

УДК 547.995.12:612.014:616-089.843

## КОЛЛАГЕН-ХИТОЗАНОВАЯ МАТРИЦА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В КЛЕТКИ НЕЙРОНАЛЬНОЙ ПРИРОДЫ. МАРКЕРНЫЙ АНАЛИЗ

**Большаков И.Н., Еремеев А.В., Шеина Ю.И., Полстяной А.М., Карапетян А.М., Игнатов А.В., Кривопапов В.А., Каптюк Г.И.**

*ГОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого», Красноярск, e-mail: bol.bol@mail.ru;  
Красноярский центр репродуктивной медицины, Красноярск;  
Институт биофизики СО РАН, Академгородок, Красноярск;  
Институт общей генетики им. Вавилова РАН, Москва*

В работе использован базовый полиионный комплекс, состоящий из нано-микроструктурированного аскорбата хитозана с молекулярной массой 695 kDa и степенью деацетилирования 98%, содержащий солевые анионные формы хондроитинсерной кислоты, гиалуроновой кислоты, гепарин, сывороточный фактор роста крупного рогатого скота «адгелон», кондиционированную среду от мышинных эмбриональных нейрональных клеток, нейрональную добавку N2, ретиноевую кислоту. Результаты показали, что присутствие в матрицах кондиционированной среды, полученной от эмбриональных нейрональных клеток, или среды с добавлением N2 компонента, стимулирует после 5-7 дня культивирования эмбриональные стволовые клетки к экспрессии маркеров, характерных для нейрональных клеток (нейрофиламента, нестина, глиального фибриллярного кислого протеина), и формирует их морфологию.

**Ключевые слова:** коллаген-хитозановая матрица, эмбриональные стволовые клетки, нейрональное микроокружение, предшественники нейрональных клеток, нестин, нейрофиламент, глиальный фибриллярный кислый протеин

## THE COLLAGEN-CHITOSAN MATRIX FOR CULTIVATION AND DIFFERENTIATION OF EMBRYONIC STEM CELLS IN THE NEURONAL NATURE CELLS. MARKERS INVESTIGATION

**Bolshakov I.N., Ereemeev A.V., Sheina J.I., Polstjanoi A.M., Karapetjan A.M., Ignatov A.V., Krivopalov B.A., Kaptjuk G.I.**

*Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky,  
Krasnoyarsk, e-mail: bol.bol@mail.ru;  
Centre of reproductive medicine, Krasnoyarsk;  
Biophysics Institute of Siberian Division Russian Academy of Science, Krasnoyarsk;  
N.I. Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Science, Moscow*

In work is used the base polyionic complex – nano-microstructured chitosan ascorbate with molecular weight 695 kDa and deacetylation degree of 98% containing salt forms of chondroitin sulfate acid, hyaluronic acid, heparin, calf serum factor «adgelon», conditioned from mouse embryonic neuronal stem cells medium, neuronal supplement N2, retinoic acid. The results have showed, that the presence at matrixes of the conditioned medium or environment with addition supplement N2 stimulates after 5-7 days of cultivation the embryonic stem cells to expression markers of neuronal progenitors cells (neurofilament, nestin, GFAP) and forms their morphology.

**Keywords:** collagen-chitosan matrix, embryonic stem cells, neuronal microenvironment, progenitors neuronal cells, nestin, neurofilament, glial fibrillar acid protein (GFAP)

При решении вопросов первичной хирургической обработки осложненной позвоночно-спинальной травмы, как правило, не ставятся задачи реконструкции спинного мозга, выполняется реконструкция позвонков и решаются задачи стабилизации позвоночника относительно спинного мозга. При постановке задачи реконструкции спинного мозга при его повреждении используют аутологичные стволовые клетки человека, выделенные и культивированные из костного мозга, жировой ткани, периферической крови и других мест дислокации. При этом имплантация клеток осуществляется либо в свободном виде в качестве инъекции в место дислокации травмы спин-

ного мозга или субарахноидально, либо клетки помещаются в гидрогелевую основу и в таком виде вводятся в зону травмы после оперативного доступа через костные элементы позвоночника и обнажения спинного мозга. Результаты таких манипуляций малоудовлетворительны, характеризуются далеко не полной положительной неврологической динамикой, слабым морфологическим контролем реконструкции в виду невозможности использования морфологического материала для анализа. Проблема состоит в отсутствии на сегодняшний день эффективных сертифицированных методов реконструкции миеломалационных очагов при спинальной травме с восстановлением

анатомической и функциональной целостности проводящих путей. Предлагаемые методы реконструкции предусматривают использование нейронов, воспитанных в питательных средах, в том числе полученных из эмбриональных стволовых клеток человека (ЭСКч). Проблема состоит в том, что прямое использование ЭСК или их недифференцированных дериватов приводит к образованию тератом. Использование дифференцированных дериватов недостаточно эффективно по причине их низкой массы, непродолжительной жизнеспособности, большой потери при трансляции с подложек в дислокацию травмы, поскольку технология предусматривает элюцию клеток с помощью ферментов, а это существенно усиливает запрограммированную клеточную гибель. Только эффективные биодegradируемые матрицы, создающие благоприятные условия для культивирования и дифференцировки ЭСКч, могут сделать подвижки в этом вопросе.

**Примечание.** Выполнение технического задания и этапов календарного плана проекта по программе «СТАРТ» ГФС РФФИ НТС №6746р/9167 от 10.04.2009 г. привело к получению 4 вариантов нейрональных матриц, способных поддерживать длительное время эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) человека и животных (мышей и крыс) в полной питательной среде, переводить их в состояние дифференцировки с получением на 5-е сутки клеток, выставляющих на своей мембране маркеры, характерные для нейрональных (нейрофиламент, MBP, GFAP).

Предлагаемые в настоящей работе подходы к реконструкции спинного мозга при экспериментальной позвоночно-спинальной травме основаны на использовании современных биодegradируемых полисахаридных матриц, содержащих необходимое микроокружение, включая продукты роста и дифференцировки стволовых и нейрональных клеток в предшественники нейрональных клеток для реконструкции спинного мозга с целью восстановления его моторной и сенсорной функций. Сравнение потребительских свойств предлагаемой клеточной матрицы с известными аналогами показало явные преимущества первой в силу отсутствия матриц, удовлетворяющих поставленным задачам. Они заключаются в следующем: высокая биосовместимость, биодegradация, нетоксичность, система переноса информации, создание строгой ориентации волокон инжениринговой ткани при имплантации благодаря жесткой линейной структуре хитозана, регуляция синтеза коллагена, стимуляция раз-

множения пассированных клеток любого генеза, размножение клеток сосудистого эндотелия, новообразование микрососудов, восстановление межклеточного субстрата. Имплантация такой матрицы может быть осуществлена открытым оперативным способом в диастаз спинного мозга.

В Российской Федерации отсутствует технология по получению трехмерных матриц, способствующих направленной дифференцировке с целью использования их для клеточной терапии пациентов. Это подтверждает необходимость создания такой технологии, роль которой заключалась бы в получении клеточных дериватов ЭСК для последующей клеточной терапии, особенно в областях медицины, где бессильны традиционные методы и средства лечения.

**Цель исследования** – использование коллаген-хитозановой подложки для культивирования и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток в клетки нейрональной природы в условиях *in vitro*, проведение маркерного анализа и подтверждение специфичности микроокружения матрицы.

#### Материалы и методы исследования

**Получение нейрональной матрицы.** Для создания нейрональных матриц был использован базовый полиионный комплекс, состоящий из нано-микроструктурированного аскорбата хитозана с молекулярной массой 695 kDa и степенью дезацетилирования 98%, при содержании на 1 г сухого хитозана аскорбиновой кислоты 1,8 г, включающий солевые анионные формы хондроитинсерной (200 мг/г), гиалуроновой (100 мг/г) кислот и гепарина (5 мг/г), сывороточного фактора роста крупного рогатого скота «адгелон» (110 мкг/г). При подготовке хитозана производились следующие манипуляции:

а) 2–3-кратная очистка хитозана: производства «Восток-Бор-1, г. Дальнегорск, растворение в 0,5% соляной кислоте, фильтрование через стеклянные фильтры №2 и №3, пересадение геля в 0,15 М раствор гидроокиси натрия;

б) трехкратная отмывка осадка в бидистиллированной воде путем центрифугирования на центрифуге с горизонтальным ротором;

в) повторная очистка хитозана: растворение осадка в 0,5% растворе соляной кислоты, пересадение в этиловый спирт (ректификат) в соотношении 1:5, промывка осадка уксусом (чда) через стеклянные фильтры, промывка осадка эфиром (для наркоза) через стеклянные фильтры, высушивание осадка на воздухе;

г) модификация (активация) хитозана (введение активных функциональных групп – дополнительное протонирование первичных аминогрупп): растворение полимера в растворе аскорбиновой кислоты в соотношении 1:1,2–1:1,5 (аскорбат хитозана).

Включение в состав коллаген-хитозанового геля гепарина и сывороточного фактора роста крупного рогатого скота «адгелон» повысило функциональную активность клеток. Было предположено, что культивирование на коллаген-хитозановых матрицах ЭСК

крысы или человека в кондиционированной среде от мышечных эмбриональных нейрональных клеток при добавлении в среду добавки N2 или B27 (нейрональная добавка), а также ретиноевой кислоты может приводить к нейрональной дифференцировке.

Варианты полиионных комплексов.

А. К базовому полиионному комплексу добавляли кондиционированную питательную среду, полученную после культивирования эмбриональных нейрональных клеток мышей.

Б. К базовому полиионному комплексу добавляли кондиционированную питательную среду, полученную после культивирования эмбриональных аллогенных стволовых клеток крыс из жировой ткани животных (ООО «Биоимплант»).

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) получали из бластоцист путем вымывания матки средой DMEM наркотизированного эфиром животного на 4–5-й день после копуляции. Получение внутренней клеточной массы (ВКМ) и дальнейшую экспансию колоний ЭСК проводили согласно протоколу [3, 4].

**Получение кондиционированной среды от культивированных эмбриональных нейрональных клеток.** Культивирование клеток проводили в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 100 мкг/мл сульфата, 1 мМ L-глутамин во флаконах Corning, покрытых желатином. В экспериментах по получению кондиционированной среды от стволовых эмбриональных нейрональных клеток крысы (клетки из головного мозга 17–20-дневных фетусов беспородных крыс после его диспергирования и обработки 0,5% раствором коллагеназы в течение 30 минут в среде DMEM при 37°C) для наращивания клеточной биомассы использовали среду DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 100 мкг/мл канамицина сульфата, 1 мМ L-глутамин, в которую дополнительно добавляли еще 4 нг/мл основного фактора роста фибробластов (bFGF), 1 мМ раствора незаменимых аминокислот (Sigma-Aldrich). Наращивание клеточной биомассы при 37°C проводили во флаконах, покрытых 0,1%-м раствором желатина. Сбор среды проводили ежедневно. Состояние клеток оценивали микроскопически. После пересева с помощью 0,5% раствора коллагеназы на матрицы клетки культивировали в среде с добавлением агента нейрональной дифференцировки – N2 компонента согласно инструкции производителя. Среду собирали, фильтровали через 0,22 мкм ацетат-целлюлозный фильтр и в дальнейшем использовали в качестве кондиционированной среды.

**Получение губчатой конструкции трансплантата.** В дальнейшем осуществляли ковалентное соединение полученной полисахаридной гелевой конструкции с бычьим коллагеновым гелем в соотношении 1:3, лиофильное высушивание глубоко замороженных образцов в установке FC500. Для этого смеси разливали по поддонам из дюраля, толщиной слоя 2 мм, замораживали до –20 °C и затем лиофилизировали при давлении 10<sup>-5</sup> Па в течение 8 часов, продукт упаковывали и стерилизовали электронно-лучевым способом (опытные партии нейрональных матриц произведены в ООО «Коллахит» г. Железнодорожск Красноярского края, ген. директор предприятия А.Н. Сапожников). Указанные манипуляции позволили получить нейрональную матрицу размерами 50×50×2 мм, пригодную не только для культивирования и дифференцировки in vitro эмбриональных ство-

ловых клеток в предшественники нейронов и олигодендроцитов животных и человека, но и для прямой трансплантации в разрыв спинного мозга при экспериментальной спинальной травме.

**Культивирование и дифференцировка эмбриональных стволовых клеток. Маркерный анализ.** При использовании губчатых матриц последние предварительно замачивали в стерильном бикарбонатном буфере для понижения их кислотных свойств. После фазы нейтрализации покрытия промывали трижды стерильным фосфатным буфером Дульбекко (Биолот), помещали во флаконы, а сверху осторожно насливали на них суспензию клеток в среде со всеми компонентами в зависимости от типа клеток.

**Эмбриональные стволовые клетки.** В экспериментах по культивированию плюрипотентных клеток на раневых покрытиях первоначально для наращивания биомассы использовали основную среду коDMEM с добавлением 10% SR (заменитель сыворотки), 100 мкг/мл канамицина сульфата, 1 мМ L-глутамин, 4 нг/мл основного фактора роста фибробластов (bFGF), 1 мМ раствор незаменимых аминокислот и ингибитора Rock киназы 5 нг/мл. Наращивание клеточной биомассы проводили во флаконах, покрытых 0,1%-м раствором желатина. Смену среды проводили ежедневно. Состояние колоний оценивали визуально с помощью микроскопа AxioVert 200. Для оценки поддержания состояния плюрипотентности проводили иммуноцитохимический анализ экспрессии маркеров – oct4, TRA-1-60, SSEA4, cd30. Для дифференцировки эмбриональных клеток в нейрональном направлении их высевали во флаконы в среду со всеми добавками, кроме bFGF, с добавлением ретиноевой кислоты и N2 компонента.

**Иммуноцитохимический контроль нейрональной дифференцировки стволовых клеток.** Каждые трое суток проводилась формальдегидная фиксация с последующей иммуноцитохимией клеток с помощью антител (все от Abcam, USA) против GFAP – глиального фибриллярного кислого белка (маркер астроцитов), нейрофиламента и нестина. Выявление маркеров осуществляли методом согласно инструкции производителя антител. Ядра клеток окрашивали DAPI (0,1 мкг/мл) 10 мин. Для получения изображений и анализа использовали флуоресцентный микроскоп «Olympus BX-51» и программные продукты «Applied Spectral Imaging» (USA). Для анализа каждого маркера эксперимент повторяли трижды, наращивая по три флакона, в каждом из которых случайным образом выделяли 6 зон для проведения иммуноцитохимии. Микроскопирование проводили по каждой зоне в 30 полях зрения.

### Результаты исследования и их обсуждение

**Поддержание плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток (ЭСК).** Ранее было показано, что культивирование ЭСК на полученных подложках может поддерживать в течение 7 суток нормальное морфологическое состояние колоний плюрипотентных клеток крыс, характерное и для ЭСК человека. Иммуноцитохимическое исследование маркеров плюрипотентности показало в ЭСК, культивируемых на матрице, что клетки экспрессируют ядерные белки oct-4, TRA1-60, cd30 и антиген SSEA4 [2].

Предложенные режимы культивирования эмбриональных стволовых клеток крыс после соответствующей подготовки биодegradуемых матриц позволяют повысить качество и стабильность культивирования, исключить на конечном этапе получения клеточной матрицы обработку клеток ферментами в процессе пассирования при смене питательной среды, повысить прикрепление клеток к поверхности матрицы, а следовательно, предупредить их потерю при переосеве на питательные среды благодаря присутствию в ней хитозанового биополимера, обеспечить получение клеточной матрицы, пригодной для прямой трансплантации.

Известны различные протоколы получения дифференцированных дериватов нейрональных клеток из стволовых. В этих протоколах для переноса клеток с культуральных флаконов используют растворы энзимов (трипсина, коллагеназы, деспазы и т.п.). Эти манипуляции приводят к увеличению уровня апоптоза, клеточной гибели, повреждению поверхностных клеточных рецепторов [1]. Возрастает вероятность контаминации и усложняется процедура трансплантации. В этой связи использование матриц для культивирования и направленной дифференцировки устраняет вышеуказанные проблемы, однако необходимость в использовании дифференцировочных факторов остается. Использование для этой цели рекомбинантных факторов роста и морфогенов при до-

бавлении в матрицу значительно увеличивает ее стоимость, усиливает вероятность иммунного ответа на чужеродный белок. Использование кондиционированной клетками среды в качестве добавки к матрице приводит к устранению вышеуказанных проблем и дает в руки исследователей подложки для культивирования клеток разных типов, в том числе и стволовых. Добавление в базовый полиионный коллаген-хитозановый комплекс кондиционированной среды от эмбриональных нейрональных клеток мышей или кондиционированной среды от культивируемых предшественников нейрональных клеток крыс, а также компонента N2 и ретиноевой кислоты приводило к нейрональной дифференцировке как ЭСК крысы, так и ЭСК человека. Оценивалась возможность таких клеток дифференцироваться в нейрональном направлении.

Анализ экспрессии одного из нейрональных маркеров – нейрофиламента показал, что на первые сутки отсутствуют сигналы флюоресценции по указанному маркеру. На 5-е сутки при культивировании ЭСК в кондиционированной эмбриональными нейрональными клетками среде обнаруживается экспрессия нейрофиламента, а на 7-е сутки – и в клетках, культивируемых в среде с добавлением N2 компонента. Аналогичная картина наблюдалась и в случае определения маркеров GFAP и нестина (рис. 1, 2, 3).

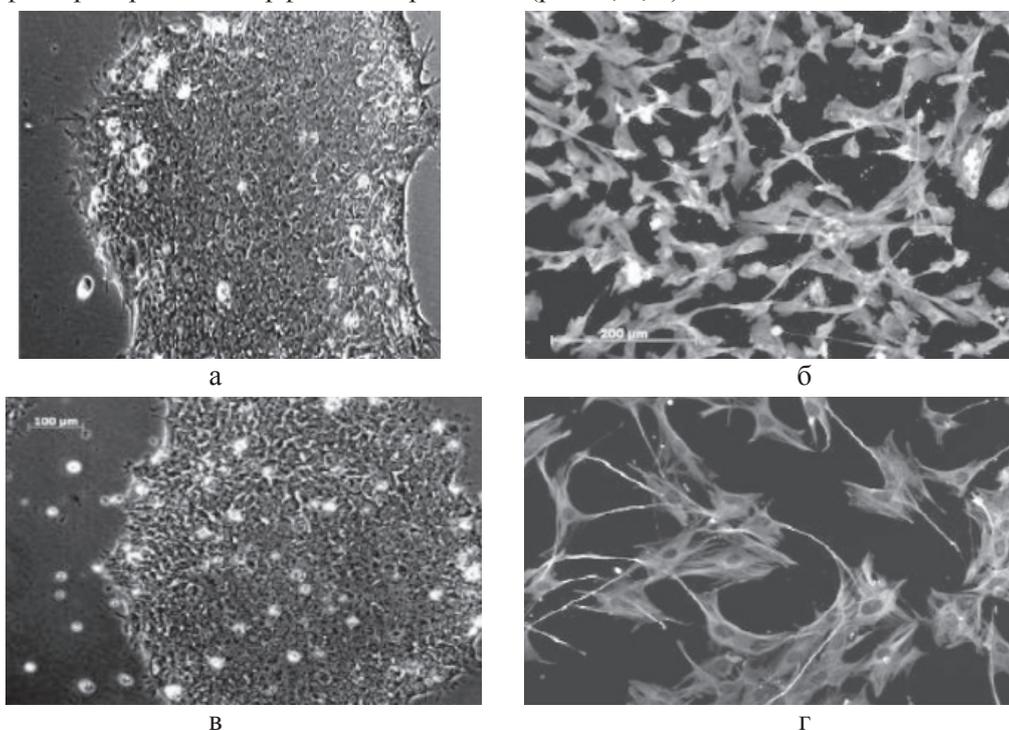


Рис. 1. Фазово-контрастная микроскопия культивируемых ЭСК человека, пассированных на коллаген-хитозановых матрицах в течение 14 дней в присутствии кондиционированной среды: а – 1-й день; б – 14-й день; или при добавлении N2 компонента: в – 1-й день; г – 14-й день

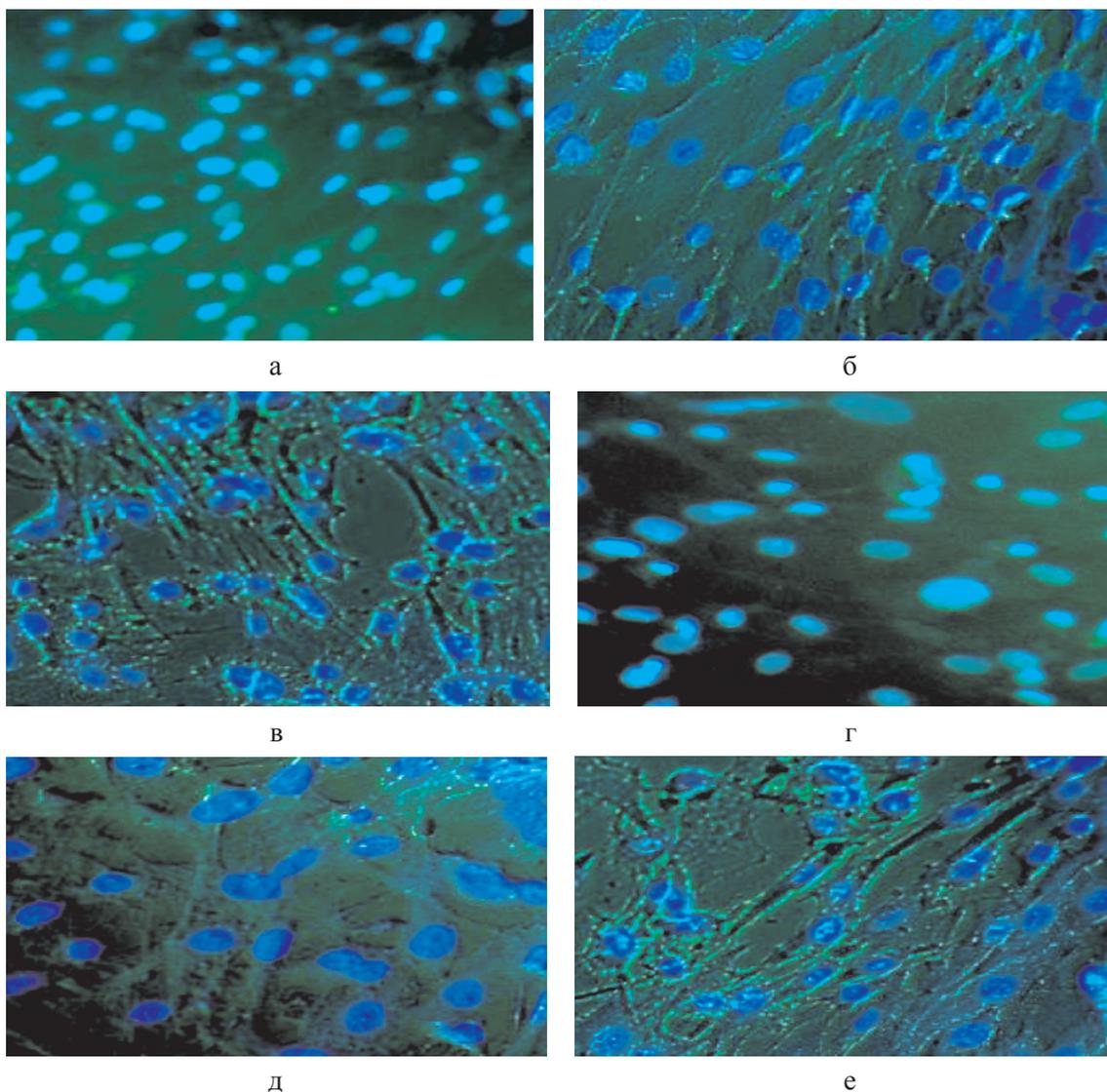
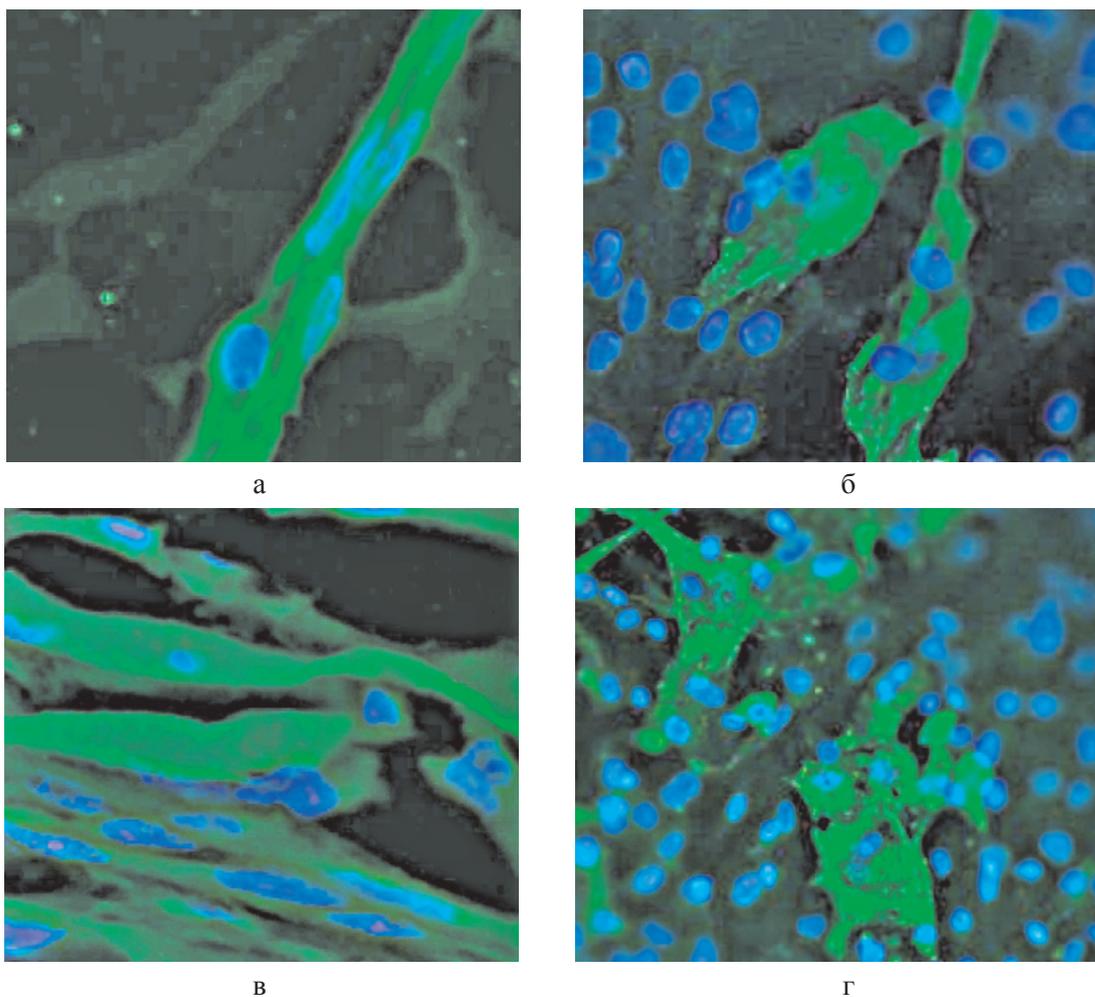


Рис. 2. Динамика экспрессии нейрофиламента на 1, 7 и 14-е сутки в клетках, культивируемых на коллаген-хитозановом комплексе в присутствии кондиционированной среды (а, б, в) или при добавлении N2 комплекса (г, д, е). 1 сутки – отсутствие экспрессии маркера: а – 1 сутки; б – 7 сутки; в – 14 сутки; г – 1 сутки; д – 7 сутки; е – 14 сутки

### Заключение

Таким образом, результаты показали, что присутствие в матрицах кондиционированной среды, полученной после культивирования эмбриональных нейрональных клеток или среды с добавлением N2 компонента, на 14-й день стимулирует ЭСК к экспрессии маркеров, характерных для нейрональных клеток, и формирует их морфологию.

Исследования выполнены при поддержке гранта ГОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ СР РФ (2009), грантов государственного фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (проект №6746р/9167 от 10.04.2009 г. и проект № 8775 р/13993 от 11.01.2011 г.).



*Рис. 3. Иммуноцитохимия ЭСК, культивируемых в кондиционированной эмбриональными нейрональными клетками среде (а, б) или в среде с добавлением N2 компонента (в, г). Клетки фиксированы 1%-м формальдегидом в фосфатном буфере. Клетки обрабатывали антителами против нестина, глияльного фибриллярного кислого белка, с последующим мечением вторичными антителами и детекцией флюоресценции: а – нестин; б – GFAP; в – нестин; г – GFAP*

**Список литературы**

1. Жизнеспособность и функции плюрипотентных клеток и фибробластов дермально-эпидермального слоя животных в условиях их культивирования на коллаген-хитозановых покрытиях / А.В. Еремеев, А.В. Светлаков, И.Н. Большаков, А.А. Власов, В.А. Арапова // Сибирское медицинское обозрение. – 2008. – №6(54). – С. 24–27.

2. Функции культивируемых эмбриональных клеток на коллаген-хитозановой матрице / А.В. Еремеев, А.В. Светлаков, И.Н. Большаков, А.А. Власов, В.А. Арапова // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т.IV, № 2. – С. 55–62.

3. Hee Sun Kima. Methods for Derivation of Human Embryonic Stem Cells // Stem Cells. – 2005. – Vol. 23, № 9. – P. 1228–1233.

4. Thomson J.A. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // Science. – 1998. – Vol. 282, №5391. – P. 1145–1147.

**Рецензенты:**

Манчук В.Т., д.м.н., профессор, директор НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, г. Красноярск;

Савченко А.А., д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, г. Красноярск.

Работа поступила в редакцию 17.10.2011.