; 8: 4123. doi: 10.1038/s41598-018-22401-x.
2. *Lin C, Chiu P, Hsueh Y, Shieh S, Wu C, Wong T et al.* Regeneration of rete ridges in Lanyu pig (*Sus scrofa*): Insights for human skin wound healing Short running title: Full-thickness wound healing in the Lanyu Pig. *Exp Dermat.* 2019; 4: 472–479. doi: 10.1111/exd.13875.
3. *Davidson JM.* Animal models for wound repair. *Arch Dermatol Res.* 1998; 290: S1–S11.
4. *Hammond SA, Tsonis C, Sellins K, Rushlow K, Scharton-Kersten T, Colditz I, Glenn GM.* Transcutaneous immunization of domestic animals: Opportunities and challenges. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000; 43: 45–55. doi: 10.1016/S0169-409X(00)00076-4.
5. *Wollina U, Berger U, Mahrle G.* Immunohistochemistry of porcine skin. *Acta Histochem.* 1991; 90: 87–91. doi: 10.1016/S0065-1281(11)80166-2.
6. *Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P.* Perspective article. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen Med.* 2001; 9: 66–76.
7. *Mair KH, Sedlak C, Käser T, Pasternak A, Levast B, Gerner W et al.* The porcine innate immune system: An update. *Dev Comp Immunol.* 2014; 45: 321–343. doi: 10.1016/j.dci.2014.03.022.
8. *Summerfield A, Meurens F, Ricklin ME.* The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Mol Immunol.* 2015; 66: 14–21. doi: 10.1016/j.molimm.2014.10.023.
9. *Wang M, Yuan Q, Xie L.* Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application. *Stem Cells Int.* 2018: 1–12. doi: 10.1155/2018/3057624.
10. *Егорихина МН, Левин ГЯ, Чарыкова ИН, Алейник ДЯ, Соснина ЛН.* Пат. 2653434 РФ, МПК C12N 5/00. Способ создания биорезорбируемого клеточного скаффолда на основе фибрина плазмы крови. Заявка: 2017112424, 11.04.2017. Опубл. 08.05.2018; Бюл. № 13. *Егорихина МН, Левин ГЯ, Чарыкова ИН, Алейник ДЯ, Соснина ЛН.* Пат. 2653434 RU, Int. Cl. C12N 5/00. Method for creating a bioresorbable cellular scaffold based on fibrin of blood plasma. Application: 2017112424, 11.04.2017. Bull. 2018: 13.

11. Семеньева ЛЛ, Астанина МВ, Кузнецова ЮЛ, Валетова НБ, Гераскина ЕВ, Таранкова ОА. Пат. 2567171 РФ, МПК C08H 1/06, A23J 1/04. Способ получения уксусной дисперсии высокомолекулярного рыбного коллагена. Заявка: 2014140300/13, 06.10.14. Опубл. 10.11.15; Бюл. № 31. *Semenycheva LL, Astanina MV, Kuznetsova JL, Valetova NB, Geras'kina EV, Tarankova OA. Patent. 2567171 Int. Cl. C08H 1/06, A23J 1/04. Method for production of acetic dispersion of high molecular fish collagen. Bull. 2015: 31.*
12. Егорихина МН, Левин ГЯ, Алейник ДЯ, Чарыкова ИН, Рубцова ЮП, Соснина ЛН, Давыденко ДВ. Скаффолд для замещения дефектов кожи на основе естественных биополимеров. *Успехи современной биологии. 2018; 138 (3): 273–282. Egorikhina MN, Levin GYa, Aleinik DYa, Charykova IN, Rubtsova YuP, Sosnina LN, Davydenko DV. Scaffold for Substitution of Skin Defects Based on Natural Biopolymers. Biol Bull Rev. 2018; 137: 273–282. [In Russ, English abstract]. doi: 10.7868/S0042132418030055.*
13. Егорихина МН, Чарыкова ИН, Алейник ДЯ. Пат. 2675376 РФ, МПК G01N 33/52. Способ количественного анализа клеточной составляющей скаффолда. Заявка: 2017125696, 17.07.2017; Опубл. 19.12.2018; Бюл. № 35. *Egorikhina MN, Charykova IN, Aleinik DYa. Patent № 2675376 The Russian Federation, Int. Cl. G01N 33/52. Method of quantitative analysis of cellular components of scaffold. Application: 2017125696, 17.07.2017, Bull. 2018.*
14. Niemeyer P, Szalay K, Luginbühl R, Südkamp NP, Kasten P. Transplantation of human mesenchymal stem cells in a non-autogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model. *Acta Biomater. 2010; 6: 900–908. doi: 10.1016/j.actbio.2009.09.007.*
15. Chen Y, Liu H, Chang Y, Cheng Y, Mersmann HJ, Kuo W, Ding S. Isolation and Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells from Porcine Subcutaneous Adipose Tissues. *J Vis Exp. 2016; 109: e53886. doi: 10.3791/53886.*
16. Jeon BG, Bharti D, Lee WJ, Jang SJ, Park JS, Jeong GJ, Rho GJ. Comparison of mesenchymal stem cells isolated from various tissues of isogenic minipig. *Animal Cells Syst (Seoul). 2015; 19: 407–416. doi: 10.1080/19768354.2015.1089323.*
17. Qu CQ, Zhang GH, Zhang LJ, Yang GS. Osteogenic and adipogenic potential of porcine adipose mesenchymal stem cells. *In vitro Cell. Dev Biol Anim. 2007; 43: 95–100. doi: 10.1007/s11626-006-9008-y.*
18. Sondeen JL, De Guzman R, Amy Polykratis I, Dale Prince M, Hernandez O, Cap AP, Dubick MA. Comparison between human and porcine thromboelastograph parameters in response to *ex vivo* changes to platelets, plasma, and red blood cells. *Blood Coagul Fibrinolysis. 2013; 24: 818–829. doi: 10.1097/MBC.0b013e3283646600.*
19. Schmidt JA, Rinaldi S, Scalbert A, Ferrari P, Achaintre D, Gunter MJ et al. Plasma concentrations and intakes of amino acids in male meat-eaters, fish-eaters, vegetarians and vegans: A cross-sectional analysis in the EPIC-Oxford cohort. *Eur J Clin Nutr. 2016; 70: 306–312. doi: 10.1038/ejcn.2015.144.*
20. Nascimento B, Goodnough LT, Levy JH. Cryoprecipitate therapy. *Br J Anaesth. 2014; 113: 922–934. doi: 10.1093/bja/aeu158.*
21. Lee MN, Hwang HS, Oh SH, Roshanzadeh A, Kim JW, Song JH et al. Elevated extracellular calcium ions promote proliferation and migration of mesenchymal stem cells via increasing osteopontin expression. *Exp Mol Med. 2018; 50: 142. doi: 10.1038/s12276-018-0170-6.*
22. Gharibi B, Hughes FJ. Effects of Medium Supplements on Proliferation, Differentiation Potential, and *in vitro* Expansion of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Transl Med. 2012: 771–782. doi: 10.5966/sctm.2010-0031.*
23. Caliani SR, Burdick JA. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat Methods. 2016; 13: 405–414. doi: 10.1038/nmeth.3839.*
24. Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev. 2001; 101: 1869–1879. doi: 10.1021/cr000108x.*
25. Sadeghi-Ataabadi M, Mostafavi-pour Z, Vojdani Z, Sani M, Latifi M, Talaei-Khozani T. Fabrication and characterization of platelet-rich plasma scaffolds for tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2017; 71: 372–380. doi: 10.1016/j.msec.2016.10.001.*
26. Weisel JW, Nagaswami C. Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations: clot structure and assembly are kinetically controlled. *Biophys J. 1992; 63: 111–128. doi: 10.1016/S0006-3495(92)81594-1.*
27. Shpichka AI, Koroleva AV, Deirwick A, Timashev PS, Semenova EF, Moiseeva IY et al. Evaluation of the vasculogenic potential of hydrogels based on modified fibrin. *Cell tissue biol. 2017; 11: 81–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1134/S1990519X17010126>.*
28. Subhan F, Ikram M, Shehzad A, Ghafoor A. Marine Collagen: An Emerging Player in Biomedical applications. *J Food Sci Technol. 2015; 52: 4703–4707. doi: 10.1007/s13197-014-1652-8.*
29. Lausch AJ, Chong LC, Uludag H, Sone ED. Multiphasic Collagen Scaffolds for Engineered Tissue Interfaces. *Adv Funct Mater. 2018; 28: 1–9. doi: 10.1002/adfm.201804730.*

Статья поступила в редакцию 24.10.2019 г.

The article was submitted to the journal on 24.10.2019