

ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В БИМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТочНЫХ ПРОДУКТАХ ПРИ ХРАНЕНИИ ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

О. С. Роговая¹✉, Е. В. Алпеева¹, Е. С. Ручко¹, А. В. Еремеев^{1,2}, Е. А. Воротеяк¹

¹ Институт биологии развития имени Н. К. Кольцова Российской академии наук, Москва, Россия

² Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени Ю. М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Биомедицинские клеточные продукты (БМКП) — дермальный эквивалент кожи (ДЭК) и биологический эквивалент кожи (БЭК) — это аллогенные эквиваленты дермы и кожи человека, применяемые для лечения в случаях критической потери кожи. Одним из важных вопросов разработки БМКП является подбор условий хранения, способствующих увеличению срока их годности для расширения возможностей логистики и использования. Целью исследования было определить срок годности ДЭК и БЭК путем оценки морфологии и жизнеспособности клеток в их составе и уровня секреции ими фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в процессе хранения в физиологическом растворе при комнатной температуре. Используя МТТ-тест и окраску витальным красителем, мы установили, что при хранении обоих видов БМКП в физиологическом растворе снижение жизнеспособности и метаболической активности клеток более чем на 50% происходило к 3–4 суткам хранения, причем в ДЭК быстрее, чем в БЭК. Морфология клеток, выделенных из ДЭК и БЭК после 3 суток хранения, оставалась неизменной. После помещения БМКП в физиологический раствор мезенхимные стволовые клетки в их составе продолжали синтезировать VEGF (показано методом ИФА), что может свидетельствовать о сохранении ими необходимой секреторной активности.

Ключевые слова: биомедицинский клеточный продукт, БМКП, эквивалент кожи, умеренная гипотермия, кератиноциты, МСК

Финансирование: исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021.

Вклад авторов: О. С. Роговая, А. В. Еремеев — проведение экспериментов, анализ данных; Е. В. Алпеева — интерпретация данных, анализ литературы; Е. С. Ручко — проведение экспериментов; Е. А. Воротеяк — планирование исследования.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ИБР РАН (протокол № 51 от 09 сентября 2021 г.), проведено с соблюдением принципов Хельсинкской декларации ВМА и ее последующих пересмотров.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Сергеевна Роговая
ул. Вавилова, д. 26, г. Москва, 119334, Россия; rogovaya26f@yandex.ru

Статья получена: 16.12.2022 **Статья принята к печати:** 15.01.2023 **Опубликована онлайн:** 30.01.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.003

SURVIVAL OF HUMAN CELLS IN TISSUE-ENGINEERED CONSTRUCTS STORED AT ROOM TEMPERATURE

Rogovaya OS¹✉, Alpeeva EV¹, Ruchko ES¹, Eremeev AV^{1,2}, Vorotelyak EA¹

¹ Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Tissue-engineered constructs (TECs), the dermal equivalent (DE) and the skin equivalent (SE), are allogenic equivalents of the skin and derm used to treat critical skin loss. Selection of storage conditions that contribute to longer shelf life, thereby expanding the possibilities of logistics and use, is one of the major issues related to the TECs development. The study was aimed to determine the shelf life of the DE and SE TECs stored in normal saline at room temperature by assessing morphology and viability of the cells on their surface, along with the levels of endothelial growth factor (VEGF) secreted by these cells. Using the MTT assay and staining with vital dye, we discovered the following: when TECs of both types were stored in normal saline, the cells viability and metabolic activity decreased by more than 50% by days 3–4 of storage. Furthermore, these decreased faster in DEs than in SEs. Morphology of the cells isolated from DEs and SEs after the 3-day storage remained unchanged. Mesenchymal stem cells on the surface of TECs kept producing VEGF after TECs culture medium was changed for saline solution (confirmed by immunofluorescence assay), which could indicate that the cells retained essential secretory activity.

Keywords: tissue-engineered construct, TEC, skin equivalent, mild hypothermia, keratinocytes, MSCs

Funding: the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Agreement № 075-15-2021-1063 of 28.09.2021.

Author contribution: Rogovaya OS, Eremeev AV — experimental procedure, data analysis; Alpeeva EV — data interpretation, literature review; Ruchko ES — experimental procedure; Vorotelyak EA — study planning.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Koltzov Institute of Developmental Biology, RAS (protocol № 51 of 09 September 2021) and conducted in accordance with the principles of the WMA Declaration of Helsinki and its subsequent revisions.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga S. Rogovaya
Vavilova, 26, Moscow, 119334, Russia; rogovaya26f@yandex.ru

Received: 16.12.2022 **Accepted:** 15.01.2023 **Published online:** 30.01.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.003

Исследуемые в данной работе биомедицинские клеточные продукты (БМКП) — дермальный эквивалент кожи (ДЭК) и биологический эквивалент кожи (БЭК), представляют собой трехмерные эквиваленты кожи и дермы, содержащие в своем составе живые клетки, культивируемые на поверхности биосовместимых матриц. Одним из недостатков БМКП подобного типа

является низкая выживаемость клеточного компонента при их замораживании и короткий срок годности при положительных температурах, что ограничивает их логистику и применение. Для внедрения БМКП в широкую клиническую практику необходимо найти баланс, при котором препарат, с одной стороны, не будет требовать трудновыполнимых технических условий хранения, а с

другой стороны, будет соответствовать таким критериям, как функциональная активность и достаточно высокая жизнеспособность клеточного компонента к моменту трансплантации. Разработка надежного способа хранения БМКП без ксенобиотиков будет способствовать широкому их распространению в трансплантационной медицине. Кроме того, достаточный срок хранения готовых клеточных продуктов обеспечит расширенные возможности для контроля их качества перед применением [1].

Несмотря на то что сообщалось об успешном сохранении простых тканеинженерных конструктов в замороженном состоянии, в случае 3D-систем на основе клеток и матриксов жизнеспособность клеточного компонента после оттаивания обычно составляет не более 50% [2–4]. Такие показатели жизнеспособности недостаточны для достижения оптимальных терапевтических результатов. В то же время существует информация об успешном хранении полнослойных кожных трансплантатов при низких положительных температурах в простых солевых растворах [5, 6].

Эти данные в сочетании с необходимостью использования сложных режимов замораживания/оттаивания, применения специального оборудования и методов отмывания БМКП от криосреды перед использованием дают основание считать разработку протоколов хранения БМКП до трансплантации при положительных температурах весьма перспективной.

Известно, что диапазон положительных температур, позволяющий сохранять клетки без значительной потери жизнеспособности, лежит в интервале от +4 до +37 °С, причем тенденции к сохранению жизнеспособности различаются между +5 и +25 °С. Так, в гепатоцитах крысы при температуре ниже +16 °С начинает происходить гипотермическое повреждение и достигает максимума при +4–+8 °С [7]. Ранее было продемонстрировано, что клетки человека могут сохранять до 90% жизнеспособности при низких положительных температурах в изотонических растворах в течение 30 ч [8]. Существуют данные о том, что мезенхимные стволовые клетки жировой ткани (МСК ЖТ) сохраняют все свои свойства при хранении в солевых растворах при комнатной температуре [9]. Также был предложен способ хранения трансплантатов на основе МСК в умеренно гипотермических условиях, являющийся альтернативной стратегией краткосрочной консервации трансплантатов. Ранее авторы показали, что при +25 °С жизнеспособность МСК в составе БМКП была значительно выше, чем при +4 °С [10].

С учетом вышеизложенного для настоящего исследования была выбрана температура хранения образцов +22 °С. Стабильность БМКП ДЭК и БЭК оценивали в течение трех суток по следующим признакам: целостность и цвет образца, объем, цвет и прозрачность жидкости в чашке с образцом, стерильность образца, количество живых клеток в составе образца, их метаболическая и секреторная активность. БМКП ДЭК был сконструирован на основе биосовместимой матрицы из гиалуроновой кислоты и коллагена 1-го типа и клеточного компонента — МСК ЖТ. БМКП БЭК был сконструирован на основе биосовместимой матрицы из гиалуроновой кислоты и коллагена 1-го типа и клеточного компонента — МСК ЖТ и кератиноцитов кожи. Целью работы было определить сроки хранения готовых БМКП ДЭК и БЭК при комнатной температуре, отвечающие условию сохранения секреторных свойств клеток, входящих в их состав, и высокого уровня их жизнеспособности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили в лаборатории. Все процедуры культивирования и переноса клеточных культур на биополимерные матрицы проводили в асептических условиях.

Изготовление и хранение БМКП

Для изготовления БМКП использовали клетки человека из Коллекции клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления) (ИБР РАН, Москва, Россия). МСК ЖТ и кератиноциты были получены из биоптатов кожи взрослых здоровых доноров (возраст 40–70 лет).

В качестве матрицы для роста клеток при культивировании БМКП использовали гистоеквивалент — биопластический материал G-DERM (Джи Дерм) («ДЖИ-Групп»; Россия), произведенный из гиалуроновой кислоты и коллагена 1-го типа.

Размораживание и культивирование клеток

Криопробирки с клетками (количество клеток в пробирке — 1×10^6) изымали из криохранилища, размораживали при +37 °С и центрифугировали при 200 g, после чего супернатант сливали, клеточный осадок ресуспендировали в культуральной среде и переносили в культуральные флаконы T25 (SPL; Корея).

Для МСК ЖТ использовали культуральную среду α -MEM («ПанЭко»; Россия) с 10% эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС) (HyClone; США), 1% Glutamax (Gibco; США) и 1% PenStrep (Gibco; США). Клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе при +37 °С, 5% CO_2 и повышенной влажности. Каждые двое суток проводили полную замену среды, при достижении клетками 80% конфлуэнтного монослоя их пассировали. Пассирование проводили по следующей схеме: культуральную среду сливали, клетки однократно промывали раствором Версена («ПанЭко»; Россия), затем во флакон вносили 800 мкл 0,05%-го раствора трипсина (Gibco; США) и инкубировали при +37 °С 5–10 мин до полного округления и открепления клеток от дна. Трипсин ингибировали культуральной средой, полученную клеточную суспензию пипетировали и пересевали в новые флаконы в соотношении 1 : 3.

Для кератиноцитов использовали культуральную среду DMEM/F12 («ПанЭко»; Россия) с добавлением 10% ЭБС (HyClone; США), 10 нг/мл эпидермального фактора роста EGF (Sigma; США), 1% Glutamax (Gibco; США), 1% PenStrep (Gibco; США) и 1% ITS (Gibco; США). Клетки культивировали так же, как описано выше для МСК ЖТ.

Изготовление БМКП ДЭК и БЭК

Биосовместимую матрицу для БМКП готовили следующим образом: из сухой пластины Джи Дерм вырезали кусок 6 × 6 см, помещали его в культуральную чашку Петри диаметром 10 см, добавляли в нее 10 мл культуральной среды и оставляли пластину в среде для набухания на 2 ч.

Для изготовления ДЭК использовали МСК ЖТ 6–8 пассажей. Клетки снимали с культуральных флаконов при помощи раствора Версена и трипсина так, как это описано выше, центрифугировали при 300 g и ресуспендировали клеточный осадок в культуральной среде (для МСК ЖТ

в концентрации 3×10^5 кл./мл). МСК ЖТ в суспензии наносили на подготовленную биосовместимую матрицу из расчета 3 мл клеточной суспензии на один ДЭК. Через 2 ч после посева клеток объем среды в чашке с матрицей доводили до 10 мл и инкубировали полученный эквивалент в CO₂-инкубаторе в течение трех суток.

При изготовлении БЭК использовали два типа клеток: МСК ЖТ 6–8 пассажей и кератиноциты кожи 1–2 пассажей. На первом этапе на матрицу наносили МСК ЖТ так, как это описано выше. Через 2 ч после посева МСК ЖТ на нее высевали второй тип клеток — кератиноциты. Для этого кератиноциты снимали с культурального флакона, центрифугировали при 300 g и ресуспендировали клеточный осадок в культуральной среде для кератиноцитов. Клеточную суспензию заливали в чашку Петри с подготовленной ранее матрицей с МСК ЖТ, исходя из соотношения 1×10^5 кл./см². После этого полученный БМКП инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение трех суток.

Хранение БМКП

В сформированных ДЭК и БЭК культуральную среду удаляли, БМКП дважды промывали DPBS («ПанЭко»; Россия), после чего в каждую чашку с БМКП добавляли по 10 мл стерильного физиологического раствора и упаковывали чашки в вакуумные пакеты. Полученные таким образом готовые БМКП помещали на хранение в термостат при температуре +22 °С в течение пяти суток, ежедневно изымая часть образцов для проведения анализа.

Визуальная оценка качества образца после хранения

Целостность, изменение цвета образца, объем, цвет и прозрачность жидкости в чашке с образцом, стерильность образца оценивали при изъятии их с хранения перед проведением последующих анализов состояния клеточного компонента. Для этого упаковки с образцами переносили в ламинар, где вторичную упаковку (вакуумный пакет) вскрывали, открывали чашку Петри, пипеткой отбирали физиологический раствор, в котором хранился образец, измеряли объем жидкости и переносили его в новую чашку. Состояние физиологического раствора проверяли при помощи инвертированного микроскопа Olympus IX73 с камерой Olympus DP74 (Olympus; Япония) при увеличении $\times 200$ и $\times 400$ для выявления признаков контаминации. Сам образец осматривали, при помощи пинцетов проверяли его целостность, после чего проводили дальнейшие исследования жизнеспособности и функциональной активности клеточного компонента.

Оценка способности клеток к адгезии и образованию культур после нахождения в составе БМКП

Выделение клеток из БМКП проводили после этапа хранения. Образцы промывали раствором Версена («ПанЭко»; Россия), после чего добавляли к ним 3 мл 0,25% раствора трипсина («ПанЭко»; Россия) и оставляли для ферментации на 10 мин при +37 °С при интенсивном покачивании. Затем трипсин ингибировали равным объемом культуральной среды с добавлением 10% ЭБС и дополнительно пипетировали, для того чтобы смыть максимальное количество клеток с поверхности матрицы. После чего полученную суспензию центрифугировали

5 мин при 200 g, супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в культуральной среде и высевали на культуральные чашки Петри. Через сутки клетки визуализировали и фотографировали при помощи инвертированного микроскопа Olympus IX73 с камерой Olympus DP74 (Olympus; Япония).

Оценка метаболической активности клеток в составе БМКП с помощью МТТ-теста

Для оценки метаболической активности в каждой временной точке хранения БМКП доставали из упаковки, разрезали на фрагменты 1×1 см и помещали в отдельные лунки 24-луночного планшета. Затем в лунки добавляли реагент МТТ (Sigma-Aldrich; США) в конечной концентрации 30 мкг/мл и инкубировали в течение 2,5 ч. После инкубации отбирали среду и добавляли в каждую лунку по 180 мкл ДМСО («ПанЭко»; Россия), помещали планшет на шейкер, через 1 мин отбирали окрашенный раствор и вносили его в 96-луночный планшет по 60 мкл в лунку для измерения оптической плотности. Оптическую плотность раствора измеряли при помощи фотометра Stat Fax 2100 (Awareness Technology; США) при длине волны 530 нм.

Выявление жизнеспособных клеток в составе БМКП

Для выявления жизнеспособных и погибших клеток в составе БМКП, прошедших процедуру хранения, образцы окрашивали витальным интеркалирующим красителем кальцеином Calcein AM (кальцеин) (1 мкМ) (Sigma; США) в соответствии с рекомендациями производителя. Окрашивание БМКП проводили в условиях CO₂-инкубатора (+37 °С, 5% CO₂) в течение 30 мин. Метод окрашивания основан на действии внутриклеточных эстераз, которые присутствуют исключительно в живых клетках и расщепляют данный краситель, в результате чего он начинает флуоресцировать в зеленой области спектра, в то время как в погибших клетках свечение не обнаруживается. Окрашенные образцы визуализировали и фотографировали при помощи инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus IX73 с камерой Olympus DP74 (Olympus; Япония). Для определения процента живых клеток в составе БМКП использовали протокол программы Image J (LOCI, Университет Висконсина, США) с использованием открытого плагина [11], который вычисляет процент окрашенных кальцеином областей в поле зрения. После получения числовых значений в трех повторах эксперимента за 100% принимали данные, полученные от исходных образцов БМКП, культивируемых в CO₂-инкубаторе в течение трех суток.

Оценка секреторной активности БМКП методом иммуноферментного анализа VEGF в кондиционированной среде

Отбор проб при исследовании БМКП проводили при хранении на протяжении трех суток, ежедневно производя отбор проб физиологического раствора, в котором хранили образцы. Для этого упаковки с образцами переносили в ламинар, снимали вторичную упаковку и с соблюдением стерильности отбирали по 100 мкл жидкости из каждой чашки с БМКП. После отбора проб чашки повторно запечатывали и убрали в термостат для дальнейшего хранения. В качестве контроля

использовали исходные образцы БМКП в культуральной среде и МСК ЖТ той же линии и пассажа, что и клетки в составе исследуемой серии БМКП, высеванные в лунки 24-луночного планшета и культивируемые стандартным способом. В качестве контроля отбирали пробы ростовой среды до начала исследования и пробы среды, в которой инкубировали матрицу без клеток в те же сроки. Для работы использовали набор VEGF-ИФА-БЕСТ (А-8784) («Вектор-Бест»; Россия).

Анализ проводили в соответствии с инструкцией производителя. Спектрофотометрию анализируемых проб проводили при длине волны 450 нм на приборе xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer (Bio-Rad; США).

Вычисляли среднее значение оптической плотности (ОД) для пар лунок и строили калибровочный график зависимости ОД от концентрации VEGF (МЕ/мл) в линейных координатах. Исходя из графика определяли концентрацию контрольного и опытных образцов в МЕ/мл согласно рекомендациям производителя набора. Результаты анализа учитывали, если вычисленное значение контрольного образца по калибровочному графику совпадало с указанным на маркировке флакона из набора.

Статистические методы

Все эксперименты с БМКП проводили в трех биологических повторах, каждый отдельный эксперимент включал не менее трех технических повторностей. После получения числовых значений в экспериментах с вычислением процента жизнеспособных клеток и при анализе результатов МТТ-теста их нормировали на данные, полученные от исходных образцов. В программе Microsoft Excel (Microsoft Corporation; США) высчитывали среднее арифметическое и стандартное отклонение среднего.

Достоверность различий в группах проверяли с использованием теста ANOVA в программе Prism 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При изъятии образцов с хранения при вскрытии вторичной упаковки все образцы визуально оставались сохранными: физиологический раствор, в котором хранили БМКП, оставался прозрачным, уменьшения его объема и контаминации микроорганизмами выявлено не было. Сами образцы на всем протяжении проводимых испытаний сохраняли свою целостность и первоначальный розовато-бежевый цвет.

Оценку жизнеспособности клеток в составе готовых культивируемых и запакованных БМКП, хранящихся при +22 °С, проводили двумя способами: при помощи окраски витальным красителем кальцеином и при помощи МТТ-теста.

Анализ показал, что число живых клеток уменьшается быстрее в БМКП ДЭК. Уже на вторые сутки в ДЭК наблюдали двукратное снижение количества кальцеин-положительных клеток (рис. 1), тогда как в БЭК их уменьшения не обнаружено (рис. 2). Кроме того, в обоих типах эквивалентов на третьи сутки наблюдали изменение морфологии МСК ЖТ: клетки, для которых в норме характерна веретеновидная форма, становились менее вытянутыми, часть клеток начинала открепляться от поверхности матрицы. При этом критическое снижение количества живых клеток в обоих БМКП — до 14% в ДЭК и 22,3% в БЭК (достоверность для каждого типа БМКП

подтверждена на уровне $p \leq 0,005$) — происходило на четвертые сутки хранения (рис. 1, 2).

В основе второго выбранного нами способа оценки состояния клеточного компонента в составе БМКП лежит измерение интенсивности образования кристаллов формазана в окружающей клетки среде под воздействием выделяемых ими метаболитов, коррелирующее с уровнем метаболизма, который принимается как отражение их жизнеспособности. Данный тест показал, что снижение метаболической активности происходит в ДЭК быстрее, чем в БЭК, поскольку на третьи сутки в ДЭК выявлено уменьшение метаболической активности до 44,6% относительно начала хранения ($p \leq 0,005$), в то время как в БЭК на третьи сутки она еще была на уровне 79,1% (достоверность отличий от исходного значения на данных сроках не значима), а к пятым суткам в ДЭК наблюдалось всего 18% первоначальной метаболической активности, и в БЭК ее значение достоверно падало до 33,7% ($p \leq 0,005$) (рис. 3А, Б).

При исследовании уровня VEGF, секретируемого клетками в физиологический раствор, в котором хранились образцы БМКП, во всех образцах физиологического раствора было выявлено наличие VEGF. Уровень данного фактора в растворе хранения к третьим суткам снижался незначительно (рис. 3В, Г). Так, в пробах раствора, в котором хранили ДЭК, в первые сутки выявили около 506 ± 136 МЕ/мл VEGF, а к третьим суткам — 493 ± 136 МЕ/мл (разница статистически не значима), а в пробах раствора, в котором хранили БЭК, в те же сроки — $1583,333 \pm 189$ МЕ/мл и 1733 ± 208 МЕ/мл соответственно (разница статистически не значима).

На третьи сутки из БМКП был выделен клеточный компонент. Как описано ранее, при создании ДЭК используют только один тип клеток — МСК, а при создании БЭК — два, МСК и кератиноциты, поэтому клетки, выделенные из ДЭК и БЭК, различались по морфологии и количеству. Все выделенные клетки показывали нормальную способность к адгезии. Они быстро прикреплялись к дну культуральной чашки, распластывались, приобретали стандартную морфологию (рис. 4А, В) и сохраняли ее весь период наблюдения (до четырех суток) (рис. 4Б, Г). Визуально количество прикрепившихся МСК ЖТ из БЭК значительно превышало их количество из ДЭК (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Целью исследования было определение сроков сохранения при комнатной температуре в функциональном и жизнеспособном состоянии клеточного компонента БМКП ДЭК и БЭК, разработанных в нашей лаборатории. Предыдущие наши исследования (неопубликованные данные) показали, что при хранении БМКП в замороженном виде при -70 °С и -20 °С с использованием различных криопротекторов (ДМСО, глицерин), специальных сред для замораживания чувствительных клеточных линий, Vambanker™ (Lymphotec; Япония), и многоклеточных объектов, Криодерм («ПанЭко»; Россия), клетки в их составе теряют жизнеспособность при размораживании. Значительное снижение их жизнеспособности в течение 24 ч было зарегистрировано также при температуре +4 °С. По данным литературы, для замораживания БМКП часто используют специальные коммерческие среды (например, Synth-a-Freeze™), тщательно разрабатывают протоколы замораживания/размораживания [4, 12, 13],

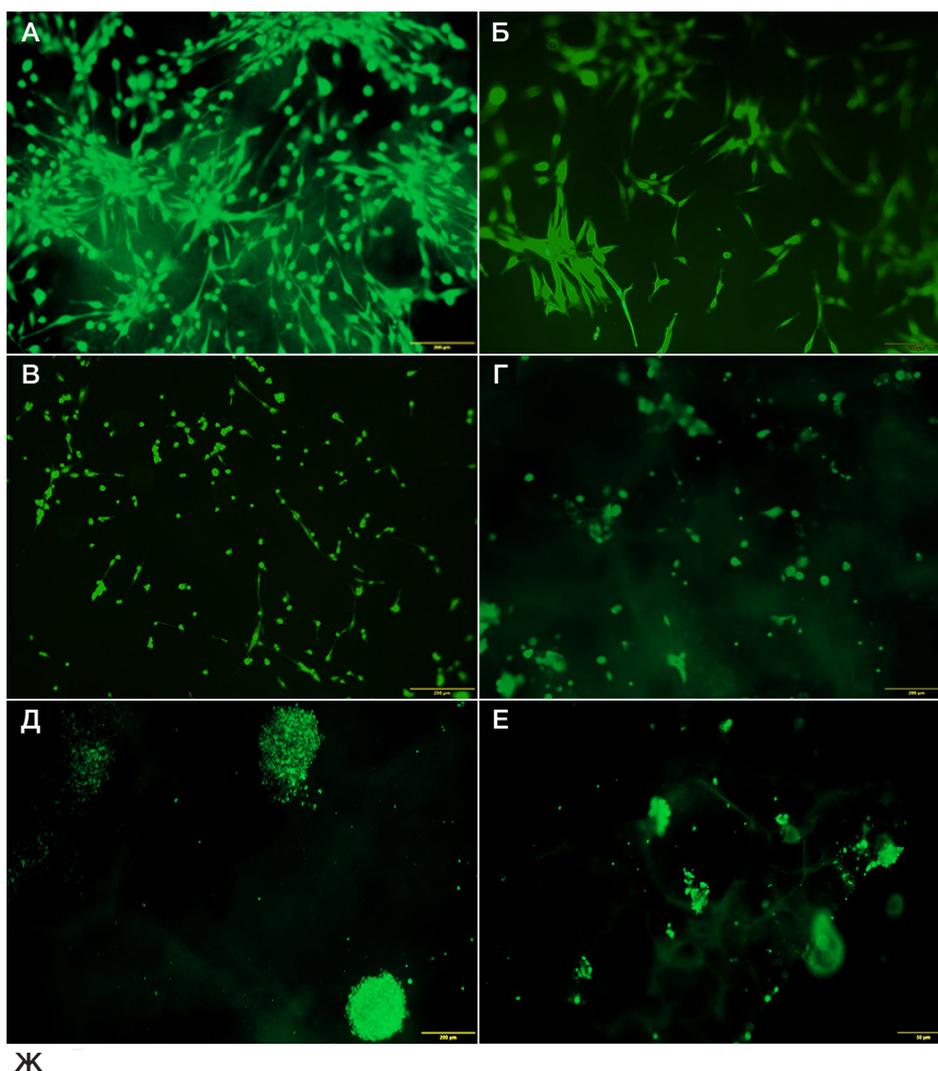


Рис. 1. Выявление живых клеток, окрашенных витальным красителем кальцеином (зеленое окрашивание), на поверхности матрицы в БМКП ДЭК на разных сроках хранения при температуре +22 °С (А–Е): в начале эксперимента (без хранения) нулевые сутки (А), первые сутки (Б), вторые сутки (В), третьи сутки (Г), четвертые сутки (Д) и пятые сутки (Е) хранения. Ж. График, демонстрирующий относительное количество живых клеток в БМКП ДЭК в процентах по отношению к состоянию образцов на нулевые сутки хранения. Данные представлены в виде среднего процента зеленых пикселей в шести полях зрения от трех технических повторов, планки погрешностей \pm SD (%)

что осложняет и увеличивает стоимость их хранения и логистики. Как отмечают наши коллеги из Приволжского исследовательского медицинского университета в обзоре, посвященном криосохранению МСК и БМКП, исследований по криосохранению 3D-структур, содержащих клетки, и БМКП мало, и отсутствует целостное представление о механизмах замораживания подобных продуктов [14]. Для каждого продукта условия разрабатываются отдельно, и способ криосохранения БМКП предназначен в основном для более длительного хранения. В мировой практике биоинженерные тканевые конструкции доставляют к моменту применения «на леду», за исключением случаев

разрешенных FDA коммерчески доступных Dermagraft и Apligraf, которые хранят и транспортируют при -75 °С и $+20$ – $+23$ °С соответственно [15]. Таким образом, задача разработки условий краткосрочного хранения тканеинженерных конструкций достаточно актуальна, и, как показал анализ литературы, ее решают индивидуально для каждого варианта продукта.

Целью нашей работы было определение возможности хранения БМКП ДЭК и БЭК при наиболее технически просто выполнимых условиях: без дорогостоящих импортных реагентов, дополнительного оборудования и специальных термических режимов. Кроме того, хранение

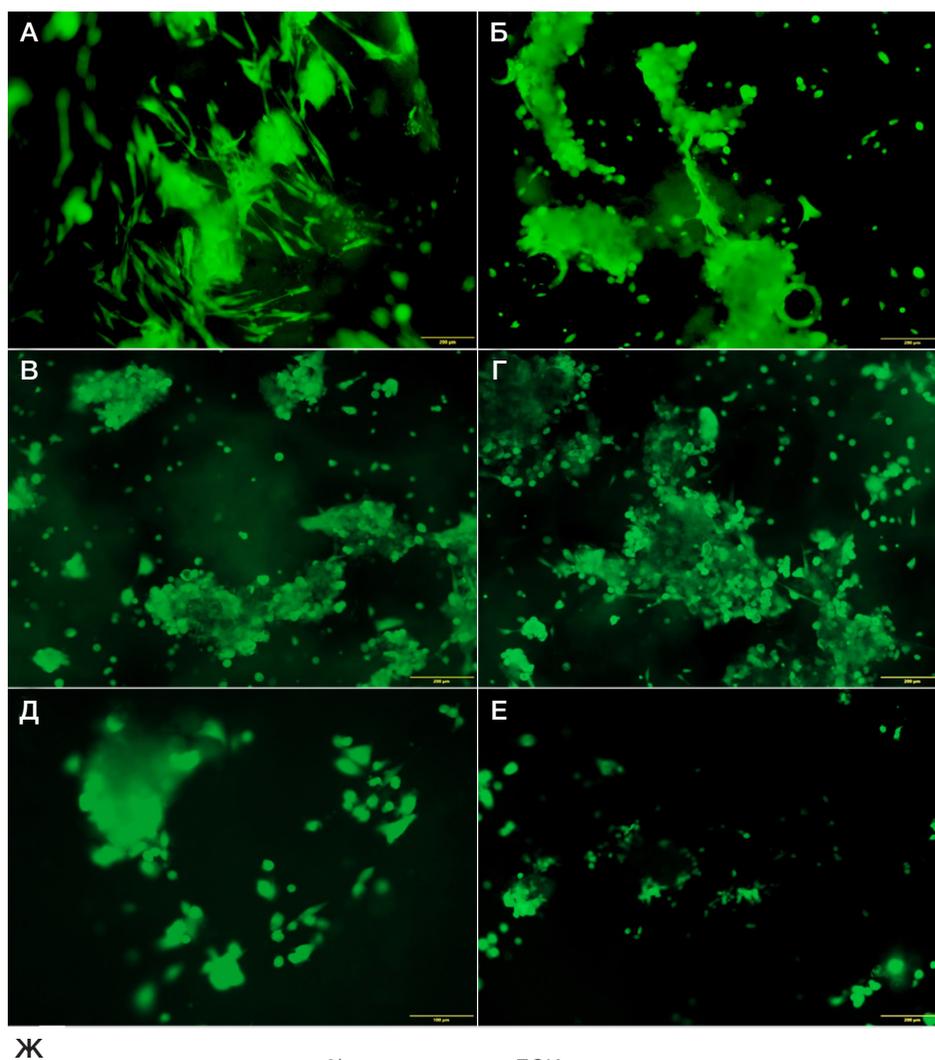


Рис. 2. Выявление живых клеток, окрашенных витальным красителем кальцеином (зеленое окрашивание), на поверхности матрицы в БМКП БЭК на разных сроках хранения при температуре +22 °С (А–Е): в начале эксперимента (без хранения) нулевые сутки (А), первые сутки (Б), вторые сутки (В), третьи сутки (Г), четвертые сутки (Д) и пятые сутки (Е) хранения. Ж. График, демонстрирующий относительное количество живых клеток в БМКП БЭК в процентах по отношению к состоянию образцов на нулевые сутки хранения. Данные представлены в виде среднего процента зеленых пикселей в шести полях зрения от трех технических повторов, планки погрешностей \pm SD (%)

в стерильном физиологическом растворе, который разрешен к использованию в качестве медицинского изделия, упрощает процедуру подготовки БМКП к применению, так как от него не нужно отмывать БМКП перед трансплантацией пациенту.

Нам удалось продемонстрировать, что в целом в течение трех суток хранения при самых простых условиях (комнатная температура и физиологический раствор) ДЭК и БЭК сохраняли свои основные параметры качества. При этом БЭК показал лучшие результаты по сравнению с ДЭК. Более высокий процент выживаемости клеток в БЭК, вероятно, обусловлен наличием в их составе

клеток двух типов, которые положительно влияют на жизнеспособность друг друга. Оценив темпы падения жизнеспособности клеточного компонента в исследуемых образцах, мы пришли к выводу, что хранение более трех суток в текущих условиях приводит к уменьшению живых клеток более чем на 50% в обоих типах БМКП. Соответственно, в дальнейшей работе мы не проводили анализ образцов, хранящихся более 72 ч.

Так как предполагаемый терапевтический эффект БМКП ДЭК и БЭК заключается не только в механическом закрытии кожных ран, но и в стимулирующем регенерацию ранозаживляющем эффекте, важным показателем их

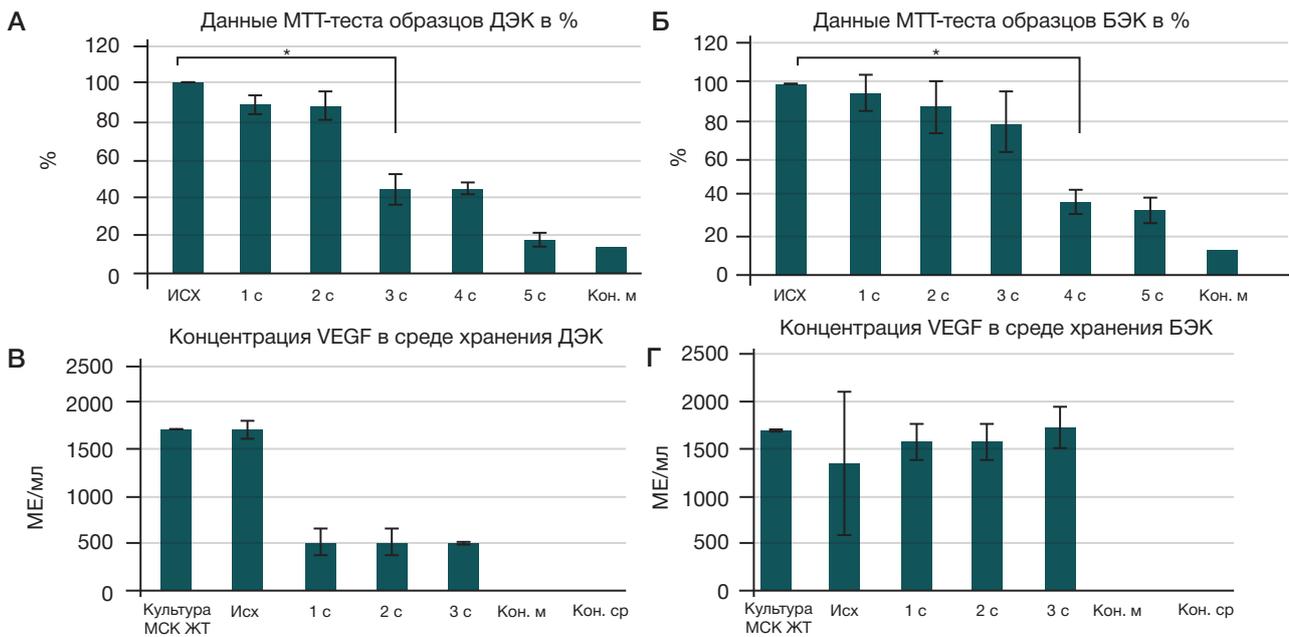


Рис. 3. Результаты изменения при хранении митохондриальной активности клеток в БМКП ДЭК (А) и БЭК (Б), полученные при помощи МТТ-теста и представленные в виде среднего арифметического значения показателей оптической плотности среды на разных сроках хранения по отношению к данным, полученным до начала хранения (нулевые сутки), в процентах в трех технических повторах, планки погрешностей \pm SD (%). Достоверность падения метаболической активности на третьи сутки для ДЭК и четвертые сутки для БЭК показана с использованием теста ANOVA ($p \leq 0,005$). Данные по выявлению наличия VEGF в физиологическом растворе, в котором хранили образцы БМКП ДЭК (В) и БЭК (Г), методом ИФА-анализа представлены в виде среднего арифметического значения показателей оптической плотности среды в девяти повторах, планки погрешностей \pm SD (%). В качестве контролей использовали матрицу без клеток, культуральную среду и исходную культуру МСК ЖТ, которую применяли для приготовления БМКП. Статистически значимых отличий в пробах физраствора в группах хранения в пределах трех суток не выявлено

качества является секреторная активность клеточного компонента. Известно, что клетки мезенхимного ряда, такие как МСК, играют ключевую роль в процессах регуляции клеточных взаимодействий и поддержания гомеостаза тканей [16]. МСК ЖТ способны стимулировать ангиогенез посредством активации роста и стабилизации растущих сосудов [17]. Синтезируемые данными клетками

факторы роста сосудов семейства VEGF способны индуцировать направленную миграцию, пролиферацию, дифференцировку клеток эндотелия в области дефекта, взаимодействуя с их рецепторами VEGF-R, что проявляется уменьшением площади повреждения, а также увеличением количества и объемной плотности кровеносных сосудов [9]. В норме клетки в составе БМКП при культивировании

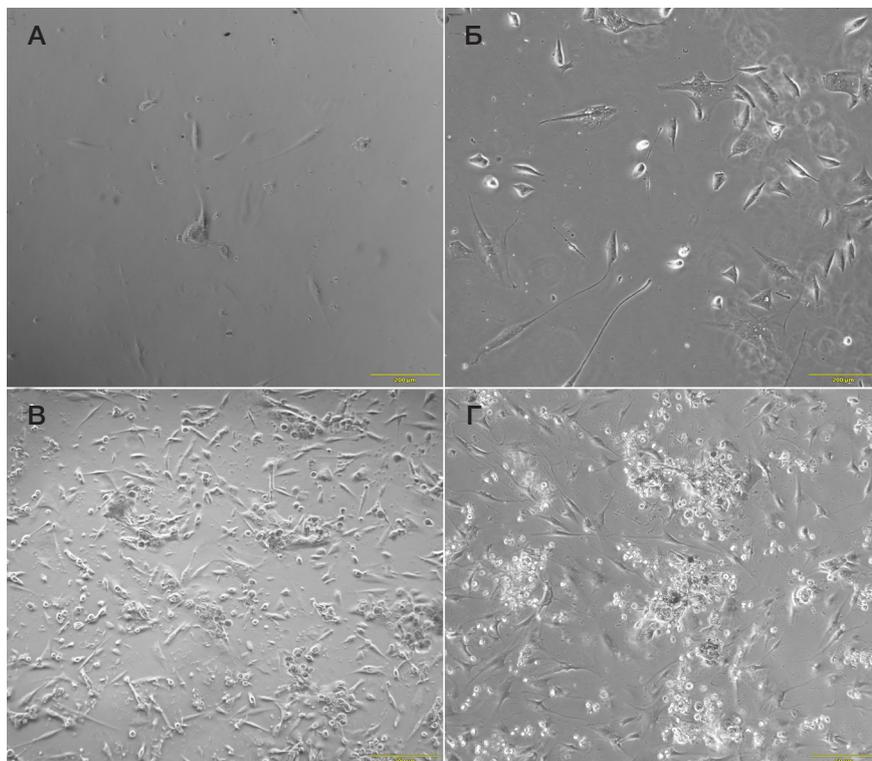


Рис. 4. Культура клеток, выделенных из БМКП ДЭК (А, В) и БЭК (В, Г) после 72 ч хранения. Клетки через сутки (А, В) и через трое суток (Б, Г) после выделения (световая микроскопия, фазовый контраст)

активно секретируют факторы роста, в том числе VEGF. В нашем эксперименте в культуральной среде его уровень составлял 1600–2000 МЕ/мл и выше. Кроме того, мы показали, что МСК ЖТ в составе полученных нами БМКП продолжают синтезировать VEGF и в физиологическом растворе, причем уровень его секреции сопоставим с показателями из культуральной среды, в которой БМКП инкубировали до упаковки и закладки на хранение.

Результаты эксперимента с измерением концентрации VEGF для БЭК и ДЭК позволяют нам также предположить, что кератиноциты способствуют выживаемости МСК ЖТ и поддерживают секрецию ими VEGF.

Выводы

При хранении БМКП БЭК в условиях умеренной гипотермии, при комнатной температуре (+22 °C), он сохраняет

жизнеспособность клеточного компонента на уровне, превышающем 50% жизнеспособности относительно начала хранения, в течение трех суток. Жизнеспособность клеточного компонента БМКП ДЭК снижается быстрее, и к третьим суткам мы наблюдали ее значение на уровнях, не превышающих 50% от исходной. Продемонстрированная нами способность МСК ЖТ в составе БМКП секретировать VEGF при хранении в данных условиях может служить показателем паракринной активности этих БМКП, которая может обеспечить терапевтическую роль в лечении кожных ран различной этиологии и быть косвенным признаком функциональной активности клеток в готовом продукте. Показатели жизнеспособности и метаболической активности клеточного компонента БЭК при хранении достоверно выше, чем ДЭК. Полученные результаты важны для ускорения процессов внедрения методов тканевой инженерии и регенеративной медицины в клиническую практику.

Литература

1. Utheim TP, Raeder S, Utheim OA, de la Paz M, Roald B, et al. Sterility control and long-term eye-bank storage of cultured human limbal epithelial cells for transplantation. *Br J Ophthalmol*. 2003; 93: 980–3. DOI: 10.1136/bjo.2008.149591.
2. Mutsenko VV, Rogulska OY, Petrenko YA, Ehrlich H, Mazur SP, et al. Cryosensitivity of Mesenchymal Stromal Cells Cryopreserved Within Marine Sponge Ianthella basta Skeleton-Based Carriers. *Probl Cryobiol Cryomedicine*. 2016; 26: 13–23. DOI: 10.15407/cryo26.01.013.
3. Petrenko Y, Petrenko A, Martin I, Wendt D. Perfusion bioreactor-based cryopreservation of 3D human mesenchymal stromal cell tissue grafts. *Cryobiology*. 2017; 76: 150–3. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.001.
4. Arutyunyan I, Elchaninov A, Sukhikh G, Fatkhudinov T. Cryopreservation of Tissue-Engineered Scaffold-Based Constructs: From Concept to Reality. *Stem Cell Rev Rep*. 2022; 18: 1234–52. DOI: 10.1007/s12015-021-10299-4.
5. Knapik A, Kornmann K, Kerl K, Calcagni M, Contaldo C, et al. Practice of split-thickness skin graft storage and histological assessment of tissue quality. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2013; 66: 827–34. DOI: 10.1016/j.bjps.2013.02.003.
6. Ge L, Sun L, Chen J, Mao X, Kong Y, et al. The viability change of pigskin in vitro. *Burns*. 2010; 36: 533–8. DOI: 10.1016/j.burns.2009.08.001.
7. Rauen U, Kerkweg U, de Groot H. Iron-dependent vs. iron-independent cold-induced injury to cultured rat hepatocytes: a comparative study in physiological media and organ preservation solutions. *Cryobiology*. 2007; 54 (1): 77–86. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2006.11.008.
8. Роговая О. С., Петракова О. С., Гвазава И. Г., Борисов М. А., Васильев А. В. Исследование жизнеспособности культивируемых клеток человека в суспензии. *Вестник Московского университета. Серия 16: биология*. 2016. 3: 44–48.
9. Fujita Ya, Nishimura M, Komori NW, Wada T, Shirakawa Ch, et al. A pair of cell preservation solutions for therapy with human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Regen Ther*. 2020; 14: 95–102. DOI: 10.1016/j.reth.2019.10.004.
10. Vackova I, Vavrinova E, Musilkova J, Havlas V, Petrenko Y. Hypothermic Storage of 3D Cultured Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine Applications. *Polymers (Basel)*. 2022; 14 (13): 2553. DOI: 10.3390/polym14132553.
11. Schulze K, López DA, Tillich UM, Frohme M. A simple viability analysis for unicellular cyanobacteria using a new autofluorescence assay, automated microscopy, and Image J. *BMC Biotechnol*. 2011; 11: 118. DOI: 10.1186/1472-6750-11-118.
12. Tam E, McGrath M, Sladkova M, AlManaie A, Alostaad A, de Peppo GM. Hypothermic and cryogenic preservation of tissue-engineered human bone. *Ann NY Acad Sci*. 2020; 1460 (1): 77–87. DOI: 10.1111/nyas.14264.
13. Sampaio-Pinto V, Janssen J, Chirico N, Serra M, Alves PM, et al. Roadmap to Cardiac Tissue-Engineered Construct Preservation: Insights from Cells, Tissues, and Organs. *Adv Mater*. 2021; 33 (27): e2008517. DOI: 10.1002/adma.202008517.
14. Linkova DD, Rubtsova YP, Egorikhina MN. Cryostorage of Mesenchymal Stem Cells and Biomedical Cell-Based Products. *Cells*. 2022; 11 (17): 2691. DOI: 10.3390/cells11172691.
15. Criswell T, Swart C, Stouemire J, Brockbank K, Floren M, Eaker S, Hunsberger J. Shipping and Logistics Considerations for Regenerative Medicine Therapies. *Stem Cells Transl Med*. 2022; 11 (2): 107–13. DOI: 10.1093/stcltm/szab025.
16. Jing D, Li C, Yao K, Xie X, Wang P, et al. The vital role of Gli1+ mesenchymal stem cells in tissue development and homeostasis. *J Cell Physiol*. 2021; 236 (9): 6077–89. DOI: 10.1002/jcp.30310.
17. Krawczenko A, Klimczak A. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Contribution to Angiogenic Processes in Tissue Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (5): 2425. DOI: 10.3390/ijms23052425.

References

1. Utheim TP, Raeder S, Utheim OA, de la Paz M, Roald B, et al. Sterility control and long-term eye-bank storage of cultured human limbal epithelial cells for transplantation. *Br J Ophthalmol*. 2003; 93: 980–3. DOI: 10.1136/bjo.2008.149591.
2. Mutsenko VV, Rogulska OY, Petrenko YA, Ehrlich H, Mazur SP, et al. Cryosensitivity of Mesenchymal Stromal Cells Cryopreserved Within Marine Sponge Ianthella basta Skeleton-Based Carriers. *Probl Cryobiol Cryomedicine*. 2016; 26: 13–23. DOI: 10.15407/cryo26.01.013.
3. Petrenko Y, Petrenko A, Martin I, Wendt D. Perfusion bioreactor-based cryopreservation of 3D human mesenchymal stromal cell tissue grafts. *Cryobiology*. 2017; 76: 150–3. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.001.
4. Arutyunyan I, Elchaninov A, Sukhikh G, Fatkhudinov T. Cryopreservation of Tissue-Engineered Scaffold-Based Constructs: From Concept to Reality. *Stem Cell Rev Rep*. 2022; 18: 1234–52. DOI: 10.1007/s12015-021-10299-4.
5. Knapik A, Kornmann K, Kerl K, Calcagni M, Contaldo C, et al.

- Practice of split-thickness skin graft storage and histological assessment of tissue quality. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2013; 66: 827–34. DOI: 10.1016/j.bjps.2013.02.003.
6. Ge L, Sun L, Chen J, Mao X, Kong Y, et al. The viability change of pigskin in vitro. *Burns.* 2010; 36: 533–8. DOI: 10.1016/j.burns.2009.08.001.
 7. Rauen U, Kerkweg U, de Groot H. Iron-dependent vs. iron-independent cold-induced injury to cultured rat hepatocytes: a comparative study in physiological media and organ preservation solutions. *Cryobiology.* 2007; 54 (1): 77–86. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2006.11.008.
 8. Rogovaya OS, Petrakova OS, Gvazava IG, Borisov MA, Vasilev AV. Issledovanie zhiznesposobnosti kul'tiviruemykh kletok cheloveka v suspenzii. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16: biologiya.* 2016. 3: 44–48.
 9. Fujita Ya, Nishimura M, Komori NW, Wada T, Shirakawa Ch, et al. A pair of cell preservation solutions for therapy with human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Regen Ther.* 2020; 14: 95–102. DOI: 10.1016/j.reth.2019.10.004.
 10. Vackova I, Vavrinova E, Musilkova J, Havlas V, Petrenko Y. Hypothermic Storage of 3D Cultured Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine Applications. *Polymers (Basel).* 2022; 14 (13): 2553. DOI: 10.3390/polym14132553.
 11. Schulze K, López DA, Tillich UM, Frohme M. A simple viability analysis for unicellular cyanobacteria using a new autofluorescence assay, automated microscopy, and Image J. *BMC Biotechnol.* 2011; 11: 118. DOI: 10.1186/1472-6750-11-118.
 12. Tam E, McGrath M, Sladkova M, AlManaie A, Alostaad A, de Peppo GM. Hypothermic and cryogenic preservation of tissue-engineered human bone. *Ann NY Acad Sci.* 2020; 1460 (1): 77–87. DOI: 10.1111/nyas.14264.
 13. Sampaio-Pinto V, Janssen J, Chirico N, Serra M, Alves PM, et al. Roadmap to Cardiac Tissue-Engineered Construct Preservation: Insights from Cells, Tissues, and Organs. *Adv Mater.* 2021; 33 (27): e2008517. DOI: 10.1002/adma.202008517.
 14. Linkova DD, Rubtsova YP, Egorikhina MN. Cryostorage of Mesenchymal Stem Cells and Biomedical Cell-Based Products. *Cells.* 2022; 11 (17): 2691. DOI: 10.3390/cells11172691.
 15. Criswell T, Swart C, Stoudemire J, Brockbank K, Floren M, Eaker S, Hunsberger J. Shipping and Logistics Considerations for Regenerative Medicine Therapies. *Stem Cells Transl Med.* 2022; 11 (2): 107–13. DOI: 10.1093/stcltm/szab025.
 16. Jing D, Li C, Yao K, Xie X, Wang P, et al. The vital role of Gli1+ mesenchymal stem cells in tissue development and homeostasis. *J Cell Physiol.* 2021; 236 (9): 6077–89. DOI: 10.1002/jcp.30310.
 17. Krawczenko A, Klimczak A. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Contribution to Angiogenic Processes in Tissue Regeneration. *Int J Mol Sci.* 2022; 23 (5): 2425. DOI: 10.3390/ijms23052425.