

ПОДХОД К ВЫБОРУ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА БИМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОЖИ

DOI: 10.17691/stm2019.11.4.04

УДК 57.086.83:57.017.35:612.79

Поступила 6.08.2019 г.



Д.Я. Алейник, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории регенеративной медицины НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;

Е.В. Загайнова, д.м.н., профессор РАН, директор НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;

М.Н. Егорихина, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории регенеративной медицины НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;

И.Н. Чарыкова, врач лаборатории биотехнологий Университетской клиники¹;

О.С. Роговая, к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной биологии²; научный сотрудник отдела регенеративной медицины НИИ трансляционной медицины³;

Ю.П. Рубцова, к.б.н., научный сотрудник лаборатории регенеративной медицины НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;

А.Н. Попова, аспирант кафедры эмбриологии биологического факультета⁴; инженер НИИ трансляционной медицины³;

Е.А. Воротеляк, д.б.н., член-корреспондент РАН, зав. лабораторией клеточной биологии²; зав. отделом регенеративной медицины НИИ трансляционной медицины³;

доцент кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета⁴

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Н. Новгород, 603005;

²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334;

³Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, ул. Островитянова, 1, Москва, 117997;

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991

Цель исследования — разработать подход к выбору методов оценки качества клеточного компонента биомедицинских клеточных продуктов (БМКП), предназначенных для замещения дефектов кожи.

Материалы и методы. Исследованы БМКП-1 — дермальный эквивалент кожи (разработка Института биологии развития РАН) и БМКП-2 — эквивалент кожи (разработка Приволжского исследовательского медицинского университета). Клеточный компонент обоих БМКП — мезенхимальные стволовые клетки (МСК) жировой ткани человека.

Проводили подсчет и оценку жизнеспособности клеток в суспензии клеток и в структуре БМКП. Характеристики клеток в структуре БМКП без разрушения продукта определяли методами флуоресцентной микроскопии с использованием витальных красителей для окраски цитоплазмы и Hoechst 3334 (BD Pharmingen, США) — для ядер (имиджер Cyation 5; BioTek, США). Функциональную активность МСК оценивали по содержанию VEGF-A в ростовой среде методом ИФА. Фенотип МСК определяли методом цитометрии.

Результаты. С помощью предложенных методов было установлено, что МСК в БМКП сохраняют типичную морфологию и жизнеспособность. На поверхности БМКП-1 клетки распределяются в виде колоний, в структуре БМКП-2 — по всему объему матрицы. Количество клеток на БМКП-1 зависит от условий транспортировки, в структуре БМКП-2 — от сроков культивирования. Секреторная активность МСК сохраняется в течение всего периода наблюдения.

Экспрессия CD90 в процессе функционирования МСК в структуре обоих БМКП снижается и восстанавливается после выделения и культивирования клеток на пластике.

Заключение. Предложенный подход к выбору методов исследования позволил выявить специфические особенности оценки качества БМКП с учетом характеристики производства и условий транспортировки, связанных с клеточной природой продуктов и особенностями структуры неклеточного компонента. При отсутствии оптической проницаемости и при сложной структуре продукта предпочтительно выбирать методы контроля качества клеточного компонента, обеспечивающие минимальное манипулирование и повреждение агрессивными ферментами.

Ключевые слова: биомедицинский клеточный продукт; мезенхимальные стволовые клетки; дефекты кожи; пролиферация; VEGF-A; фенотипирование; CD90.

Для контактов: Алейник Диана Яковлевна, e-mail: daleynik@yandex.ru

Как цитировать: Aleynik D.Ya., Zagaynova E.V., Egorikhina M.N., Charykova I.N., Rogovaya O.S., Rubtsova Yu.P., Popova A.N., Vorotelyak E.A. Methods for assessing the quality of biomedical cell products for skin replacement. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2019; 11(4): 34–43, <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.4.04>

English

Methods for Assessing the Quality of Biomedical Cell Products for Skin Replacement

D.Ya. Aleynik, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Regenerative Medicine, Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

E.V. Zagaynova, MD, DSc, Professor of the Russian Academy of Sciences, Director of the Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

M.N. Egorikhina, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Regenerative Medicine, Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

I.N. Charykova, Physician, Laboratory of Biotechnology, University Clinic¹;

O.S. Rogovaya, PhD, Researcher, Laboratory of Cell Biology²; Researcher, Department of Regenerative Medicine, Research Institute of Translational Medicine³;

Yu.P. Rubtsova, PhD, Researcher, Laboratory of Regenerative Medicine, Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

A.N. Popova, PhD Student, Department of Embryology, Faculty of Biology⁴; Engineer, Research Institute of Translational Medicine³;

E.A. Vorotelyak, DSc, Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Cell Biology²; Head of the Department of Regenerative Medicine, Research Institute of Translational Medicine³; Associate Professor, Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology⁴

¹Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

²N.K. Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, 26 Vavilova St., Moscow, 119334, Russia;

³Pirogov Russian National Research Medical University, 1 Ostrovitianova St., Moscow, 117997, Russia;

⁴Lomonosov Moscow State University, 1 Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia

The aim of the study was the development of methods to assess the quality of biomedical cell products (BMCPs) intended to replace skin defects.

Materials and Methods. The proposed equivalent of the skin BMCP-1 (developed at the N.K. Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences) and the BMCP-2 equivalent of the skin (developed at the Privolzhsky Research Medical University) were studied. Mesenchymal stem cells (MSCs) from human adipose tissue served as the cellular components of both BMCPs.

MSCs in suspensions and in BMCPs were tested for cell counts and cell viability. The BMCPs were studied in their entirety without destruction using fluorescence microscopy with vital dyes for staining the cytoplasm and Hoechst 3334 (BD Pharmingen, USA) — for nuclei (imager Cytation 5; BioTek, USA).

The MSC function was evaluated by their ability to produce VEGF-A. The MSC phenotype was determined by cytometry.

Results. Using the above methods, we found that MSCs in BMCP retained their original morphology and viability. On the surface of BMCP-1, cells are organized in colonies, whereas in the structure of BMCP-2, they are scattered throughout the matrix. The number of cells in BMCP-1 depends on the transportation conditions; and in the structure of BMCP-2 — on the timing of cultivation. The secretory activity of MSCs is maintained throughout the entire observation period.

While within the BMCP structures, the MSCs had their CD90 expression decreased; it was then restored after the cells were isolated from the products and cultivated on the plastic surface.

Conclusion. The proposed method is feasible for the BMCP quality assessment; it incorporates the requirements for production and transportation based on the characteristics of the cellular and non-cellular components. Given the optical non-transparency and complex physical-chemical structure of the product, it is advisable to select the quality control methods that ensure minimal manipulation and enzymatic damage.

Key words: biomedical cell product; mesenchymal stem cells; skin defects; proliferation; VEGF-A; phenotyping; CD90.

Введение

Биомедицинские клеточные продукты (БМКП) — новый объект российской и международной научной экспертизы качества, безопасности и эффективности

[1]. Актуальность разработки критериев и методов проведения подобных экспертиз возросла в связи с принятием федерального закона «О биомедицинских клеточных продуктах» [2].

На сегодняшний день в Российской Федерации

практический опыт проведения экспертизы качества БМКП отсутствует. Показатели качества БМКП должны соответствовать его спецификации [3]. Набор методов определяется производителем продукта. Некоторые методы экспертизы БМКП, которые могут быть потенциально использованы, описаны в «Методических рекомендациях» под ред. В.А. Ткачука (2017) [4]. Однако в связи с тем, что вновь разрабатываемые БМКП имеют разную физическую структуру, различный химический и клеточный составы, экспертиза их качества нуждается в расширении числа используемых методов оценки.

В настоящем исследовании рассматриваются дерматотропные БМКП. Условно контролируемые параметры таких БМКП можно подразделить на три группы:

1) визуальные характеристики (целостность упаковки, правильность и полноценность маркировки, соответствие внешнего вида самого образца и/или транспортной среды, заявленных в спецификации);

2) параметры, характеризующие стерильность образца и отсутствие контаминации микоплазмами и вирусами;

3) параметры, определяющие характеристики клеточных линий (жизнеспособность клеток, концентрацию, идентичность клеточной линии, функциональную активность клеток).

Для характеристики клеточной составляющей в структуре БМКП необходимо решить вопрос о выделении клеток. Процесс отделения клеток от матрицы, как правило, требует ее разрушения и, следовательно, приводит к потере части клеток, что может отрицательно воздействовать на характеристики оставшихся. Этапы этого процесса могут быть сложными и определяются особенностями матрицы. Оптимальными в этом случае являются методы, позволяющие оценить основные параметры клеток (морфологию, жизнеспособность, концентрацию, фенотип и др.). Методы, использованные для характеристики клеточной составляющей того или иного БМКП непосредственно в его структуре, достаточно сложные и требуют подбора для каждого типа БМКП. Все методы, необходимые для оценки качества конкретного продукта, должны быть разработаны и указаны в его досье.

Цель исследования — разработать подход к выбору методов оценки качества клеточного компонента биологических клеточных продуктов, предназначенных для замещения дефектов кожи, на примере двух российских разработок.

Материалы и методы

В работе использованы образцы двух отечественных БМКП, предназначенных для замещения дефектов кожи и находящихся на этапе доклинических исследований.

БМКП-1 — дермальный эквивалент кожи (разработка Института биологии развития РАН, Москва).

Это продукт, в качестве неклеточного компонента которого использовано медицинское изделие (пластина) G-derm (РУ №РЗН 2015/3135), состоящее из структурированной смеси низкомолекулярной гиалуроновой кислоты (около 90%) и коллагена I типа (около 10%). Клеточный компонент представлен культивированными аллогенными мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) жировой ткани человека, высеянными на поверхность пластины.

БМКП-2 — эквивалент кожи (разработка Приволжского исследовательского медицинского университета, Н. Новгород). Эта конструкция сформирована на основе гидрогелевого скаффолда из естественных биополимеров — фибриногена в составе плазмы крови и коллагена I типа в соотношении 22:1 [5]. Клеточный компонент БМКП-2 представлен культивированными аллогенными МСК жировой ткани человека, введенными в его структуру в процессе формирования.

Клеточная составляющая обоих исследуемых БМКП представлена МСК жировой ткани человека. Эти клетки последние десятилетия привлекают самое пристальное внимание исследователей в качестве наиболее перспективного клеточного материала для регенеративной медицины [6]. Международное общество клеточной терапии (ISCT) определило основные критерии МСК: адгезия к пластику, экспрессия специфических маркеров, способность к дифференцировке в остеобласты, адипоциты и хондробласты в условиях *in vitro* [7]. Все линии МСК, использованные для формирования БМКП, соответствовали критериям, определенным ISCT.

БМКП-1 перед исследованием подвергали транспортировке в течение 12–24 ч в транспортной среде, а БМКП-2 изготавливали непосредственно в лаборатории, проводившей анализ.

Методы подсчета клеток и оценки жизнеспособности клеточной составляющей в суспензии клеток и в структуре БМКП

Определение количества живых клеток в суспензии методом исключаящей окраски трипановым синим. Клетки снимали с поверхности пластины G-derm стандартным способом с помощью 0,25% раствора трипсина в растворе Версена («ПанЭко», Россия), отмывали PBS, центрифугировали и полученную суспензию окрашивали 4% раствором трипанового синего в течение 2–3 мин. За это время погибшие клетки с поврежденной мембраной успевают равномерно окраситься. Количество живых (неокрашенных) и погибших клеток подсчитывали в камере Горяева или с помощью счетчика клеток Countes (Invitrogen, США), одновременно определяя долю погибших клеток.

Определение жизнеспособных клеток в прикрепленной культуре в составе БМКП методом окрашивания витальным флюоресцентным красителем — кальцеином. Для окраски образцов готовили раствор кальцеина

(Calcein AM; BD Pharmingen, США) с концентрацией 1:3000 в PBS. После приготовления раствора его внесли в лунки с образцами, заменяя среду для культивирования. Образцы с раствором флюорохрома инкубировали в течение 30 мин в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C. Затем их несколько раз промывали фосфатным буфером и проводили микроскопическое исследование.

Подсчет тотального количества клеток в прикрепленной культуре в составе БМКП методом подсчета ядер, окрашенных Hoechst 3334. Для подсчета клеток в структуре БМКП-2 был использован оригинальный метод [8]. Он основан на прижизненном окрашивании ядер с применением флюорохрома Hoechst 3334 (BD Pharmingen, США), проведении широкопольной флуоресцентной микроскопии в 10 полях зрения с применением функции Z-stack и последующем подсчете ядер клеток на сшитых Z-stack микрофотоснимках с пересчетом количества клеток на 1 мм³. Количественный анализ проводили на 1, 3 и 6-е сутки с момента формирования БМКП-2 (0-е сутки). Для этого от БМКП-2 в контрольные сроки при помощи шаблона отделяли фрагменты площадью 0,64 см² и переносили их в 24-луночный планшет Black Visiplate TMTС (Wallac Oy, Финляндия). Отделенные фрагменты окрашивали флюорохромом и проводили количественный анализ. После отделения фрагментов образцы БМКП-2 культивировали до 6-х суток в CO₂-инкубаторе в увлажненной среде при содержании CO₂ 5% и температуре 37°C, меняя среду каждые 2–3 дня.

Окрашивание клеток флуоресцентными мембранными красителями для оценки морфологии МСК в составе БМКП. Для прижизненного окрашивания мембран клеток, иммобилизованных в составе БМКП, использовали флюорохром Lipophilic Tracers-DiO DiOC14(3) Hydroxyethanesulfonate (Biotium, США). В соответствии с рекомендациями производителя аликвоты красителя в соотношении 1:2000 вносили в ростовую среду в лунках с образцами БМКП и инкубировали 30–40 мин для равномерного окрашивания клеточных мембран. Затем образцы промывали PBS, проводили визуализацию и анализировали изображения.

Для реализации описанных методов исследования клеток в составе БМКП использовали широкопольную флуоресцентную микроскопию, осуществляемую на многофункциональном имиджере Cytation 5 (BioTek, США) с применением программного обеспечения Gen5 Imedge+. Микрофотографии позволяли документировать и сохранять полученные данные.

Количественное определение VEGF в ростовой среде. Для определения секреторной активности клеточного компонента БМКП исследовали способность МСК, входящих в их состав, продуцировать фактор VEGF-A из семейства факторов роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor — VEGF).

Отбор проб при исследовании БМКП-1 проводи-

ли в течение 3 сут после его формирования, так как использование продукта планировалось в эти сроки. Для этого образцы БМКП-1 размером 1 см² помещали в лунки 24-луночного планшета и через 24, 48 и 72 ч после изготовления (нанесения МСК на матрицу) отбирали по 50 мкл ростовой среды для определения содержания VEGF.

При исследовании БМКП-2 с учетом более позднего расправления клеток внутри матрицы пробы ростовой среды отбирали на 3, 5 и 7-е сутки после формирования. В качестве контроля использовали МСК тех же линий и пассажа, что и клетки в составе исследуемых серий БМКП, высеянные в лунки 24-луночного планшета стандартным способом. Обязательным контролем служили пробы ростовой среды, взятой до начала исследования: для БМКП-1 — пробы среды, в которой инкубировались образцы пластины G-dert без клеток, а для БМКП-2 — среды, в которой инкубировались образцы скаффолда без клеток, в те же сроки. Для количественного определения содержания VEGF-A использовали наборы реагентов фирм Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (США, Канада). Величину оптической плотности регистрировали на анализаторе Sunrise (TECAN, Австрия) с использованием программы Magellan.

Фенотипирование культур МСК жировой ткани. Определение иммунофенотипа МСК жировой ткани, входящих в состав БМКП, проводили на цитофлуориметре BD FACS CANTO II (Becton Dickinson, США). Использовали панель моноклональных антител фирм Becton Coulter и Becton Dickinson (США): CD90 FIC, CD105 PE, 73 PE, 44 FITC, 45 PC5, CD14 PC5, CD HLA-DR PC7, CD34 PC7 с соответствующими изотипическими контролями.

Для определения иммунофенотипа в БМКП-1 клетки снимали с поверхности пластины с помощью раствора трипсина, а гидрогелевый скаффолд БМКП-2 разрушали с помощью ферментативной обработки коллагеназой 1-го типа (Sigma-Aldrich, США).

Статистический анализ. Все эксперименты проводили не менее чем в 3 повторах. Результаты исследований обрабатывали методами непараметрической статистики с применением критерия парных сравнений Вилкоксона при помощи пакета программ Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Методы подсчета клеток и оценки жизнеспособности клеточной составляющей в суспензии клеток и в структуре БМКП

Определение количества живых клеток в суспензии методом исключающей окраски трипановым синим. Количество МСК жировой ткани, снятых с поверхности БМКП-1 в 6 сериях образцов с исходной плотностью посева 20·10³ и 30·10³/см² в различные сроки после формирования (36–48 ч), было различно в разных партиях (табл. 1).

Таблица 1

Количество клеток на образцах БМКП-1

№ эксперимента	Количество образцов	Сроки культивирования, ч	Исходная плотность, тыс./см ²	Общее количество клеток	Плотность клеток на образце, тыс./см ²	Наличие клеток под образцами
1	5	48	30	323	64,6	+
2	2	48	30	127	63,5	+
3	5	48	20	200	40	+
4	8	36	20	202	25,3	+++
5	16	48	20	526	39	+
6	5	36	20	111	22,2	+++



Рис. 1. БМКП-1 после транспортировки:

живые МСК жировой ткани (отмечены стрелками) на поверхности лунки рядом с матрицей G-derm, прошедшие этап транспортировки в запаянной упаковке в течение 24 ч; световая микроскопия, $\times 100$

Анализ полученных данных показал, что количество клеток на образцах зависело от исходной плотности их на единицу площади, от времени, прошедшего после формирования БМКП, от фиксации образца в лунке и от условий транспортировки. Кроме того, на количество клеток на образцах влияла возможность смещения образцов внутри лунок: в тех случаях, когда

образцы в лунке смещались, количество клеток на них уменьшалось. При микроскопии в этих случаях на поверхности лунок под образцами фиксировали значительное количество клеток (рис. 1).

Жизнеспособность выделенных клеток во всех партиях после отделения от поверхности пластины G-derm составляла не менее 98%.

Распределенные на поверхности структурированной матрицы БМКП-1 клетки легко отделялись с помощью трипсинизации и были подсчитаны стандартным способом в камере Горяева с определением доли жизнеспособных клеток. Однако воздействие ферментативной обработки может привести к частичному разрушению клеток, потере и/или повреждению и, как следствие, искажению истинных результатов, что следует учитывать при анализе полученных данных.

Определение жизнеспособных клеток в прикрепленной культуре в составе БМКП методом окрашивания витальным флюоресцентным красителем кальцеином. При визуализации клеток в составе БМКП-1 было отчетливо видно, что клетки на поверхности пластины G-derm распределены неравномерно, в виде колоний (рис. 2, а, б). Клетки характеризовались типичной фибробластоподобной морфологией с выраженными отростками. На разных образцах фиксировали различное количество колоний, формирования монослоя не отмечено. Можно предполагать, что выявленное распределение МСК по поверхности пластины G-derm обусловлено ее сложной топографией.

Подсчет тотального количества клеток в прикрепленной культуре в составе БМКП методом подсчета ядер, окрашенных Hoechst 3334. Меченные флюорохромом

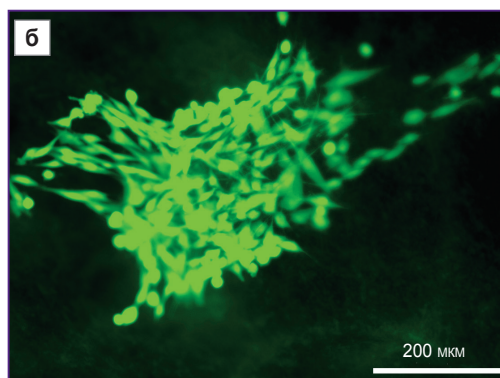
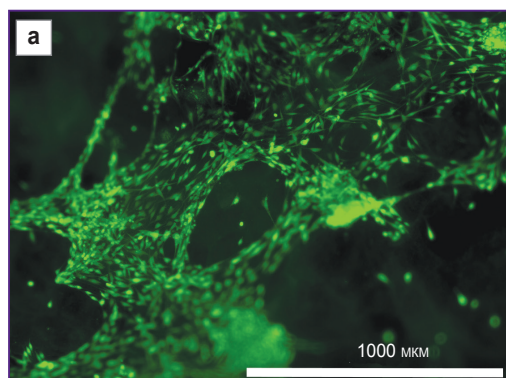


Рис. 2. Визуализация клеток в составе БМКП-1:

живые МСК, окрашенные кальцеином (зеленое окрашивание), на поверхности пластины G-derm; флюоресцентная микроскопия, длина волны возбуждения — 477 нм, длина волны эмиссии — 525 нм; а — $\times 40$; б — $\times 100$

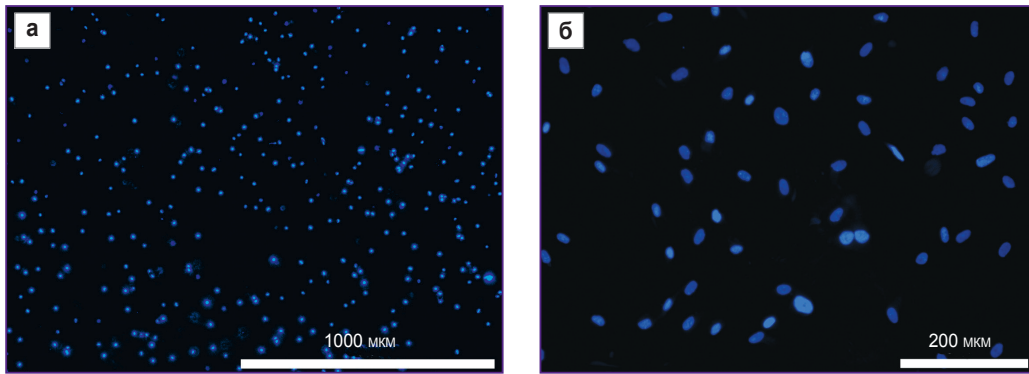


Рис. 3. Сшитые Z-stack микрофотоснимки ядер клеток (синее окрашивание), снятые в толще образцов БМКП-2:

а — Z-stack — 530 мкм, 24 ч культивирования; б — Z-stack 300 мкм, 72 ч культивирования; флюоресцентная микроскопия, флюорохром Hoechst 3334, длина волны возбуждения — 377 нм, длина волны эмиссии — 447 нм; а — $\times 40$; б — $\times 100$

Т а б л и ц а 2

Изменение количества МСК жировой ткани в структуре БМКП-2 в процессе культивирования, мм³ (M \pm m)

Номер культуры МСК жировой ткани	Количество образцов/полей зрения	Время культивирования, ч			Наличие клеток под образцами
		24	72	144	
1	5/50	277,58 \pm 6,08	610,01 \pm 14,21*	1115,54 \pm 26,59**	—
2	5/50	347,0 \pm 10,48	483,37 \pm 7,69*	530,90 \pm 10,37**	—
3	5/50	200,60 \pm 5,02	255,23 \pm 14,48	393,31 \pm 13,64**	—

* — $p < 0,05$, сравнение с 1-ми сутками (24 ч); * — $p < 0,05$, сравнение с 3-ми сутками (72 ч); критерий Вилкоксона.

ядра клеток хорошо визуализировались в структуре БМКП-2 (рис. 3).

Количественный анализ клеток в трех сериях БМКП-2 продемонстрировал статистически значимое увеличение их количества в структуре в процессе культивирования (табл. 2).

Из табл. 2 видно, что количество клеток в структуре БМКП-2 изменялось аналогично во всех трех сериях и не зависело от линии МСК жировой ткани, использованной для формирования конструкта.

Распределение МСК непосредственно в структуре объемного продукта БМКП-2 требует для их выделения полного разрушения неклеточного компонента с использованием агрессивных ферментов (трипсина, коллагеназы) с высокой вероятностью потери и повреждения значительного количества клеток. Применение разработанного метода [8] позволило провести количественный анализ клеточного компонента без этапа разрушения с высокой достоверностью полученных результатов.

Окрашивание клеток флюоресцентными мембранными красителями для оценки морфологии МСК в составе БМКП. Наблюдая за состоянием клеток в составе БМКП-2 с помощью

фазово-контрастной микроскопии (инвертированный микроскоп Leica DMI 3000 B; Leica Biosystems, Германия), через 24 ч после формирования фиксировали расправление клеток с «выбрасыванием» отростков (рис. 4, а). При культивировании БМКП-2 с течением времени наблюдали образование межклеточных контактов. Через 144 ч (6 сут) отмечали формирование клеточной сети с многочисленными межклеточными контактами (рис. 4, б). Использование флюорохрома Lipophilic Tracers-DiO DiOC-14(3) Hydroxyethanesulfonate (зеленый) в эти же сроки подтвердило жизнеспособность исследуемых клеток (рис. 4, в, г), которые достаточно равномерно были распределены в структуре БМКП-2, формируя клеточную сеть. При увеличении 200 (рис. 4, д) хорошо визуализировались веретеновидные, фибробластоподобные клетки с выраженными отростками, образующие межклеточные контакты.

Представленные результаты продемонстрировали сохранение как на поверхности БМКП-1, так и в структуре БМКП-2 жизнеспособности МСК жировой ткани и типичной фибробластоподобной морфологии, позволили отразить своеобразие распределения клеток в структуре различных продуктов.

Мезенхимальные стволовые клетки — субстрат-

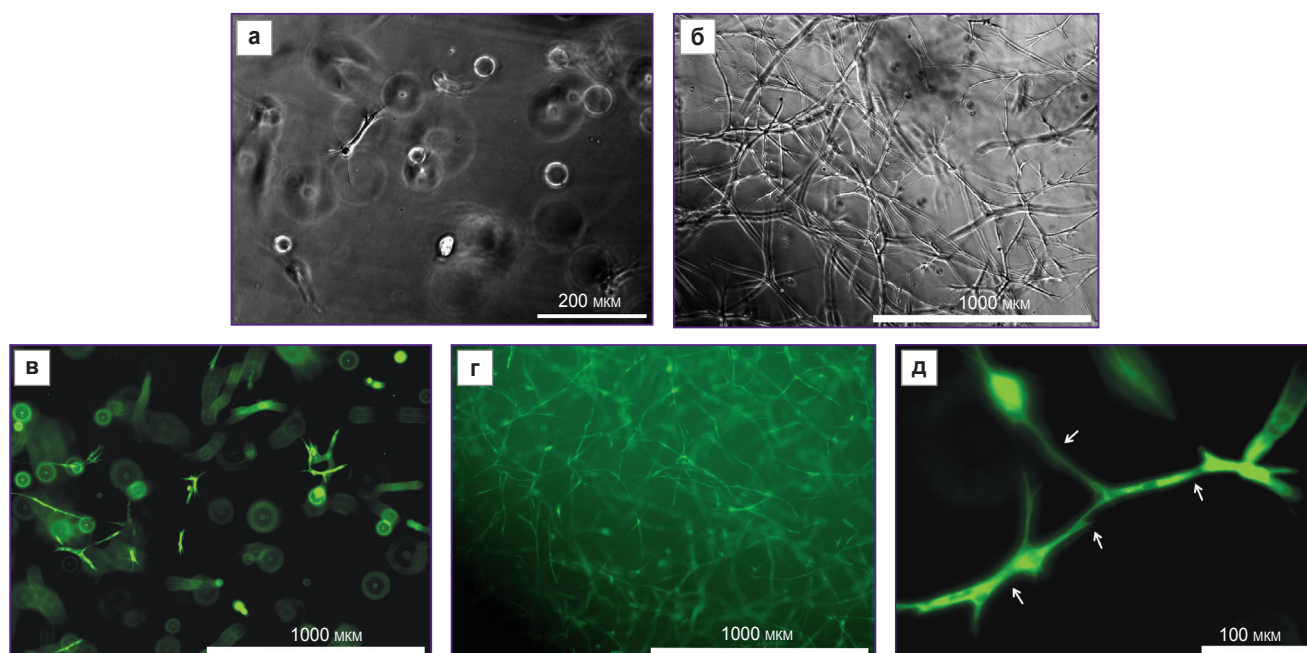


Рис. 4. МСК жировой ткани в структуре БМКП-2:

а, б — фазовый контраст и в–д — флуоресцентная микроскопия; МСК окрашены мембранным красителем Lipophilic Tracers-DiO (зеленый, длина волны возбуждения — 477 нм, длина волны эмиссии — 525 нм); а, в — 24 ч после формирования БМКП-2, МСК жировой ткани расправляются и «выбрасывают» отростки (а — $\times 100$; в — $\times 40$); б, г — 120 ч после формирования БМКП-2, видна сформированная клеточная сеть, $\times 40$; д — 120 ч культивирования, видны веретеновидные клетки, клеточные контакты (отмечены стрелками), $\times 100$

Таблица 3

Динамика изменения содержания VEGF-A в ростовой среде БМКП-1 и на пластике, пг/мл ($M \pm m$)

№ эксперимента	Время культивирования, ч					
	24		48		72	
	G-derm (БМКП-1)	Пластик	G-derm (БМКП-1)	Пластик	G-derm (БМКП-1)	Пластик
1	1497,5 \pm 72,3	1342,2 \pm 100,4	2408,2 \pm 182,0*	1896,0 \pm 79,0*	3395,3 \pm 264,5*	2159,9 \pm 42,8*
2	1532,4 \pm 60,9	488,5 \pm 29,1	2347,3 \pm 82,6*	787,2 \pm 28,2*	3327,8 \pm 122,8* ^v	1056,8 \pm 30,5* [#]
3	375,8 \pm 31,8	177,4 \pm 6,2	593,5 \pm 22,8*	253,2 \pm 8,6*	878,0 \pm 39,7* ^v	334,9 \pm 9,2* [#]

* — $p < 0,05$, сравнение с G-derm, 24 ч; ^v — $p < 0,05$, сравнение с G-derm, 48 ч; + — $p < 0,05$, сравнение с пластиком, 24 ч; [#] — $p < 0,05$, сравнение с пластиком, 48 ч; критерий Вилкоксона.

зависимые и, как все подобные клетки при пересеве, после отделения от матрицы переходят из монослоя в суспензию. При этом клетки меняют свою морфологию, округляясь. Вследствие этого для оценки морфологии клеточного компонента БМКП, в составе которого присутствуют субстрат-зависимые клетки, потребовалось бы после выделения культивировать их на пластике не менее 24 ч. Использование методов флуоресцентной микроскопии с применением витальных красителей обесценило возможность давать комплексную характеристику клеточного компонента БМКП на небольшом фрагменте образца без разрушения его структуры, а также оценивать не только жизнеспособность, но и морфологию клеток и их распределение на поверхности и/или в структуре БМКП.

Определение функциональной (секреторной) активности клеточного компонента в составе БМКП. При анализе трех серий БМКП-1, в состав которых были включены различные линии МСК жировой ткани, несмотря на фиксируемое различие уровня секреторной активности культур, установлено, что во всех экспериментах в ростовой среде в процессе культивирования отмечается достоверное увеличение содержания VEGF-A. При этом уровень протеина при культивировании тех же клеток на пластике практически во всех сериях был статистически значимо ниже ($p < 0,05$, критерий Вилкоксона), чем при культивировании на пластине G-derm (в составе БМКП-1) (табл. 3).

Определение секреторной активности клеточного компонента трех различных партий БМКП-2

Таблица 4

Динамика изменения содержания VEGF-A в ростовой среде БМКП-2, пг/мл

№ эксперимента	Время культивирования, ч (M±m)		
	72	120	168
1	2129,3±22,8	9521,9±794,9*	20754,1±971,7* ^v
2	1874,9±40,6	3661,5±189,9*	6087,7±111,4* ^v
3	1698,9±90,6	2660,9±105,6*	3620,1±107,9* ^v

* — $p < 0,05$, сравнение с 3-ми сутками, 72 ч; ^v — $p < 0,05$, сравнение с 5-ми сутками, 120 ч; критерий Вилкоксона.

продемонстрировало последовательное нарастание уровня VEGF-A в ростовой среде во всех экспериментах начиная с 3-х суток (72 ч) исследования (табл. 4). В контрольных сериях (скаффолд без клеток) изменения содержания VEGF-A не зафиксировано.

Полученные данные демонстрируют, что как в структуре БМКП-1, так и в структуре БМКП-2 МСК жировой ткани сохраняли функциональную активность и секретировали VEGF-A.

VEGF — ключевой проангиогенный фактор [9], который наряду с другими факторами роста синтезируется МСК в условиях как *in vitro*, так и *in vivo* [10, 11]. Наряду со стимуляцией ангиогенеза этот протеин вызывает пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток и увеличивает проницаемость кровеносных сосудов. В условиях культивирования МСК в составе БМКП, неклеточные компоненты которых обладают разными физическими характеристиками, стоит учитывать, что секреция VEGF зависит от жесткости таких компонентов [12]. Следовательно, способность МСК жировой ткани к синтезу этого протеина может служить одной из характеристик выраженности его функциональной — секреторной — активности. Поэтому одним из основных тестов оценки качества БМКП — сохранения функциональной активности МСК, входящих в его состав, — может служить метод количественного определения в ростовой среде VEGF-A. Предлагаемый подход позволил оценить секреторную активность МСК жировой ткани в структуре БМКП без их

разрушения с использованием минимального объема ростовой среды. Следует отметить, что оценка изменений содержания протеинов в ростовой среде может быть использована для характеристики изменений функциональной активности МСК в составе БМКП и после криохранения, которое, скорее всего, потребуется в клинической практике.

Проверка идентичности (подлинности) клеточной линии. Перед формированием БМКП фенотип всех использованных линий МСК соответствовал требованиям ISCT: маркеры мезенхимальных клеток CD90, CD105, CD73, CD44 экспрессировали более 95% клеток при отсутствии экспрессии CD45, CD34, CD14, CD HLA-DR.

Фенотип МСК жировой ткани после выделения с поверхности пластины G-derm (через 48 ч после формирования БМКП-1) менялся (рис. 5).

После выделения из БМКП-1 фиксировали значительное снижение доли клеток CD90⁺ (15–80%) и некоторое уменьшение доли клеток CD73⁺, CD105⁺. При культивировании на пластике в стандартных условиях клеток, выделенных из БМКП-1, их фенотип восстанавливался с высокой долей специфических маркеров CD90 — 99%, CD105 — 99%, CD73 — 99%, CD44 — 99% и низкой долей маркеров CD45 — 0,5%, CD34 — 0, CD HLA-DR — 0.

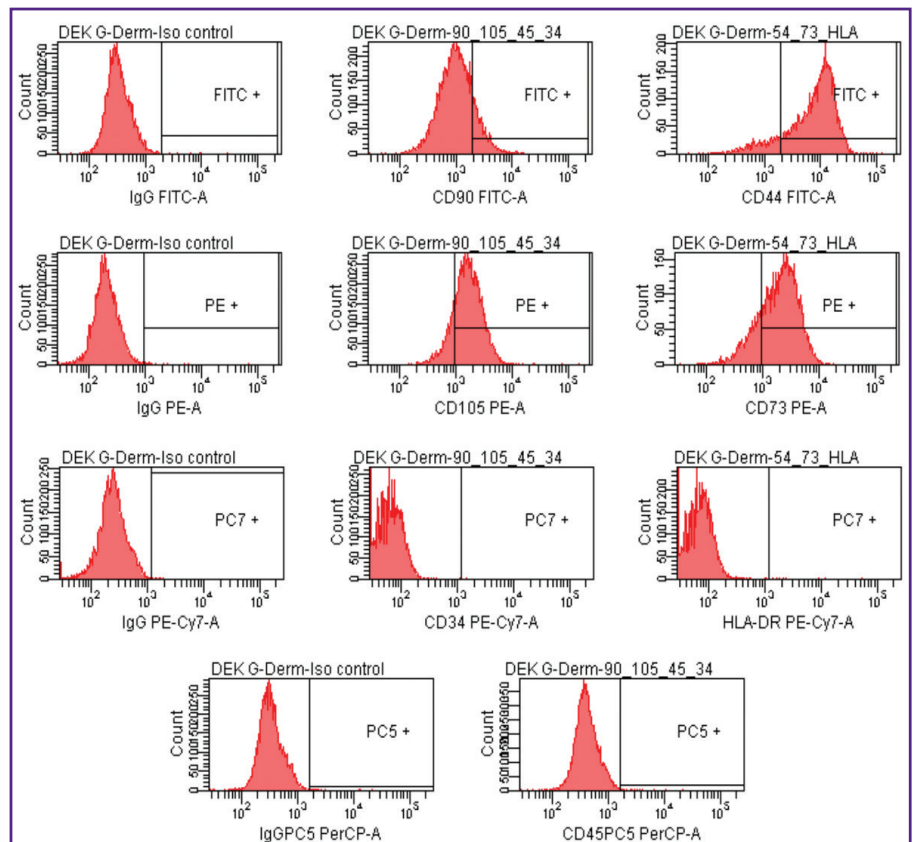


Рис. 5. Иммунофенотип МСК после выделения из БМКП-1:

CD90 — 15,0%; CD105 — 82,5%; CD44 — 86,5%; CD73 — 79,5%; CD45 — 0,3%; CD34 — 0; CD HLA DR — 0,1%

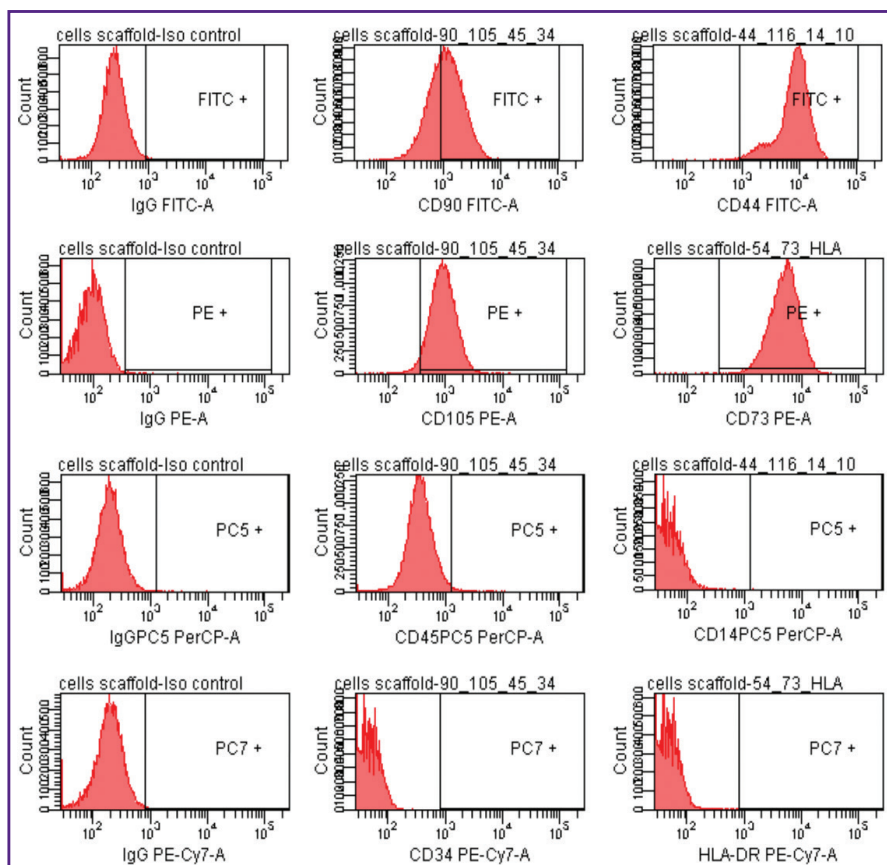


Рис. 6. Иммунофенотип МСК, выделенных из БМКП-2:

CD90 — 60%; CD105 — 98%; CD44 — 100%; CD73 — 100%; CD45 — 0; CD34 — 0; CD14 — 0; CD HLA DR — 0

После функционирования МСК в структуре БМКП-2 и их выделения с помощью обработки коллагеназой фиксировали существенное (от 60 до 80%) снижение доли CD90⁺ клеток без изменения доли CD73⁺ и CD105⁺ клеток (рис. 6).

После культивирования в течение 96 ч на пластике отмечали восстановление доли CD90⁺ клеток до 95–96%.

Можно предположить, что наблюдаемая тенденция снижения доли клеток, экспрессирующих специфические маркеры МСК, на стадии культивирования на плавающих в среде матрицах может являться реакцией МСК на измененные условия культивирования при переходе от 2D-культуры к органотипической 3D-культуре в составе БМКП [13]. В пользу этой гипотезы говорит тот факт, что в течение 1–3 сут после пересева клеток с БМКП на культуральный пластик они возвращаются к своему первоначальному фенотипу.

Следует отметить, что выбор МСК в качестве клеточного компонента при формировании конструкторов для замещения дефектов кожи, подобных представленным в работе, является одним из приоритетных направлений современной регенеративной медицины, а ряд продуктов на основе МСК из различных источников проходит этапы доклинического и клинического

исследований [14, 15]. В связи с этим значительно возрастает актуальность разработки подходов к исследованию МСК, входящих в состав различных конструкторов. Проведенная работа показала, что, несмотря на аналогичное назначение и аналогичный клеточный состав двух БМКП, для характеристики МСК в их структуре требовалось использовать несколько различные подходы.

Заключение

На основе использованного подхода в работе рассмотрены примеры специфических особенностей оценки качества биомедицинских клеточных продуктов с учетом характеристики их производства и условий транспортировки, связанных с клеточной природой продуктов и особенностями структуры не клеточного компонента. Показано, что в случае отсутствия оптической проницаемости и/или сложной структуры не клеточного компонента биомедицинских клеточных продуктов следует предпочтительно выбирать методы контроля качества клеток,

при которых сводится к минимуму манипулирование и повреждение агрессивными ферментами клеточной составляющей продукта.

Финансирование исследования. Работа была выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках ПНИЭР по теме «Разработка технологии производства, хранения и применения биомедицинских клеточных продуктов для лечения ран», уникальный идентификатор проекта RFMEFI61017X0012.

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

1. Пятигорская Н.В., Тулина М.А., Аладышева Ж.И., Береговых В.В. Международные подходы к регулированию препаратов клеточной терапии. Вестник Российской академии медицинских наук 2013; 68(8): 4–8. Pyatigorskaya N.V., Tulina M.A., Aladysheva Zh.I., Beregovykh V.V. International approaches to the regulation of cell therapy products. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk* 2013; 68(8): 4–8.
2. Федеральный закон РФ от 23 июня 2016 г. №180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах». *Federal'nyy zakon RF ot 23 iyunya 2016 g. No.180-FZ "O biomeditsinskikh*

kletochnykh produktakh” [Federal Law of the Russian Federation dated June 23, 2016 No.180-FZ “About biomedical cell products”].

3. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 08.08.2018 г. №512н «Об утверждении Правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами». Приказ Ministerstva zdorookhraneniya Rossiyskoy Federatsii ot 08.08.2018 g. No.512n “Ob utverzhdenii Pravil nadlezhashchey praktiki po rabote s biomeditsinskimi kletochnymi produktami” [Order of the Ministry of Health of the Russian Federation dated August 8, 2018, No.512n “On the approval of the Rules of good practice for working with biomedical cellular products”].

4. Методические рекомендации по проведению доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов. Под ред. Ткачука В.А. М: МГУ им. М.В. Ломоносова; 2017; 302 с. *Metodicheskie rekomendatsii po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy biomeditsinskikh kletochnykh produktov* [Guidelines for preclinical studies of biomedical cell products]. Pod red. Tkachuka V.A. [Tkachuk V.A. (editor)]. Moscow: MGU im. M.V. Lomonosova; 2017; 302 p.

5. Егорихина М.Н., Левин Г.Я., Чарыкова И.Н., Алейник Д.Я., Соснина Л.Н. Способ создания биорезорбируемого клеточного скаффолда на основе фибрина плазмы крови. Патент РФ 2653434. 2018. Egorikhina M.N., Levin G.Ya., Charykova I.N., Aleynik D.Ya., Sosnina L.N. *Method for creating a bioresorbable cellular scaffold based on fibrin of blood plasma*. Patent RU 2653434. 2018.

6. Granero-Molto F., Weis J.A., Longobardi L., Spagnoli A. Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone and cartilage repair. *Expert Opin Biol Ther* 2008; 8(3): 255–268, <https://doi.org/10.1517/14712598.8.3.255>.

7. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315–317, <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.

8. Егорихина М.Н., Чарыкова И.Н., Алейник Д.Я. Способ количественного анализа клеточной составляющей скаффолда. Патент РФ 2675376. 2018. Egorikhina M.N.,

Charykova I.N., Aleynik D.Ya. *Method of quantitative analysis of cellular components of scaffold*. Patent RU 2675376. 2018.

9. Ferrara N., Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18(1): 4–25, <https://doi.org/10.1210/edrv.18.1.0287>.

10. Nakagami H., Maeda K., Morishita R., Iguchi S., Nishikawa T., Takami Y., Kikuchi Y., Saito Y., Tamai K., Ogihara T., Kaneda Y. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(12): 2542–2547, <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000190701.92007.6d>.

11. Rehman J., Traktuev D., Li J., Merfeld-Clauss S., Temm-Grove C.J., Bovenkerk J.E., Pell C.L., Johnstone B.H., Conside R.V., March K.L. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004; 109(10): 1292–1298, <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000121425.42966.f1>.

12. Nasser M., Wu Y., Danaoui Y., Ghosh G. Engineering microenvironments towards harnessing pro-angiogenic potential of mesenchymal stem cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2019; 102: 75–84, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.030>.

13. Reisbig N.A., Hussein H.A., Pinnell E., Bertone A.L. Evaluation of equine synovial-derived extracellular matrix scaffolds seeded with equine synovial-derived mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 2018; 79(1): 124–133, <https://doi.org/10.2460/ajvr.79.1.124>.

14. Lee H.C., An S.G., Lee H.W., Park J.S., Cha K.S., Hong T.J., Park J.H., Lee S.Y., Kim S.P., Kim Y.D., Chung S.W., Bae Y.C., Shin Y.B., Kim J.I., Jung J.S. Safety and effect of adipose tissue-derived stem cell implantation in patients with critical limb ischemia: a pilot study. *Circ J* 2012; 76(7): 1750–1760, <https://doi.org/10.1253/circj.11-1135>.

15. Wu S.C., Pollak R., Frykberg R.G., Zhou W., Karnoub M., Jankovic V., Fischkoff S.A., Chitkara D. Safety and efficacy of intramuscular human placenta-derived mesenchymal stromal-like cells (cenplacel [PDA-002]) in patients who have a diabetic foot ulcer with peripheral arterial disease. *Int Wound J* 2017; 14(5): 823–829, <https://doi.org/10.1111/iwj.12715>.