

На правах рукописи

РОГОВАЯ ОЛЬГА СЕРГЕЕВНА

**РЕКОНСТРУКЦИЯ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ДЕФЕКТОВ УРЕТРЫ И
ТРАХЕИ КРОЛИКА С ПОМОЩЬЮ ЖИВОГО ЭКВИВАЛЕНТА КОЖИ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва, 2013

Работа выполнена в лаборатории проблем клеточной пролиферации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (ИБР РАН)

Научный руководитель:

Васильев Андрей Валентинович,
доктор биологических наук, ИБР РАН,
Заместитель директора по научной работе

Официальные оппоненты:

Ильинская Ольга Петровна, кандидат
биологических наук, Биологический
факультет МГУ имени М.В. Ломоносова,
доцент кафедры клеточной биологии и
гистологии

Омельяненко Николай Петрович,
доктор медицинских наук, ФГУ ЦИТО
им. Н.Н. Приорова, Зав. лабораторией
соединительной ткани

Ведущая организация:

Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки Институт
цитологии Российской академии наук
(ИНЦРАН)

Защита состоится «19» ноября 2013г. в _____ на заседании диссертационного совета Д 501.001.52 при Московском Государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12, Биологический факультет МГУ, ауд. М-1.
Факс:8(495)939-17-46; e-mail: dis_kalsov@mail.ru

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Автореферат разослан «___» октября 2013 г.

ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Е.Н. Калистратова

Актуальность проблемы

Актуальной проблемой современной биомедицины является изучение границ и механизмов пластичности постнатальных стволовых тканеспецифических клеток млекопитающих. Именно стволовые (прогениторные) тканеспецифические клетки являются потенциалом для регенерации всех тканей и органов. Складывающаяся сегодня концепция клеточных механизмов регенерации предполагает, что характер и механизмы регенерации определяются типами вовлеченных в процесс стволовых (прогениторных) клеток (Phinney, 2007; Prockop, 2007; Vais et al., 2011; Baker et al., 2012). Несмотря на большое число экспериментальных данных, вопросы механизмов и пределов пластичности тканеспецифических стволовых клеток остаются открытыми. Дискуссионным в последние годы оставался вопрос о возможности трансдифференцировки постнатальных клеток млекопитающих. Сегодня феномен трансдифференцировки показан в некоторых моделях, в том числе и в моделях восстановления эпителиальных тканей роговицы, мочевого пузыря, кишечника и др. (De Coppy et al., 2007; Meyer-Blazejewska et al., 2011). Можно предположить, что границы пластичности эпителиальных стволовых клеток недооценены и могут быть достаточно широкими. Кроме того, феномен пластичности может быть использован в тканевой инженерии и клеточных технологиях как подход для получения клеток и клеточных конструкций, необходимых для восстановления структур и/или функций тканей и органов. Развитие данного направления регенеративной медицины позволит решить такую актуальную проблему, как дефицит собственных тканей пациента, который на сегодняшний день является причиной значительного количества неудач реконструктивных операций (Mhashikar & Atala, 2012; Fisher & Mauck, 2013). Не менее значимой является проблема разработки гистотипических тканевых конструкций *in vitro*, пригодных для моделирования морфогенетических процессов, в том числе и с участием стволовых тканеспецифических клеток (Palmiero et al., 2010; Tuan, 2011; Peterbauer-Scherb et al., 2012). Помимо прямого встраивания в структуру поврежденной ткани возможно и индукционное участие стволовых клеток и клеточных конструкций в процессах регенерации и репарации. Такое индуцирующее влияние может быть различным по интенсивности и специфичности. Именно индукционным влиянием можно объяснить восстановление тканей после трансплантаций аллогенных тканеинженерных гистотипических конструкций, содержащих стволовые (прогениторные) клетки (Kim et al., 2010). С учетом изложенного в данной работе был исследован живой эквивалент кожи, как альтернативный источник пластического материала для закрытия полнослойных эпителио-стромальных повреждений различного генеза. На примерах восстановления уретры и трахеи лабораторных кроликов в работе исследованы возможности применения для этих целей живого эквивалента кожи. В данной работе исследован разработанный *in vitro* живой эквивалент кожи, как частный случай трехмерного эпителио-стромального эквивалента в сравнении с исходной тканью - кожей, в частности по критериям распределения в них эпидермальных стволовых клеток и специфических маркеров кератиноцитов. Исследована возможность трансдифференцировки эпидермальных кератиноцитов в составе трехмерных тканевых конструкций в модели реконструкции уретры.

Цель и задачи исследования

Цель настоящей диссертационной работы заключалась в изучении регенеративного потенциала культивируемых эпидермальных кератиноцитов в модели реконструкции эпителиальных дефектов трахеи и уретры кролика с помощью трансплантации живого эквивалента кожи.

В связи с этим были поставлены следующие *задачи*:

1. Охарактеризовать эпидермальные кератиноциты, выращенные в условиях живого эквивалента кожи, используя дифференцировочные маркеры кератиноцитов, стволовых клеток эпидермиса и маркеры пролиферации в сравнении с эпидермисом кожи.
2. На модели реконструкции трахеи кролика изучить возможное индуцирующее влияние живого эквивалента кожи на репарацию полнослойного повреждения трахеи при аллогенной трансплантации.
3. Изучить изменения фенотипа культивированных кератиноцитов кожи при аутологичной трансплантации в уретру кроликам.
4. Экспериментально обосновать возможность реконструкции уретры путем трансплантации живого эквивалента кожи.

Научная новизна

В работе показано, что специальные условия культивирования кератиноцитов позволяют обогатить культуру низкодифференцированными клетками с большим пролиферативным потенциалом (положительных по маркеру p63). Продемонстрирована адекватность использования живого эквивалента кожи для исследований стволовых клеток эпидермиса. Впервые разработана модель трансдифференцировки эпидермальных кератиноцитов в эпителий уретры, основанная на реконструкции деэпителизированной уретральной трубки аутологичной трансплантацией живого эквивалента кожи. В результате трансплантации в уретру аутологичные кератиноциты кожи кролика уже через две недели меняли свой фенотип, экспрессируя кератины 7 и 18, свойственные уротелию, а через 1,5 месяца после трансплантации кератиноцитов, маркированных EGFP, в неэпителии была обнаружена экспрессия уроплакина 3.

Практическая и теоретическая значимость работы

Разработанные в ходе исследования методики легли в основу клинических технологий лечения полнослойных эпителиальных дефектов:

-совместно с заведующим хирургическим отделением Измайловской детской клинической больницы, профессором, д.м.н. А.К. Файзулиным разработана оригинальная методика реконструкции уротелия при гипоспадии: показана принципиальная возможность лечения дефектов уретры трансплантацией живого эквивалента кожи;

- совместно с хирургом, доцентом кафедры онкологии ГБОУ ИПК ФМБА России, к.м.н. Е.В.Батухтиной разработана оригинальная методика реконструкции эпителия трахеи и гортани с использованием живого эквивалента кожи. Показано влияние аллогенных клеток трансплантата на регенерацию эпителия трахеи: аллогенные клетки сохраняются в организме достаточно долго, для того чтобы стимулировать эпителизацию слизистой реципиента.

Апробация

Основные результаты работы были представлены на конференциях: «Молекулярная медицина и биобезопасность» (Москва, 28-29 октября 2010 г.); «Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты -III» посвященная памяти Н.Г. Хрущова (Москва, ИБР РАН, 6 – 8 июня 2011 г.);

«Стволовые клетки и регенеративная медицина» - IV всероссийская научная школа-конференция (Москва, 24-27 окт. 2011г.); на заседании объединенного семинара ИБР РАН по специальности «Клеточная биология, цитология и гистология» 03.03.04 (20 февраля 2012г.) и на научном семинаре кафедры клеточной биологии и гистологии, биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (25 сентября 2013г.).

Личное участие автора

Автор освоила все экспериментальные методы, используемые в данной работе, за исключением микрохирургической техники, используемой при проведении операций на животных (микрохирургические операции на уретральной трубке кроликов проводили совместно с хирургом д.м.н. А.К. Файзулиным, операции на трахее у кроликов проводили совместно с хирургом к.м.н. Е.В. Батухтиной). Основные результаты были получены автором лично, выводы сделаны на основе анализа собственных результатов.

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 137 страницах, содержит 41 рисунок и 5 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы, включающего 246 источников.

Материалы и методы исследования

Эксперименты *in vitro* проводили на клетках человека: фибробластах и кератиноцитах из кожи человека, лоскуты которой получены в результате пластических операций и любезно предоставлены Институтом пластической хирургии и косметологии. Эксперименты по аллогенной и аутологичной трансплантациям живого эквивалента кожи в дефект трахеи и уретры кроликам проводили на 40 взрослых кроликах породы шиншилла (ОПХ «Манихино»).

Выделение и культивирование постнатальных фибробластов и кератиноцитов человека. Постнатальные фибробласты человека получали из кожных биоптатов, полученных при косметических операциях. Лоскут кожи помещали в стерильный раствор среды M199 или Игла с антибиотиками (0,4 мг/мл гентамицина), в случае необходимости образцы кожи хранили в течение 48 часов при +4°C в данном растворе. Перед началом работы образцы кожи тщательно промывали в растворе Хенкса с антибиотиками (0,4 мг/мл гентамицина). Бритвой срезали подкожный жир, нарезали полученный лоскут на полоски шириной 3x10 мм, помещали в 0,125%-ный раствор диспазы («Sigma») и инкубировали при 4°C в течение 16-24 ч или в 2%-ом растворе диспазы в течение 1 часа при 37°C. После этого эпидермис пинцетом отделяли от дермы по линии базальной пластинки. После этого эпидермис пинцетом отделяли от дермы по линии базальной пластинки. Кусочки эпидермиса, отделенные от подлежащей дермы, промывали в растворе PBS и помещали в раствор PBS + 0,25% трипсин (1:1). Инкубировали при 36°C в течение 10-15 мин., после чего трипсин ингибировали раствором сыворотки (крупного рогатого скота или лошадиной) и пипетированием получали суспензию эпидермальных кератиноцитов, которую фильтровали через 100 микронное нейлоновое сито и осаждали центрифугированием при 800 об/мин в течение 10 мин. Затем супернатант сливали и суспендировали осадок в среде для культивирования кератиноцитов. Высеивали суспензию кератиноцитов в пластиковые культуральные флаконы «Costar», предварительно сорбированные раствором коллагена в концентрации 200 тыс. кл./мл. Для сорбции

поверхности культуральных флаконов использовали жидкий (0,1 мг/мл) раствор коллагена 1 типа в 0,1% уксусной кислоте. Процедуру проводили следующим образом: на дно флакона наливали 2-3 мл раствора коллагена (для 25см² флакона) и оставляли при 37°C на 20 мин, после чего коллаген сливали и тщательно промывали флакон р-ром Хэнкса с феноловым красным, до исчезновения кислой реакции.

Оставшиеся полоски собственно дермы отмывали в PBS без ионов кальция и измельчали до кусочков величиной 2-3 мм. Дезагрегацию клеток проводили в растворе 0,25%-го трипсина «Биолот» при 37°C в течение 30-60 мин под визуальным контролем. После завершения трипсинизации фермент инактивировали добавлением 2-3%-ов сыворотки крови крупного рогатого скота (или лошадиной). Полученную суспензию клеток дополнительно пипетировали и центрифугировали при 800-1000 об./мин в течение 10 мин. Оставшиеся кусочки дермы трипсинизировали повторно. Процедуру трипсинизации кусков дермы проводили 3-4 раза. Полученный осадок ресуспендировали в среде культивирования (среда Игла с глутамином и 10% ЭТС) и подсчитывали концентрацию клеток в камере Горяева. Высеивали клетки в концентрации 100-200 тыс. кл./мл.

Культивирование фибробластов человека. Фибробласты культивировали в среде Игла с глутамином (0,3 мг/мл) и 10% эмбриональной сыворотки в CO₂ инкубаторе при 37°C. Смену среды проводили через каждые 3-4 дня, культуры пассировали при достижении конфлуентного слоя, обычно каждые 4-5 дней. Пассирование фибробластов проводили, снимая клетки с поверхности флаконов 0,05% р-ром трипсина на р-ре Версена и рассеивали в отношении 1:2 – 1:3. В опытах были использованы культуры фибробластов ранних (6-8) пассажей.

Культивирование кератиноцитов человека. Кератиноциты человека культивировали на среде DMEM/F-12 (2:1) с 10% ЭТС, 5 мкг/мл инсулина ("Sigma"), 10⁻⁶М изопротеренола ("Sigma"), 5мкг/мл трансферрина («Sigma») 10нг/мл эпидермального фактора роста (ЭФР), и культивировали при регулярной смене среды в CO₂-инкубаторе.

Выделение и культивирование кератиноцитов кролика. Лоскут кожи размером 1x1 см для выделения кератиноцитов вырезали с внутренней стороны уха кролика под местной анестезией. Далее выделение проводили по стандартному протоколу, описанному выше.

Культивирование кератиноцитов кролика. Первые трое суток после посева кератиноциты кролика культивировали на среде DMEM/F-12 (2:1) с 10% ЭТС, 5 мкг/мл инсулина ("Sigma"), 10⁻⁶М изопротеренола ("Sigma"), 5мкг/мл трансферрина («Sigma»). После этого культуру клеток переводили на среду DMEM/F-12 (2:1) с 5% ЭТС, 10нг/мл эпидермального фактора роста (ЭФР) с суммой остальных добавок (см. выше) и культивировали при регулярной смене среды в CO₂-инкубаторе.

Дестратификация пластов культуры кератиноцитов. Дестратификацию культуры кератиноцитов производили после формирования клетками многослойного пласта, для чего меняли среду в культуральных флаконах на среду КВЕ без Ca²⁺ и оставляли на 1-3 суток до полного отслоения всех, кроме базального, слоев клеток. После проведения дестратификации культуру кератиноцитов переводили на нормальную среду для культивирования.

Приготовление коллагенового геля. Для приготовления коллагенового геля последовательно смешивали следующие растворы: стерильный 0,34М

раствор NaOH соединяли с концентрированной (x10) питательной средой 199 в соотношении 1:2 и на каждые 100мл смеси добавляли 100 мг глутамин и 9 мл 7,5% бикарбоната натрия. Полученную смесь соединяли с охлажденным раствором коллагена в уксусной кислоте в соотношении 1:4, после чего помещали на лед для предотвращения быстрой желатинизации. На этом этапе в полученную смесь вносили суспензию фибробластов.

Приготовление и культивирование живого эквивалента кожи на основе фибробластов и кератиноцитов человека для экспериментов in vitro. На первом этапе приготовления живого эквивалента кожи формировали эквивалент дермы - готовили коллагеновый гель с постнатальными фибробластами кожи человека в концентрации 80 тыс. кл./мл геля, как описано выше и заливали в чашки Петри. На чашку Петри диаметром 3,5 см 1,5 мл геля. Для застывания коллагеновый гель помещали в CO₂-инкубатор не менее, чем на 40 минут. После полного застывания геля на его поверхность высаживали пассированные кератиноциты человека в концентрации 250 тыс. кл./мл и культивировали 5 суток в CO₂ инкубаторе.

Приготовление живого эквивалента кожи на основе аллогенных кератиноцитов и фибробластов кролика для восстановления трахеи. В стерильных условиях вскрывали упаковку сетки "Vicril" и ножницами вырезали кусочек по размеру и форме соответствующий размеру чашки Петри, и однократно промывали его р-ром Хэнкса. Затем готовили коллагеновый гель с постнатальными фибробластами кролика в концентрации 80 тыс. кл./мл геля, как описано выше и заливали в чашки Петри с сеткой из расчета 1,5 мл геля на чашку Петри диаметром 3,5 см.

Фибробласты в коллагеновом геле культивировали на поверхности сетки в течение суток в CO₂ инкубаторе. На следующие сутки после посадки фибробластов в гель на его поверхность высевали кератиноциты кожи кролика, предварительно прошедшие процедуру дестратификации, в концентрации 250 тыс. кл./мл и культивировали 3-4 суток в CO₂ - инкубаторе. За одни сутки до трансплантации живой эквивалент переводили на полную среду для кератиноцитов (DMEM / F-12 (1:1) ЭФР 10 ng/ml, инсулин 5 мкг/мл, изопротеренол 10⁻⁶ М), без сыворотки.

Приготовление живого эквивалента кожи на основе аутологичных кератиноцитов и фибробластов кролика для трансплантации в дефект уретры. В стерильных условиях вскрывали упаковку губки «Spongostan», ножницами вырезали кусок по размеру и форме соответствующий размеру чашки Петри и однократно промывали его р-ром Хэнкса. Затем готовили коллагеновый гель с постнатальными фибробластами кролика или человека в концентрации 25-30 тыс. кл. /мл геля, как описано выше и заливали в чашки Петри со спонгостаном из расчета 1,5 мл геля на чашку Петри диаметром 3,5 см. Фибробласты в коллагеновом геле культивировали на поверхности губки в течение суток в CO₂ инкубаторе. Затем, используя данную конструкцию, как эквивалент соединительной ткани, готовили живой эквивалент кожи с фибробластами в коллагеновом геле и кератиноцитами кожи кролика на его поверхности по стандартному протоколу, описанному выше. Для того, чтобы соблюсти принцип аутологичной трансплантации в дальнейшем, на всех этапах на культуральную посуду с культурой кератиноцитов и с живым эквивалентом кожи наклеивали этикетку с номером, присвоенным подопытному животному.

Мечение клеток трейсером. Для мечения аутологичных кератиноцитов на начальном этапе работы использовали 0,00001% раствор мембранного трейсера DiI в культуральной среде без сыворотки, в котором в течение часа инкубировали готовые к трансплантации клетки.

Лентивирусная трансфекция культуры кератиноцитов. Трансфекцию клеток флуоресцентным зеленым белком (EGFP) проводили с использованием лентивирусной конструкции пр-ва «Евроген», вирус поставляется в среде DMEM в количестве $1,5 \times 10^6$ вирусных частиц/мл. Трансфекцию проводили, внося рекомендованное производителем количество – 10 копий вируса на 1 клетку. Для проведения трансфекции кератиноциты высевали в чашку Петри (\varnothing 3,5 см) в количестве $1,5 \times 10^5$ клеток, затем, после полного прикрепления клеток, питательную среду в чашке заменяли на DMEM с частицами вируса. Для повышения проницаемости клеточной мембраны в эту же среду добавляли полибрен в концентрации 5 мг/мл. Через сутки среда с вирусом удалялась и культуру клеток переводили на обычную питательную среду для кератиноцитов. Через 72 часа наблюдали экспрессию EGFP.

Гистологические исследования. Приготовление парафиновых срезов. В качестве фиксатора использовали 4% параформальдегид на р-ре PBS (рН 7.4). Ткань фиксировали сутки, затем промывали PBS, далее проводили обезвоживание ткани, проводя ее через спирт по стандартному протоколу. При дальнейшей гистологической проводке использовали метод с использованием ксилола. Далее образцы помещали в парафин. Для изготовления срезов из парафиновых блоков использовался микротом MICROM фирмы «Carl Zeiss». Готовили серийные парафиновые срезы толщиной 5 мкм, которые наносили на стекла. После депарафинирования срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Приготовление криосрезов. Фиксацию кусочков ткани размером не более 0,5x1,0 см проводили в течение 1 часа при комнатной температуре в 4% растворе параформальдегида, промывали материал PBS и помещали в 20% раствор сахарозы для пропитки на 8-12 часов до полного погружения. Подготовленный таким образом материал замораживали в парах азота и хранили при -70°C . Срезы толщиной 15-20 микрон получали на криостате «Leica DM IL» (ФРГ).

Иммуногистохимические исследования. Для определения экспрессии различных белков использовали моноклональные антитела для выявления кератинов кожи K10, K14 и K19 и уротелия K7 и K18 (NovoCastra), уроплакина 3 (UP) (UsBioLogical), маркера пролиферации клеток Ki67, стволовых и прогениторных клеток эпителия – p63 (abCam) и EGFP (Евроген). В экспериментах использовали иммунофлуоресцентный и иммунопероксидазный методы выявления антигенов.

При иммунофлуоресцентном методе использовали следующий протокол окраски: первичные антитела разводили на блокирующем растворе (5% бычьего сывороточного альбумина + 0,1% тритона X-100 на р-ре PBS) в концентрациях, рекомендованных производителями антител, и наносили на промытые 0,1% раствором PBS срезы. Инкубирование проводили в течение 12-16 часов при $+4^{\circ}\text{C}$. После этого 4-5 раз промывали материал в 0,1% р-ре PBS и инкубировали в растворе вторых антител Alexa-488 (Molecular probes) на р-ре PBS в течение 40 минут в темноте при комнатной температуре.

При иммунопероксидазном методе промытые 0.1% раствором PBS срезы инкубировали с 3% перекисью водорода на PBS в течение 20 минут для ингибирования эндогенной пероксидазы. Затем промывали в 0,1% PBS в течение 15 минут и проводили обработку препарата 0.1% раствором тритона X-100 в течение 30 минут при комнатной температуре. После последующей троекратной отмывки в PBS проводили обработку материала сывороткой, блокирующей неспецифические антигены, взятой у животного-донора вторых антител. После этого наносили первые антитела на р-ре PBS (в концентрациях, рекомендованных производителем) и инкубировали при 4°C в течение 16-19 часов. Далее проводили троекратную отмывку в 0,1% PBS по 15 мин и инкубировали со вторыми универсальными биотинилированными антителами в течение трех часов при комнатной температуре. После отмывания проводили инкубацию препаратов с комплексом срептавидин - пероксидаза в течение получаса при комнатной температуре. Далее промывали PBS и наносили ДАБ, окрашивание проводили под визуальным контролем. Останавливали реакцию при проявлении интенсивной коричневой окраски проточной водой. Для приготовления временных препаратов образцы заключали в глицерин.

Исследования препаратов пластов кератиноцитов на конфокальном микроскопе. Данный метод использовали для исследования пластов кератиноцитов культивированных на поверхности живого эквивалента кожи. Для этого живой эквивалент кожи обрабатывали 2% диспазой в течение 40 минут при 37, аккуратно пинцетами отделяли эпителиальный пласт и переносили его на викриловую сеточку для того, чтобы пласт не сворачивался. Затем подготовленный таким образом пласт на сетке помещали в стеклянный бюкс и фиксировали 4% ПФА в течение 1 часа. После фиксации 3 раза по 15 минут промывали раствором PBS. Затем проводили иммуногистохимическое окрашивание с использованием в качестве системы визуализации вторых антител, химически «сшитых» с флуоресцентными молекулами, по протоколу описанному выше. После окрашивания эпителиальный пласт пинцетами переносили на предметное стекло, препарат заключали в глицерол и накрывали покровным стеклом. Исследование проводили на конфокальном микроскопе Leica TCS SP1 с двумя спектральными детекторами флуоресценции и детектором проходящего света.

Определение жизнеспособности культуры фибробластов человека в коллагеновом геле с использованием флуорохромов. Для выявления живых клеток использовали витальный краситель флуорин диацетат (ФДА). Продукт его гидролиза – флуоресцеин – накапливается в клетках с неповрежденной мембраной и служит маркером живых клеток, которые светятся в зеленом спектре. Для выявления мертвых клеток использовали бромистый этидий (EtBr), обладающий свойством накапливаться в ядрах мертвых клеток. Маточные растворы, ФДА - 1мг/мл, EtBr - 25 мг/мл, разводили в концентрации 25 мкл каждого из них в 1 мл PBS. В рабочий раствор погружали гель с клетками, а само окрашивание производили при температуре 37°C в течение 10 мин. После троекратной промывки PBS гель помещали на предметное стекло в 100 мкл буфера, накрывали покровным стеклом и просматривали под флуоресцентным микроскопом.

Статистические методы обработки данных. Статистическую достоверность количественных результатов оценивали с использованием U-теста Манна-Уитни программы STATISTICA 8.0 (Stat Soft.Inc.). Простой непараметрический U-критерий Манна- Уитни использовали для анализа 3-

10 выборок данных. Для определения стандартного отклонения разброса данных по выборке использовали функцию СТАНДОТКЛОН в программе Microsoft Excel 2007.

Методика реконструкции экспериментального дефекта трахеи кролика. Операцию проводили под общей анестезией, используя калипсол в сочетании с раметаром в соотношении 1:2 по два мл. раствора на одно животное. Калипсол был получен на базе ГБОУ ИПК ФМБА России. Сначала осуществляли депиляцию передней поверхности шеи животного. Затем при помощи ножниц и скальпеля делали надрез и осуществляли доступ к прямым мышцам шеи. На внутреннюю поверхность кивательной мышцы имплантировали живой эквивалент кожи и фиксировали узловыми швами. Изоляцию тканевого эквивалента производили следующим образом: укрывали его сверху перфорированным латексным материалом и фиксировали данный материал по периметру прилегания живого эквивалента кожи к мышце. Помещенный в такие условия живой эквивалент кожи префабрицировали (культивировали в организме кролика) в течение двух недель. Через 14 дней осуществляли доступ к грудино-подъязычной мышце, удаляли латексный материал с поверхности трансплантата. Затем, производили пересечение дистального или проксимального отдела грудино-подъязычной мышцы. Таким образом формировали мышечный лоскут на сосудистой ножке с живым эквивалентом кожи на его поверхности. При помощи скальпеля формировали обширный нециркулярный дефект трахеи размерами в длину 0,8- 1,0 см и 0,5-0,7 см в ширину, притом, что диаметр трахеи у кролика в данной группе экспериментальных животных составлял от 1,2 до 1,5 см.

Жесткость и необходимую конфигурацию сформированному мышечному лоскуту придавали титановой пластиной фиксированной к мышце узловыми швами. Сформированный трансплантат (мышечный лоскут на титановой пластине с культивированным на поверхности эквивалентом) располагали в экспериментальном дефекте трахеи так, чтобы в просвет трахеи была обращена сторона с живым эквивалентом. Дефект трахеи закрывали фиксацией трансплантата к трахее узловыми швами.

Методика реконструкции экспериментального дефекта уретры кролика Операцию проводили под общей анестезией, по методу описанному выше. Параллельно использовали новокаиновую блокаду полового члена, вводя по 0,5 мл новокаина в область оперативного вмешательства. Операцию начинали с окаймляющего разреза вокруг головки полового члена с переходом на продольный разрез кожи по вентральной поверхности полового члена до его основания. Кожу ствола полового члена мобилизовывали до основания, рассекали мышцу по вентральной стороне до просвета уретры. После этого при помощи пинцетов отделяли эпителиальную выстилку уретры по базальной мембране на протяжении 1-1,5 см до предстательного отдела в основании полового члена кролика. Живой эквивалент кожи на коллагеновой основе прямоугольной формы, равный по длине дефекту уретральной трубки, а по ширине – длине окружности создаваемой уретры, сшивали в трубчатое образование. Далее накладывали анастомоз проксимального его конца с остатками уротелия по типу «конец в конец» на катетере, сшивали дистальный отдел созданной уретры с вершиной головки полового члена и ушивали раневой дефект местными тканями. Уретральный катетер № 8 Ch подшивали к коже головки полового члена атравматической нитью PDS 5/0. Операция завершалась

наложением компрессионной повязки с глицерином. На 7-е сутки удаляли уретральный катетер.

Содержание работы

1. *Исследование живого эквивалента кожи in vitro*

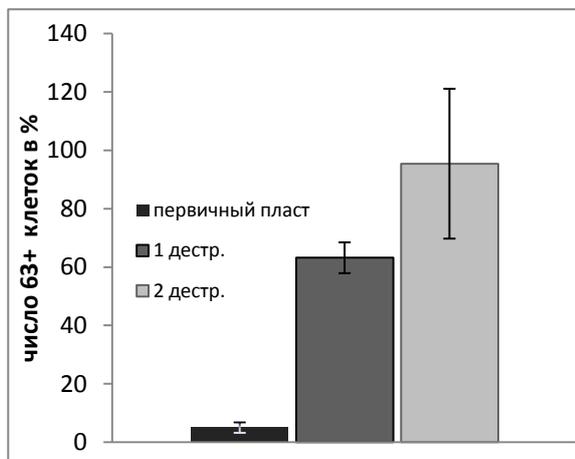


Рис. 1. Изменение количества p63-положительных клеток в пласте эпидермальных кератиноцитов человека после проведения процедур дестратификации

Для длительного культивирования, наращивания клеточной массы кератиноцитов человека и кролика нами был модифицирован метод дестратификации культивированных эпителиальных пластов. Для изучения состава клеточной популяции на разных этапах культивирования были проведены иммуногистохимические исследования базальных кератиноцитов человека на присутствие маркера стволовых и ранних прогениторных эпителиальных клеток p63, а для выявления пролиферирующих клеток использовали маркер Ki67. Были исследованы культуры кератиноцитов кожи, полученные от трех доноров. В

первичной культуре кератиноцитов доля p63-положительных клеток составила $5 \pm 1,8\%$. После первой дестратификации количество таких клеток в базальном слое культуры увеличилось до $63 \pm 5,3\%$, а после второй – до $95 \pm 25\%$ (рис. 1). Иммуногистохимический анализ первичного пласта кератиноцитов и кератиноцитов, прошедших как одну, так и две последовательных дестратификации, выявил присутствие Ki67-положительных в количестве $8 \pm 2\%$ клеток от их общего числа. Для создания живого эквивалента кожи использовали культуры кератиноцитов, прошедших процедуру дестратификации и пассированных на поверхность коллагенового геля с фибробластами. Иммуногистохимический анализ экспрессии дифференцировочных маркеров кератиноцитов показал, что все клетки базального слоя живого эквивалента кожи являются положительными по маркеру базальных кератиноцитов K14, а клетки супрабазального и верхних слоев эпителиального пласта несут маркер высокодифференцированных клеток эпидермиса K10. В базальном слое пласта кератиноцитов живого эквивалента кожи были найдены единичные K19-положительные клетки. В нормальной коже взрослого человека K19-положительные клетки выявлены как в волосяном фолликуле, так и в эпителии протока сальной железы. Полученные нами результаты показали, что распределение специфических типов промежуточных филаментов в кератиноцитах живого эквивалента кожи полностью соответствует таковому в эпидермисе кожи человека. Наличие в базальном слое эпителиального пласта живого эквивалента кожи K19-положительных и p63-положительных кератиноцитов указывает на присутствие малодифференцированных кератиноцитов. При формировании живого эквивалента мы использовали прошедшие культивирование *in vitro* клетки кожи, что повлияло на увеличение количества и изменение распределения K19-положительных клеток в живом эквиваленте кожи (Чермных, 2008).

Таким образом, нам удалось установить, что сформированный *in vitro* живой эквивалент кожи обладает гистотипическим сходством с нативным эпителием кожи человека.

2. Исследование живого эквивалента кожи как трансплантата при замещении экспериментального дефекта трахеи

Эксперимент проведен на 20 лабораторных кроликах породы «Шиншилла». Для сохранения структурной целостности трансплантируемого живого эквивалента кожи был разработан двухэтапный протокол реконструкции дефекта (см. глава материалы и методы). На первом этапе живой эквивалент кожи трансплантировали на участок кивательной мышцы животного и префабрицировали его в условиях реципиента две недели. На 14 сутки после этого проводили собственно реконструкцию полнослойного дефекта трахеи. Одновременно проводили биопсию полученного трансплантата для гистологического исследования, в результате которого выявлено наличие клеток на поверхности мышцы был выявлен пласт эпителиальных клеток. Иммуногистохимический анализ показал, что эти клетки экспрессируют общие кератины (рис. 2А)

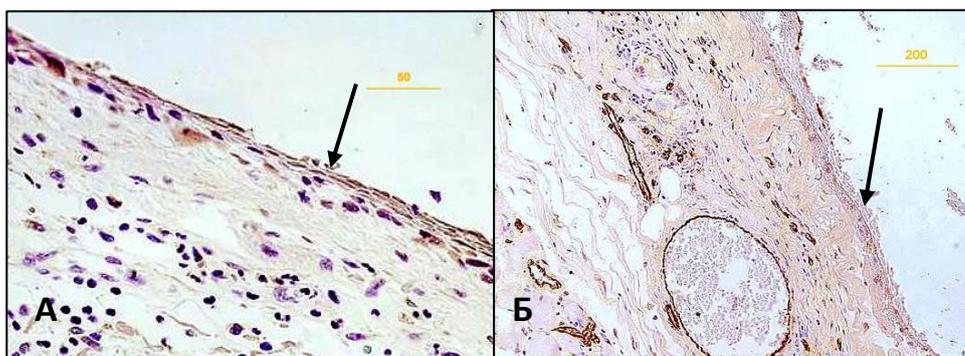


Рис. 2. Поперечные срезы эпителиально-мышечного трансплантата: 14 суток префабрикации на поверхности мышцы кролика. Иммунопероксидазное выявление: кератиноцитов (маркер – общие кератины, коричневое окрашивание) (А); эндотелиальных клеток (маркер – CD31 коричневое окрашивание) (Б). Стрелками показан эпителий. Размер масштабной линейки здесь и далее указан в мкм.

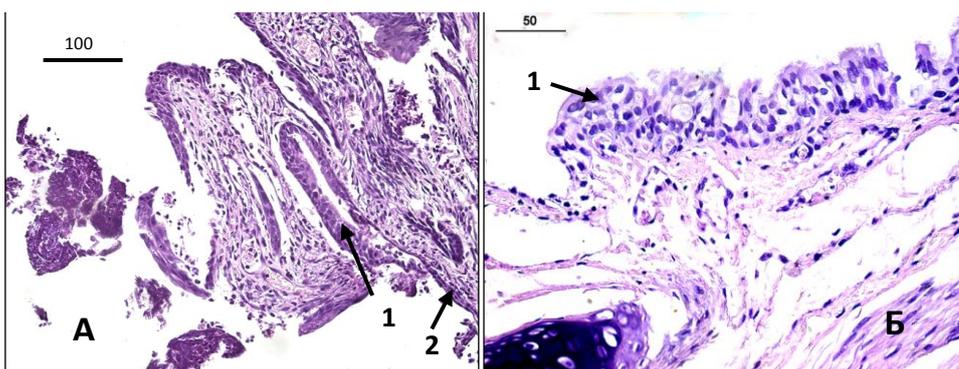


Рис. 3. Поперечные срезы трахеи в области трансплантации эпителиально-мышечного трансплантата через 14(А) и 30 суток (Б) после реконструктивной операции. В зоне дефекта обнаружен многорядный цилиндрический (1) и плоский многослойный эпителий (2). Окраска гематоксилин-эозином.

Наличие большого количества сосудов микроциркуляторного русла указывало на жизнеспособность искусственно созданного трансплантата (рис. 2Б). Таким образом, этап префабрикации на мышцу позволил получить

эпителизированный мышечный лоскут, который удобно использовать на реконструктивном этапе операции. В контрольной группе животных реконструкцию трахеи проводили по описанной выше методике мышечным лоскутом. Через две недели после реконструкции при визуальном контроле трахеи, в контрольной группе животных в центре перемещенного лоскута отмечалось изъязвление размерами от 0,2 до 0,5 см, ни у одного из животных контрольной группы не наблюдали полной эпителизации зоны дефекта. При гистологическом исследовании срезов трахеи кролика на 14 сутки после реконструкции в экспериментальной группе животных у трех из пяти кроликов показана частичная эпителизация зоны повреждения многорядным цилиндрическим эпителием. Также в зоне дефекта обнаружены участки многослойного плоского эпителия (рис. 2А). В соединительной ткани под хрящом выявлялись единичные волокна шовного материала с гранулемами и гигантскими клетками инородных тел. В контрольной группе животных дно дефекта заполнено тканевым детритом, а в подлежащих тканях присутствуют очаги фиброобразования без эпителизации. Через 30 суток после реконструктивного этапа в контрольной и в экспериментальной группах животных визуально отмечали полную эпителизацию дефекта. В контрольной группе в зоне дефекта наблюдали стриктуры и втянутые рубцы, у животных экспериментальной группы не выявлено рубцовой деформации послеоперационной зоны. Гистологическое исследование препаратов трахеи кролика экспериментальной группы животных показало, что стенка трахеи в зоне повреждения представлена нормальной слизистой оболочкой. У животных контрольной группы участок реконструированной трахеи выстлан многоядерным цилиндрическим эпителием.

Полученные результаты позволяют предположить, что аллогенная трансплантация живого эквивалента кожи стимулирует собственную регенерацию эпителия трахеи кролика.

3. Исследование поведения аутологичных кератиноцитов в составе живого эквивалента кожи, трансплантированного в дефект уретры

Эксперимент проведен на 20 самцах лабораторных кроликов породы «Шиншилла». Для восстановления уретры в модели ее экспериментального дефекта у кроликов мы использовали живой эквивалент кожи, выращенный из аутологичных эпидермальных кератиноцитов. Для идентификации трансплантированных клеток использовали мембранный трэйсер DiI или генетическую метку EGFP. Полученную конструкцию имплантировали на место созданного уретрального дефекта у кролика. В первой контрольной группе кроликам трансплантировали коллагеновую основу живого эквивалента кожи без клеток, во второй - оставляли открытую рану. У животных контрольных групп после удаления катетера происходило быстрое стенозирование уретры, что препятствовало свободному мочеиспусканию, и приводило к гибели животного на 5-10 сутки.

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование уретры кролика экспериментальной группы показало, что через 14 суток после реконструкции уретерий не был полностью восстановлен. Выявлены небольшие участки эпителизации, обнаружены скопления клеток, содержащих метку DiI и положительных по K14 - маркеру базальных кератиноцитов эпидермиса кожи. Клеток, положительных по маркерам уретерия K18 и K7, на данном обнаружено не было. Через 21 сутки после операции на гистологических срезах было выявлено полное закрытие дефекта плоским эпителием, состоящим из 1-3 слоев клеток (рис. 4А). Большинство клеток

восстановленного уротелия содержали мембранный трейсер и экспрессировали маркер эпителия K14 и маркер уротелия K7. Маркеры уротелия K18 и уроплакин 3 (UP3) на данных сроках в неоуротелии выявлены не были. Через 45 суток после трансплантации эпителий уретры на гистологических срезах был представлен эпителием переходного типа, состоявшим из 3-7 слоев клеток. Меченные EGFP клетки были найдены во всех слоях эпителия уретры. Иммунофлуоресцентный анализ показал, что часть EGFP-положительных клеток экспрессирует K14, также была выявлена экспрессия маркеров уротелия: K7, K18 и UP3. Анализ распределения экспрессии данных маркеров и экспрессии EGFP в клетках неоуротелия выявил колокализацию зеленого флуоресцентного белка и дифференцировочных маркеров клеток уротелия (рис. 5В, Г). Через 3 месяца после трансплантации был обнаружен полностью сформированный уротелий нормального строения (рис. 4Б), большая часть клеток верхнего слоя которого экспрессировала UP3. Также были обнаружены группы клеток, содержащие EGFP. Такое распределение меченых клеток можно объяснить тем, что одновременно с разрастанием островков эпителизации за счет трансплантированных кератиноцитов происходила миграция клеток уротелия, расположенного вокруг дефекта из верхнего отдела уретры и мочевого пузыря. На данном сроке все слои неоуротелия экспрессировали K7. Коэкспрессия EGFP и дифференцировочных маркеров уротелия также наблюдалась через 3 месяца после трансплантации (рис. 5Ж, З, И). Результаты трансплантации живого эквивалента кожи в дефект уретры представлены в таблице 1. Таким образом, при трансплантации в область дефекта уротелия аутологичные кератиноциты кожи встраиваются в структуру уретры, восстанавливая ее целостность и функциональность, и, под действием специфического микроокружения, приобретают фенотипические признаки клеток уротелия. Полученные данные позволяют предположить, что тканеспецифические кератиноциты кожи, выращенные *in vitro* и помещенные в уретру, проявляют способность к пластичности.

Таблица 1. Сводные результаты трансплантации живого эквивалента кожи в децеллюлированную уретру кроликам.

	Подопытные группы животных					Контроль: рана	Контроль коллаген без клеток
	14 сут. /2 жив.	21 сут. /3 жив.	30 сут. / 3 жив.	45 сут. / 3 жив.	3 мес. / 3 жив.		
Число исследованных животных на разные сроки после трансплантации	14 сут. /2 жив.	21 сут. /3 жив.	30 сут. / 3 жив.	45 сут. / 3 жив.	3 мес. / 3 жив.	14 сут. / 3 жив.	14 сут. / 3 жив.
Кол-во животных, способных к свободному мочеиспусканию	2	3	3	3	3	0	0
Экспрессия маркера эпидермиса K14	++	++	+	+	+	-	-
Экспрессия маркера уротелия	-	K7	K7, K18	K7, K18, UP	K7, K18, UP	-	-

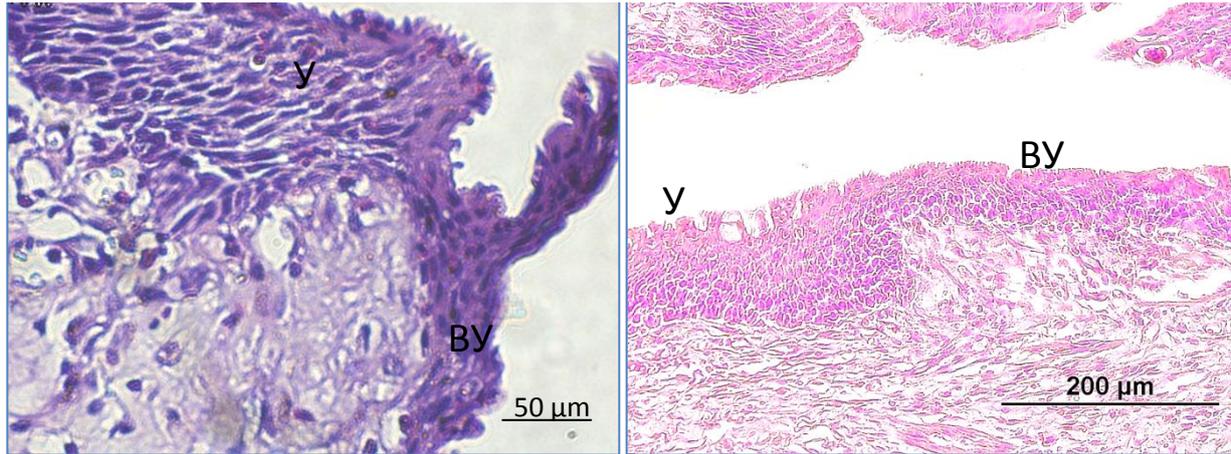


Рис. 4. Восстановленные участки уретры кролика, 21 сутки (А) и 3 месяца (Б) после трансплантации живого эквивалента кожи. Продольные срезы. Место анастомоза участков собственной уретры (У) и восстановленной уретры (ВУ). Окраска гематоксилин-эозином.

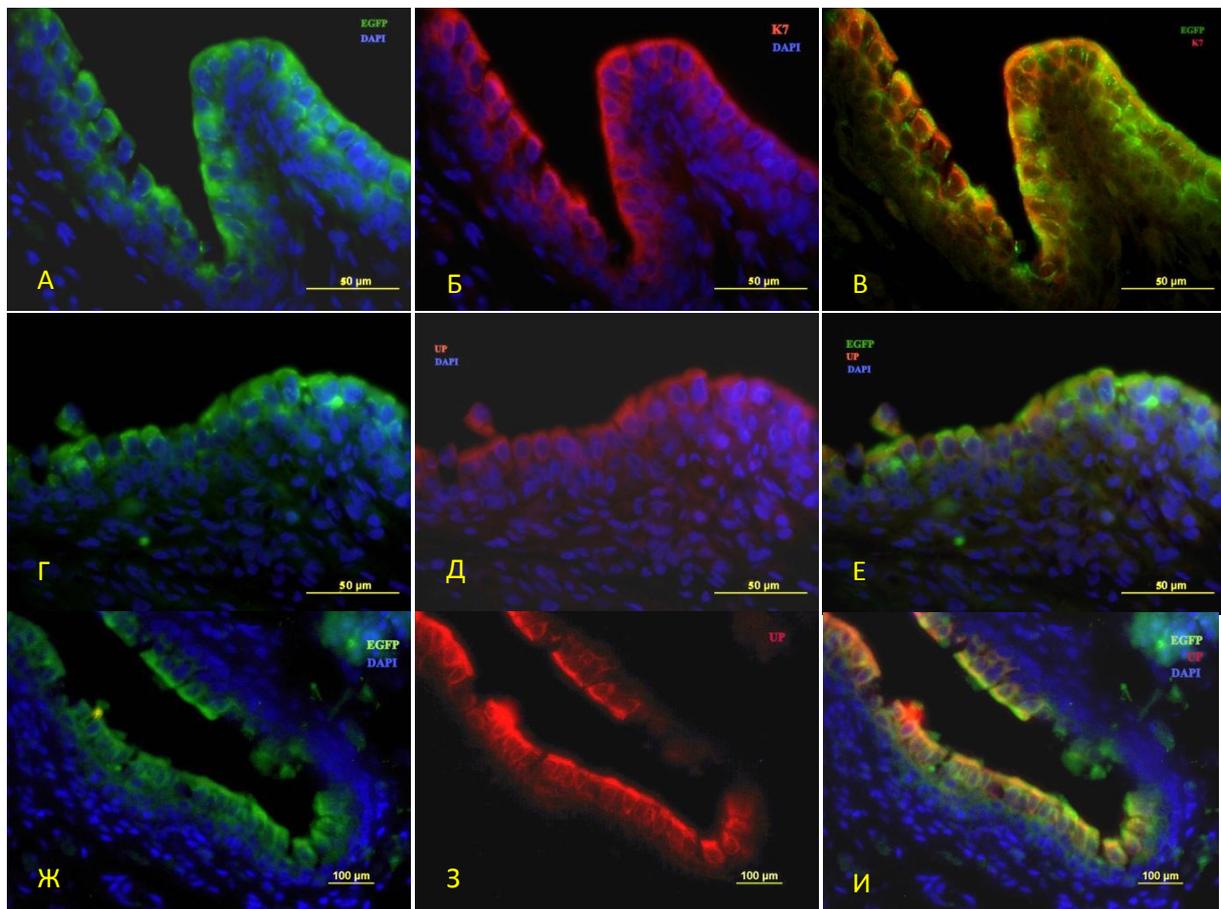


Рис. 5. Участок восстановленного уротелия кролика, 45 сут. (А-Е) и 3 месяца (Ж-И) после трансплантации живого эквивалента кожи. Поперечный срез, иммунофлуоресцентное выявление маркеров уротелия. Колокализованная экспрессия генетической метки EGFP (зеленое окрашивание) и дифференцировочных маркеров уротелия К7 (на Б и В – красное окрашивание), UP3 (на Д, Е, З. и И – красное окрашивание). Ядра окрашены DAPI (синее окрашивание).

Заключение

В ходе работы были проведены исследования функциональной активности эквивалента дермы (фибробластов в коллагеновом геле) как составляющей живого эквивалента кожи. На основе полученных данных нами разработаны различные модификации живого эквивалента дермы и кожи с включенными в его состав носителями в виде коллагеновых или желатиновых микроносителей, губок или сеток из искусственного волокна. Все разработки по модификации живого эквивалента кожи для реализации различных практических медицинских задач были защищены патентами Российской Федерации

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование, показало гистотипическое сходство культивированного *in vitro* живого эквивалента кожи с нативной кожей человека. Показано идентичное распределение клеток, экспрессирующих маркеры базальных (K14+) и супрабазальных (K10+) кератиноцитов кожи в живом эквиваленте кожи и нативной коже человека. Использование активированных в культуре кератиноцитов обуславливает присутствие равномерно распределенных в эпителиальном пласте живого эквивалента кожи стволовых клеток, положительных по маркерам p63+ и K19+. Таким образом, трансплантация разработанной конструкции может быть альтернативным и удобным способом доставки стволовых клеток в область тканевых дефектов различной локализации.

Результатом аллогенной трансплантации живого эквивалента кожи в дефект трахеи у кроликов явилась полная эпителизация дефекта без признаков рубцовой деформации уже через 2 недели после реконструктивного этапа операции.

Серия аутологичных трансплантаций живого эквивалента кожи в деэпителизированную уретру показала, что кератиноциты кожи, помещенные в специфичное микроокружение *in vivo*, способны встраиваться в место дефекта и выполнять функции уротелия. Для трансплантации использовали кератиноциты, меченные EGFP, что позволило идентифицировать пересаженные клетки. Было воссоздано нормальное строение уретральной трубки без образования стриктур и свищей в месте трансплантации живого эквивалента кожи. Иммуногистохимические исследования неоуротелия выявили наличие в его структуре EGFP-положительных клеток, экспрессирующих маркеры уротелия (K7 и UP3).

Результаты проведенных экспериментов позволяют предположить, что регенеративное действие живого эквивалента кожи реализуется за счет следующих механизмов:

- временное встраивание живого эквивалента кожи в ткани реципиента, а также за счет синтеза ими белков внеклеточного матрикса, являющихся «рельсами» для миграции собственных эпителиальных клеток организма в зону дефекта;
- встраивание стволовых клеток эпидермиса в структуру поврежденной ткани и проявления ими под влиянием специфического микроокружения феномена пластичности, в результате чего трансплантированные клетки принимают на себя функции восстанавливаемой ткани.

Выводы

- Эпидермальные кератиноциты кожи человека, прошедшие стадию культивирования и выращенные на поверхности коллагенового геля с фибробластами (живой эквивалент кожи), образуют структуру подобную эпителию нормальной кожи с соответствующим распределением специфических дифференцировочных маркеров кератиноцитов. Культура кератиноцитов в составе живого эквивалента кожи является активно пролиферирующей, среди кератиноцитов присутствуют клетки, экспрессирующие маркеры стволовых клеток эпидермиса p63 и K19.
- Живой эквивалент кожи с аллогенными кератиноцитами при трансплантации в область дефекта трахеи кролика временно встраивается в структуру ткани реципиента и сохраняется там не менее 2 недель. Живой эквивалент кожи с аллогенными эпидермальными кератиноцитами стимулирует регенерацию и эпителизацию полнослойного дефекта трахеи у кроликов.
- Трансплантация живого эквивалента кожи с аутологичными кератиноцитами кожи в эпителиальный дефект уретральной трубки кроликов приводит к полному восстановлению структуры уротелия и функции уретры.
- После трансплантации кролику в дефект уретры живого эквивалента кожи аутологичные эпидермальные кератиноциты меняют свой фенотип и приобретают признаки(синтез кератина 7 и уроплакина 3), характерные для эпителия уретры, что свидетельствует о пластичности взрослых эпидермальных стволовых клеток.
- Разработанный нами живой эквивалент кожи может быть использован как универсальный эквивалент, содержащий мезенхимный и эпителиальный компоненты для восстановления различных эпителиальных дефектов.

Список статей в опубликованных по теме работы в рецензируемых журналах, рекомендованных перечнем ВАК:

1. Смирнов С.В., Киселев И.В., **Роговая О.С.**, Васильев А.В., Терских В.В. Восстановление кожного покрова путем трансплантации выращенных кератиноцитов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2003. Т. 135. С. 711-713.
2. **Роговая О.С.**, Васильев А.В., Киселев И.В., Терских В.В. Использование фибробластов человека, выращенных на микроносителях, для формирования эквивалента соединительной ткани. Онтогенез. 2004. том 35. № 2. С. 105-109.
3. Васильев А.В., Макаров П.В., **Роговая О.С.**, Гундорова Н.С., Терских В.В. Восстановление дефектов роговицы с помощью тканевой инженерии // Известия Академии Наук. 2005. т.32. №1, С.5-8.
4. Чиссов В.И., Решетов И.В., Васильев А.В., Терских В.В., **Роговая О.С.**, Батухтина Е.В. Реконструкция верхних дыхательных путей с использованием тканевого эквивалента у онкологических больных // Российский онкологический журнал. 2005. № 6. С.25-28.
5. Чиссов В.И., Решетов И.В., Сергеева Н.С., Васильев А.В., Баринов С.М., Терских В.В., Свиридова И.К., Комлев В.С., Кирсанова В.А., **Роговая О.С.**, Филюшин М.М. Клеточные технологии в замещении тканевых дефектов в онкологии // Вестник РАМН. 2006. №6, С.34-38.
6. Попова (Гладских) О.П., Федоров Д.Н., Ходжабемян Г.В., Макаров П.В., **Роговая О.С.**, Васильев А.В. Иммуноморфологическое изучение динамики репарации глубоких ожоговых дефектов роговицы после трансплантации стромального эквивалента // Архив патологии. 2006. № 2. С.24-28.
7. Швецова Е.В., **Роговая О.С.**, Киселев И.В., Потекаев Н.Н., Васильев А.В., Ткаченко С.Б. Модели для исследования кожи. Свиная кожа, как адекватная модель исследования восстановительных процессов в коже человека // Клиническая дерматология и венерология. 2006. № 4. С. 47-50.
8. Швецова Е. В., **Роговая О.С.**, Ткаченко С.Б., Киселев И.В., Васильев А.В., Терских В.В. Контрактильная способность фибробластов различного происхождения в модели живого эквивалента дермы // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2008. №2. С:146-150
9. **Роговая О.С.**, Васильев А.В., Файзулин А.К., Демин Н.В. Применение клеточных технологий для реконструкции уретры в детской хирургии// Андрология и генитальная хирургия. 2009. №4. С:36-39
10. Миланов Н.О., Адамян Р.Т., **Роговая О.С.**, Васильев А.В., Жидков И.Л., Липский, К.Б. Гуляев, И.В. Суворов Н.А., Тагабилев Д.Г., Киселев И.В., Терских В.В. Тканевый эквивалент для устранения протяженных дефектов уретры // Вестник РАМН. 2011. №7. С. 21-25
11. **Роговая О.С.**, Киселева Е.В., Дашинимаев Э.Б., Щипицына В.С., Файзуллин Р.Р., Васильев А.В., Суханов Ю.В., Терских В.В. Исследование влияния перфторуглерода (ПФУ) в составе живого эквивалента кожи (ЖЭК) на процесс регенерации кожных ран в модели лабораторных животных // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2011. №5. С. 169-173.

По материалам диссертации было защищено 5 патентов РФ:

1. Способ реконструкции гортани // Чиссов В.И., Решетов И.В., Трофимов Е.И., Васильев А.В., **Роговая О.С.**, Батухтина Е.В. Патент № 2197906 от 11.10.2001г.

2. Структура материала для имплантации на гортани // Чиссов В.И., Терских В.В., Васильев А.В., Решетов И.В., Батухтина Е.В., **Роговая О.С.** // Свидетельство на полезную модель № 2003105022/20(005941) от 26.02.2003

3. Материал для имплантации в ткани пародонта // Пожарицкая М.М., Васильев А.В., Руднева Е.В., Киселев И.В., Терских В.В., Попкова Н.А., **Роговая О.С.** Патент №2004119302/22(021723) от 01.07.2004

4. Биологический активный комплекс для органогенеза // Терских В.В., Киселев И.В., Смирнов С.В., **Роговая О.С.**, Васильев А.В., №2003104343 от 14.02.2003

5. Клеточный имплантат для восстановления дефектов кожного покрова // Терских В.В., Васильев А.В., **Роговая О.С.**, Киселева Е.В., Дашинимаев Э.Б., Ивашкин А.Н. №106528 от 29.12.2010

*Благодарю за помощь в работе
Андрея Валентиновича Васильева
Василия Васильевича Терских
Екатерину Андреевну Воротеляк
Екатерину Владимировну Киселёву
Эрдема Баировича Дашинимаева
Алексея Владимировича Волкова
Элину Сергеевну Чермных
Елену Ивановну Домарацкую
Татьяну Алексеевну Тортунову*

*И других сотрудников Института биологии развития им. Н.К. Кольцова
РАН;*

*Благодарю за помощь в подготовке материалов диссертации к защите
оппонентов д.м.н. Николая Петровича Омеляненко,
к.б.н. Ольгу Петровну Ильинскую
и сотрудников Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.*