

Создание трехмерного трансплантата поверхностных слоев клеток роговицы

A.C. Kavelina¹, A.G. Popandopulo¹, O.S. Prokopyuk², M.V. Savchuk¹

¹Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака, г. Донецк

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Creation of 3d Graft of Corneal Surface Layers

A.S. Kavelina¹, A.G. Popandopulo¹, O.S. Prokopyuk², M.V. Savchuk¹

¹V.K. Husak Institute of Urgent and Reconstructive Surgery, Donetsk, Ukraine

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

В клинической медицине возрастает интерес к использованию тканевых биогенных стимуляторов, в частности, к амниону. Результаты исследований *in vitro* и *in vivo* доказали, что мембрана может быть успешно использована в качестве субстрата для культивирования эпителиальных стволовых клеток роговицы человека и их последующего применения в лечении тяжелой патологии поверхности глаза. Цель работы – создание трехмерного трансплантата слоев клеток роговицы на амниотической оболочке (АО) путем поэтапного культивирования лимбальных стволовых клеток (ЛСК) и клеток плоского эпителия (КПЭ) роговицы человека на стромальной стороне и базальной мембране.

Для исследования использовали криозамороженный амнион и первичные культуры, выделенные из энуклеированной роговицы человека [Попандопуло А.Г., 2014]. Размороженную мембрану аккуратно расправляли на стерильной фольге и разрезали на небольшие кусочки размером 1x1см². В 8-луночное плато помещали по четыре образца базальной мембраной вверх и четыре – стромальной стороной. Наносили на поверхности амниона по 10 тыс. ЛСК в 200 мкл питательной среды [Гринь В.К., 2011]. После достижения конфлюэнтного лимбального монослоя на поверхности АО, наносили суспензию КПЭ роговицы и культивировали в течение 3-х дней. Для идентификации [Turksen K., 2012.] культивированных клеток роговицы использовали иммуногистохимию (P63, цитокератин 19, цитокератин 3/12, виментин, α-SMA, кератин сульфат, Ki 67, CD 34, CD 45, CD 117, ALDH3A1).

Результаты исследования *in vitro* свидетельствуют о повышенном потенциале пролиферации и дифференциации субпопуляции ЛСК роговицы человека. Специфические маркеры, характерные для этого вида клеток, не экспрессируются в клетках плоского эпителия. Поэтапное культивирование клеток роговицы человека на АО в течение 3–7 дней позволило сформировать на его поверхности полноценные конфлюэнтные монослои с прочными состоятельными межклеточными взаимодействиями. Полупрозрачная мембрана обладает прочностью и практичностью. Можно предположить, что ее морфологические характеристики благоприятно влияют на способность усиливать рост и дифференциацию ЛСК. Культивирование поверхностных слоев клеток роговицы на стромальной стороне и базальной мембране амниона существенно не отличалось.

Clinical medicine represents an increasing interest to the application of tissue biogenic stimulators, in particular, to the amnion. *In vitro* and *in vivo* investigations have shown that the membrane can be successfully used as a substrate for culturing epithelial stem cells of human cornea and their subsequent application when treating severe ocular surface pathologies. The research aim was to create three-dimensional graft of cornea cell layers on amniotic membrane (AM) by stepwise culturing of limbal stem cells (LSC) and squamous epithelial cells (SEC) of human cornea on a stromal side and basal membrane.

The research was performed in cryopreserved amnion and primary cultures derived from an enucleated human cornea [Papadopoulou A.G., 2014]. Frozen-thawed membrane was gently spread on a sterile foil and cut into small pieces of 1x1 cm² size. In each 8-well plate we placed four samples by a basal side upwards and the four pieces by stromal side. The amnion surface was covered with 10 thousand of LSCs in 200 μl of nutritive medium [Grin V.K., 2011]. After achieving the confluent limbal monolayer on AM surface the suspension of corneal SEC was introduced and then cultured for 3 days. Cultured corneal cells were identified immunohistochemically [Turksen K., 2012.] (P63, cytokeratin 19, cytokeratin 3/12, vimentin, α-SMA, keratin sulfate, Ki 67, CD 34, CD 45, CD 117, ALDH3A1).

The results of *in vitro* studies showed an increased potential for proliferation and differentiation of human corneal LSC subpopulation. Specific markers which are characteristic for this type of cells were not expressed in the cells of the squamous epithelium. The stepwise culturing of human corneal cells on AM within 3–7 days allowed the formation on its surface of full confluent monolayers with strong cell-to-cell bonds. Semitransparent membrane was durable and efficient. Its morphological characteristics can be assumed as favorably affecting the ability to enhance the growth and differentiation of the LCS. Culturing of the corneal surface layers on stromal cells and the amnion basal membrane did not significantly differ.

