

УДК 57.085.1

## ТРЕХМЕРНАЯ МОДЕЛЬ БИОМАТРИКСА КАК СПОСОБ ИЗУЧЕНИЯ РОСТА КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ И НЕРВОВ В ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЯХ

Е.В. Семина, К.А. Рубина, В.Ю. Сысоева, В. В. Степанова\*, В.А. Ткачук

(кафедра биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова)

Разработан метод, предусматривающий выделение и культивирование *ex vivo* культур спинального ганглия и брюшной аорты мышцы в трехмерном геле (Матригеле). Данная методика позволяет изучать физиологические и биохимические процессы, происходящие в тканевом экспланте ганглия или брюшной аорты мышцы не в двумерной адгезивной культуре, а в трехмерном пространстве. Введение в Матригель тестируемых веществ позволяет анализировать их влияние на экспланты в динамике в течение 21 дня от момента помещения эксплантов в Матригель. Разработанный метод может быть применим в современных кардиологических и нейробиологических исследованиях, направленных на изучение новых терапевтических препаратов, ускоряющих регенерацию сосудов и нервов.

**Ключевые слова:** трехмерная эксплантная культура, спинальные ганглии, брюшная аорта, регенеративная медицина.

**Принятые сокращения:** БА – брюшная аорта, СГ – спинальный ганглий.

Органые или эксплантные культуры, выделяемые и культивируемые в условиях *ex vivo*, длительно сохраняют основную архитектуру ткани после изъятия их из организма. Биохимические и физиологические процессы, происходящие в таких культурах, максимально приближены к аналогичным процессам, происходящим в условиях *in vivo*, т.е. в организме. В то же время в эксплантной культуре в течение долгого периода сохраняется взаимодействие между разными типами клеток, характерными для данной ткани. Ткани и органы также сохраняют чувствительность к гормонам и способность к специфическому клеточному ответу на протяжении длительного времени; в эксплантах эндокринных органов и тканей сохраняется секреция характерных гормонов *ex vivo*. Для эксплантов, выделенных из эмбрионов, характерно максимальное сходство *ex vivo* и *in vivo*.

Впервые в 1902 г. в лаборатории доктора Лёба (Leo Loeb) были проведены исследования в области культивирования органов и тканей печени, почек, щитовидной железы и яичников кролика [1]. Исследовательская группа опубликовала данные о культивировании фрагментов органов на небольших кровяных сгустках в пробирках. В ходе дальнейших экспериментов было обнару-

жено, что при культивировании фрагментов тканей необходимы питательная среда и кислород, а также наличие твердого субстрата для адгезии клеток [2]. С развитием методов и появлением новых сред и материалов популярным стало двумерное культивирование клеток, однако такой способ приводит к изменению морфологии и функциональных характеристик культивируемых клеток. Одной из основных причин таких изменений принято считать изменение состава клеточных контактов, которое определяется в первую очередь внеклеточным матриксом в организме и субстратом, окружающим эксплант в ходе культивирования *ex vivo*.

В настоящее время в качестве субстратов используют различные материалы и подходы. Самым распространенным и недорогим считается так называемая «техника часового стекла» (метод «watchglass»), предложенная в [3]. Суть метода заключается в том, что культивирование проводится в выемке часового стекла на поверхности сгустка, состоящего из плазмы цыпленка или эмбрионального экстракта кур. В стерильных условиях часовое стекло помещают в чашку Петри и закрывают сверху для предотвращения высыхания. Культивируют в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора при температуре 37°C. Этот метод дешев и прост,

\*ООО «Генная и клеточная терапия».

однако у него есть существенные недостатки. Во-первых, по мере культивирования происходит разжижение сгустка по периметру экспланта, который попадает в жидкость. Во-вторых, сложный состав сгустка, в который помещен эксплант, затрудняет интерпретацию данных биохимических исследований.

Существуют также и другие методы культивирования эксплантных культур. В последнее время широкое применение находят методики, основанные на использовании биологических полимерных гелей, или биоматрикс, для покрытия подложки и последующего культивирования тканевых эксплантов на поверхности таких гелей. В этих целях используют коллагеновые матрицы на основе коллагена I типа, получаемого из хвостов крыс («Invitrogen», США); коллагена под торговым названием VITROGEN (ныне снят с производства) или бычьего коллагена FibrilCol® (фирмы «AdvancedBioMatrix», «Bovine Collagen Solution»); коллагена свиньи FlexiCol™, а также других типов коллагена животных и человека.

Основными преимуществами таких матрикс является их биохимическая однородность (отсутствие других биологически активных веществ), нетоксичность, высокопористость, адгезивные свойства и химическая чистота (в основе матрикса лежит коллаген I, II, III или V типа). Однако использование коллагена при культивировании тканей и органов также имеет определенные ограничения. Прежде всего, коллагеновый матрикс не для всех типов клеток является физиологичным субстратом для роста и функционирования. Так, коллаген сам по себе может выступать активатором/блокатором процессов миграции и пролиферации, специфически изменять морфологию клеток, а также влиять на сборку и состав клеточных контактов [4]. Кроме того, количество и характер укладки коллагеновых волокон может являться триггером для запуска таких процессов, как пролиферация, миграция или активация металлопротеиназ.

В последнее время возрастает интерес к использованию Матригеля (Matrigel™ Basement Membrane Matrix, BD, кат. номер 356237, США) в качестве биоматрикса для проведения исследований *in vivo*, *ex vivo* и *in vitro*. Матригель представляет собой внеклеточный матрикс, получаемый как продукт культивирования опухолевых клеток саркомы линии Engelbreth-Holm-Swarm (кат. номер ATCC® CRL-2108™). Несмотря на относительную дороговизну, Матригель успешно применяется в различных биологических и биомедицинских исследованиях [6–10]. Матригель

выпускается в двух видах – содержащий факторы роста (Basement Membrane Matrix) и лишенный факторов роста (Growth Factors Reduced Matrigel); выбор того или иного типа зависит от конкретных целей исследования. Так, при введении исследуемых веществ в Матригель для оценки их положительного влияния на процессы в экспланте предпочтительно использование Матригеля, лишенного факторов роста (во избежание стимулирующего влияния факторов роста, содержащихся в Матригеле). Если необходимо исследовать вещества, тормозящие/блокирующие процессы в экспланте, то предпочтительнее использовать Матригель, содержащий факторы роста. Кроме того, основным преимуществом Матригеля является то, что он очень вязкий, и при работе в диапазоне температур от +4 до +10°C формирует нерастекающуюся каплю на поверхности, а при 37°C полимеризуется, образуя нерастворимый гель. Это существенное преимущество Матригеля перед другими биоматриксами позволяет получать трехмерные (3D, 3-Dimensional) эксплантные культуры, которые можно культивировать в капле без подложки, моделируя трехмерную структуру ткани в организме. С учетом важной роли внеклеточного матрикса в регуляции физиологических процессов в клетках представляется важным разработать такие системы *ex vivo*, которые сделают возможным изучение этих процессов вне организма. В таких 3D-системах возможно предотвратить ускоренную адгезию экспланта к подложке, перераспределение молекул адгезии и избирательную миграцию клеток из экспланта в среду культивирования. Кроме того, смешивание тестируемых веществ с Матригелем позволяет им равномерно диффундировать и оказывать воздействие на ткань экспланта.

Метод, разработанный авторами и предложенный в данной статье, описывает выделение и культивирование *ex vivo* культур спинального ганглия (СГ) и брюшной аорты (БА) мыши в 3D-Матригеле. Данный метод может быть использован для оценки разрабатываемых терапевтических препаратов, перспективных для использования в регенеративной медицине, в том числе в кардиологии и неврологии, поскольку с помощью данного метода можно оценить положительное и отрицательное влияние веществ, вводимых в Матригель, на экспланты СГ или БА в динамике до 21 дня. Метод, представленный в данной статье, легко воспроизводим, но требует определенных навыков работы с животными и знание топографической анатомии мыши. Процедура выделения и культивирования СГ и БА

в трехмерном Матригеле составляет 2–3 недели в зависимости от целей эксперимента. Визуализация эксплантов осуществляется с помощью световой темнопольной микроскопии на малых увеличениях, дальнейшая обработка полученных изображений возможна с использованием программного обеспечения MetaMorph Microscopy Automation and Image Analysis Software (Molecular Devices) или аналогом ImageJ.

### Экспериментальная часть

**Реактивы и инструменты.** Выделение БА можно проводить без использования стереомикроскопа. Однако ввиду того, что размер СГ у мышей очень мал, а также во избежание возможных топографических ошибок при их выделении, непосредственно процедуру изъятия СГ рекомендуется осуществлять под стереомикроскопом «Olympus SZ Stereo» (или аналогичным). Визуализацию образцов БА и СГ в Матригеле рекомендуется осуществлять под инвертированным микроскопом «Zeiss AxioVert 200» (или аналогом) при малых увеличениях (объективы  $\times 5$ ,  $\times 10$ ).

В методике используют следующие реактивы: Матригель, обогащенный факторами роста (Matrigel™ Basement Membrane Matrix, BD, кат. номер 356237, США), стерильный буфер Хэнкса (Gibco®, кат. номер 14025-092), среда культивирования для СГ RPMI 1640, GlutaMAX™ Supplement, Phenol Red (Gibco®, кат. номер 61870-010), раствор антибиотика-антимикотика (100X, Gibco®, кат. номер 15240-096), оптимизированная среда культивирования для БА EGM™-2 BulletKit™ (Lonza, кат. номер CC-3162), ингаляционный наркоз для мелких животных изофлуран IsoFlo, isoflurane, USP (Abbot, кат. номер 05260-05), стерильные 8-луночные культуральные планшеты с тонким стеклянным дном (Nunc® Lab-Tek® Chambered Coverglass, кат. номер 155411).

Для выделения БА и СГ необходимы следующие хирургические инструменты (рис. 1) (или их аналоги): стальные ножницы Tungsten Carbide Iris Scissors straight длиной 4,5 дюйма (Braintree Scientific Inc., кат. номер SC-T 405), стальной пинцет с изогнутыми концами под 45° Dumont Inox Forceps, Inox длиной 109 мм (Braintree Scientific Inc., кат. номер FC-5005), стальной пинцет с изогнутыми дугообразными краями Dumont Forceps, Inox, curved длиной 115 мм (Braintree Scientific Inc., кат. номер FC-5047), офтальмологические ножницы Micro Scissors Straight длиной 3,25 дюйма (Braintree Scientific Inc., кат. номер SC-MS 152), стальные пинцеты с прямыми краями

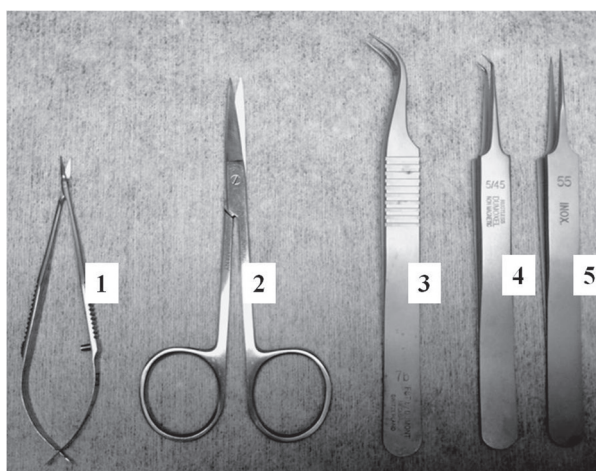


Рис. 1. Основные операционные инструменты, необходимые для выделения эксплантов ганглий и брюшной аорты. 1 – офтальмологические ножницы Micro Scissors Straight длиной 3,25 дюйма; 2 – стальные ножницы Tungsten Carbide Iris Scissors straight длиной 4,5 дюйма; 3 – стальной пинцет с изогнутыми дугообразными краями Dumont Forceps, Inox, curved длиной 115 мм; 4 – стальной пинцет с изогнутыми концами под 45° Dumont Inox Forceps, Inox длиной 109 мм; 5 – стальные пинцеты с прямыми краями Dumont Forceps, Inox, curved длиной 115 мм

ми Dumont Forceps, Inox, curved длиной 115 мм (Braintree Scientific Inc., кат. номер FC-5020); ножницы из закаленной стали SuperCut Surgical Scissors straight длиной 5,5 дюймов (Braintree Scientific Inc., кат. номер SCT-S 508).

**Лабораторные животные.** В работе с животными соблюдали «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», Приказ Министерства высшего и среднего специального образования СССР № 742 от 13. 11. 1984 г., а также нормы, утвержденные Комиссией по биоэтике факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова. Спинальные ганглии и брюшную аорту выделяли у мышей линии C57/B6 в возрасте 4–6 недель.

### Результаты и их обсуждение

Основной принцип получения трехмерных эксплантов представлен на рис. 2. Вся процедура, начиная с получения биологического материала, осуществляется в асептических условиях; культивирование готовых эксплантов в Матригеле – в условиях клеточного CO<sub>2</sub>-инкубатора при температуре +37°C. Микроскопия эксплантов в Матригеле должна осуществляться при температуре не ниже +25°C из-за возможной деполимеризации Матригеля и открепления его от подложки.

За 4 ч до начала эксперимента необходимо нагреть замороженный Матригель (предусматривается хранение при –20°C) до температуры +4°C



Рис. 2. Схематическое изображение трехмерной эксплантной культуры в Матригеле *ex vivo*

на льду. Следует избегать нагревания Матригеля выше указанной температуры, так как он при повышении температуры полимеризуется и превращается в твердый сгусток. При размораживании Матригеля не допускать его взбалтывания. Суспензия размороженного Матригеля должна быть однородной, без посторонних включений и пузырьков.

Поскольку все процедуры по выделению СГ и БА проводят в асептических условиях, перед началом эксперимента необходимо простерилизовать хирургические инструменты и ватные тампоны путем автоклавирования, а также подготовить операционный столик для мелких лабораторных животных. Мышь следует летально анестезировать ингаляционным наркозом. После умерщвления декапитировать животное, аккуратно слить кровь. При декапитации и обескровливании необходимо беречь позвоночник, т.е. избегать переломов или разрывов позвоночного столба, так как это может привести к нарушению целостности спинного мозга. Необходимо налить холодный стерильный буфер Хэнкса в культуральную сте-

рильную чашку Петри (35 мм) и поместить ее на лед.

### Выделение спинального ганглия

Все манипуляции по выделению СГ следует проводить быстро, так как увеличение времени с момента декапитации до изъятия ганглиев уменьшает выживаемость нейронов в ткани. Животное следует поместить на операционный столик животом вниз, иммобилизовав его таким образом, чтобы конечности были максимально удалены от тела в разные стороны, протереть спину спиртом и сделать на ней (ближе к хвосту) ножницами поперечный разрез кожи размером 2–3 см. Далее, придерживая хвост рукой, следует снять кожу со спины мыши снизу вверх, разорвав ее, лоскут закрепить. Рекомендуется разрывать кожу, так как при разрезании неизбежно попадание шерсти животного на операционное поле. При разрыве кожного покрова шерсть не попадает в рану, и, таким образом, соблюдаются стерильность и чистота операционного поля (рис. 3, А, Б).

После этого надо перенести столик с животным под стереомикроскоп («Olympus SZ Stereo»). Далее ножницами и пинцетами следует аккуратно освободить позвоночный столб сверху и по бокам от мышечной и соединительной ткани, стараясь не повредить нервы, выходящие из позвоночного столба. Тонкими острыми ножницами надо вскрыть спинномозговой канал и удалить дужки позвонков вместе с соединяющими их мышцами; далее следует вскрыть позвоночник, освободив спинной мозг. Необходимо аккуратно отодвинуть

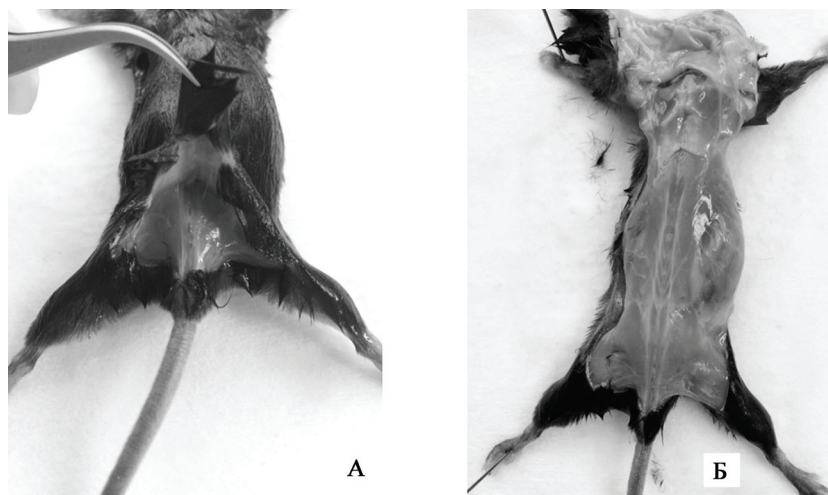


Рис. 3. Положение мыши при выделении спинальных ганглиев: А – декапитированное животное, иммобилизованное на операционном столике животом вниз; Б – операционное поле при удалении кожного покрова

спинной мозг, СГ при этом будут располагаться в межпозвоночных отверстиях. Далее при помощи стерильных пинцетов следует изъять СГ, стараясь максимально удалять нервные отростки. Выделенные ганглии необходимо сразу поместить в чашку Петри со стерильным холодным буфером Хэнкса (рис. 4, А, Б).

### Выделение брюшной аорты

Мышь следует летально анестезировать ингаляционным наркозом или внутривенным введением авертина, обескровить путем декаптации и иммобилизовать на столике брюшком вверх. Протереть кожу и волосы животного спиртом, надрезать кожу в районе паха и снять кожу со спины тупым способом (без использования режущих инструментов). Освободить брюшную полость от кожи и стерильными инструментами аккуратно отодвинуть органы брюшной полости влево. Визуализировать пищевод (рис. 5, А). Брюшная аорта соединена с позвоночным столбом соединительной тканью (рис. 5, Б). Аккуратно отделить аорту от соединительной ткани, затем отсечь аорту проксимально на уровне аортальной арки и дистально на уровне бифуркации. Выделенную аорту поместить в чашку Петри со стерильным охлажденным буфером Хэнкса. Перенести чашки Петри в культуральный блок. Все дальнейшие манипуляции осуществлять в стерильных условиях.

### Культивирование *ex vivo* спинального ганглия и брюшной аорты

Укомплектованную среду культивирования для СГ (среда RPMI1640, содержащая одно-

кратный раствор антибиотка-антимикотика) и EGM™-2 BulletKit™ для БА нагреть на водяной бане до температуры +37°C, размороженный Матригель поместить под ламинар. Для поддержания постоянной температуры Матригеля его можно поместить на подложку со льдом. Аорту отчистить от соединительной ткани и перенести в новую чашку Петри со стерильным охлажденным буфером PBS. Одноразовым стерильным скальпелем разрезать аорту на 7–8 частей. Далее аккуратно разложить СГ или БА по одному экспланту в лунки 8-луночных культуральных планшетов Nunc® Lab-Tek® Chambered Coverglass. Следует избегать высушивания ганглиев и кусочков аорты, так как ткани будут прилипать к пинцету, что затруднит их прикрепление ко дну лунки. На каждый кусочек ткани сверху следует аккуратно нанести каплю Матригеля (60 мкл). При работе с Матригелем необходимо следить за тем, чтобы в раскапываемом Матригеле не было пузырей или посторонних включений, так как это затруднит визуализацию эксплантов в микроскоп. После заполнения лунок планшет следует аккуратно поместить на 10 мин в инкубатор (+37°C) для полимеризации Матригеля. Через 10 мин в лунки с полимеризованным Матригелем следует внести по 400 мкл предварительно нагретой среды RPMI1640 для СГ и EGM™-2 BulletKit™ для БА и поместить планшет с эксплантами в инкубатор. Визуализацию эксплантов можно осуществлять на третьи-четвертые сутки с использованием световой микроскопии.

На рис. 6 представлены изображения эксплантной культуры БА (рис. 6, А) и СГ мыши (рис. 6, Б) в Матригеле через 10 дней после вы-

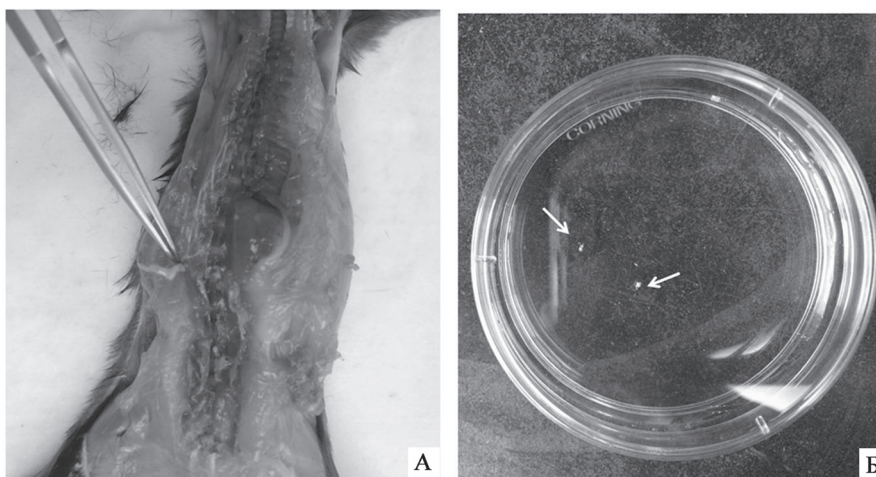


Рис. 4. Выделение спинальных ганглиев у мыши: А – Операционное поле при вскрытии позвоночника; Б – внешний вид выделенных СГ, помещенных в чашку Петри диаметром 35 мм (стрелками указаны выделенные СГ)

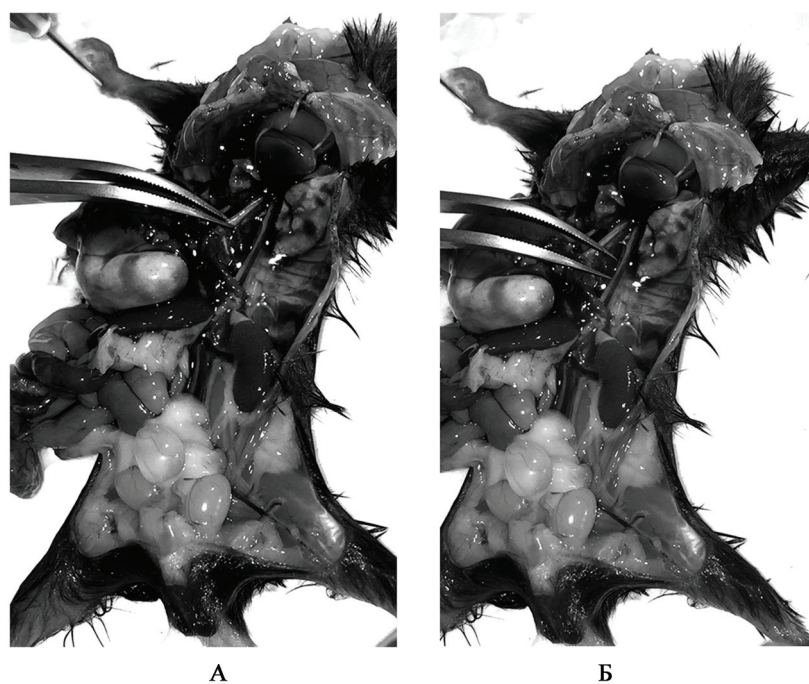


Рис. 5. Выделение брюшной аорты у мыши. Операционное поле при вскрытии брюшной полости: А – пинцетом указан пищевод, отделенный от позвоночного столба; Б – пинцетом показана брюшная аорта, соединенная с позвоночным столбом

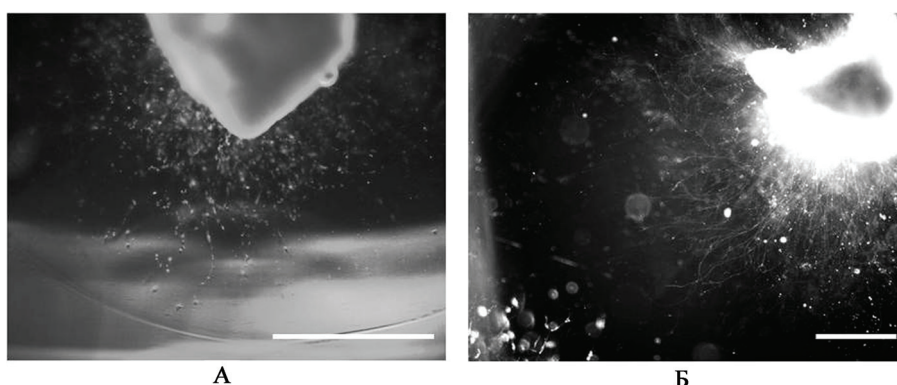


Рис. 6. Визуализация трехмерных эксплантных культур СГ в Матригеле: А – брюшной аорты через 10 дней с использованием световой микроскопии; Б – спинального ганглия через 10 дней с использованием световой микроскопии (Масштаб 200 мкм)

деления эксплантов. В дальнейшем полученные изображения эксплантов СГ или БА в Матригеле могут быть проанализированы с использованием программ MetaMorph или ImageJ для оценки количества мигрирующих клеток, количества и длины формирующихся нейритов или капилляро-подобных структур. Так, через 21 день после высаживания эксплантов длина нейритов и капилляро-подобных структур увеличивается более, чем в 3 раза, что свидетельствует о том, что в течение как минимум 21 дня эксплантная культура нервной ткани и кровеносного сосуда

остается жизнеспособной тканевой культурой *ex vivo*.

Таким образом, разработанный подход может быть использован для скрининга новых терапевтических препаратов, предполагаемых для использования в регенеративной медицине, ангиологии и неврологии. Анализ скорости роста нейритов и капилляро-подобных структур, а также характер миграции клеток позволит сделать вывод о стимулирующем или ингибирующем воздействии тестируемого препарата на процессы ангиогенеза и нейрогенеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 14-24-00086) с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Loeb L. // Science. 1911. Vol. 34. N 874. P. 414.
2. Loeb L. // J. Med. Res. 1902. Vol. 8. P. 109.
3. Fell H.B., Robinson R. // Bioch. J. 1929. Vol. 23. P. 767.
4. Han B., Huang L.L.H., Cheung D., Cordoba F., Nimni M. // RG Landes. 1999. P. 287.
5. Vaissiere G., Chevally B., Herbage D., Damour O. // Med. Biol. Eng. Comput. 2000. Vol. 38. P. 205.
6. Melchiori A., Allavena G., Böhm J., Remy W., Schmidt J., Parodi S., Santi L., Albini A. // Anticancer Res. 1987. Vol. 7. N 3. P. 475.
7. Kubota, Y., Kleinman, H.K., Martin, G.R., Lawley, T.J. // J. Cell Biol. 1988. Vol. 107. P. 1589.
8. Rubina K., Kalinina N., Efimenko A., Lopatina T.V., Melikhova V., Tsokolaeva Z.I., Sysoeva V.Yu, Tkachuk V.A., Parfyonova Y.V. // Tissue Engineering Part A. 2009. Vol. 15. N 8. P. 2039.
9. Rubina K., Sysoeva V., Gmyzina A., Akchurin R., Tkachuk V., Parfyonova Y., Dergilev K. // Journal of stem cells and regenerative medicine. 2010. Vol. 6. N 2. P. 36.
10. Shih H. P., Sander M. // Methods Mol. Biol. 2014. Vol. 1210. P. 229.

Поступила в редакцию 12.01.16

### 3D-MODEL OF BIOMATRIX AS A METHOD OF STUDYING BLOOD VESSELS AND NERVES GROWTH IN TISSUE ENGINEERING STRUCTURES

E.V. Semina, K.A. Rubina, V.Yu. Sysoeva, V.V. Stepanova, V.A. Tkachuk

*(Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University)*

**The method involves isolating and culturing ex vivo cultures of mouse dorsal root ganglia and abdominal aorta in 3-dimensional gel (Matrigel). Unlike other explant cultures, this technique allows us to study the physiological and biochemical processes in the tissue explants of dorsal root ganglia and abdominal aorta in three-dimensional space but not in a two-dimensional adhesive culture. Introduction to the Matrigel testing substances allows analyzing their effects on the dynamics of the explants for 21 days. The developed method can be applied in modern cardiology and neurobiological research and explores how new therapeutic agents can accelerate the regeneration of blood vessels and nerves.**

**Key words:** 3-dimensional explant culture, dorsal root ganglia, abdominal aorta, regenerative medicine.

**Сведения об авторах:** Семина Екатерина Владимировна – ст. науч. сотр. кафедры биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. биол. наук (e-semina@yandex.ru); Рубина Ксения Андреевна – ст. науч. сотр. кафедры биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. биол. наук (rkseiniya@mail.ru); Сыsoева Вероника Юрьевна – ст. науч. сотр. кафедры биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. биол. наук (veroniks@mail.ru); Степанова Виктория Викторовна – вед. науч. сотр. ООО «Генная и клеточная терапия», канд. биол. наук (vstepano@icloud.com); Ткачук Всеволод Арсеньевич – зав. кафедрой биохимии и молекулярной медицины, декан факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. биол. наук, акад. РАН (tkachuk@fbm.msu.ru).