



**Фадеев
Федор Алексеевич**

Институт медицинских клеточных технологий,
заведующий лабораторией, ведущий научный сотрудник
к.б.н., г. Екатеринбург

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТЕХНОЛОГИИ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ КЛЕТОК ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Фадеев Ф.А., Луговец Д.В., Улитко М.В.

ГАУЗСО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург

В настоящее время в лабораторную практику внедряются технологии автоматизированного выращивания клеток. Различными фирмами-производителями

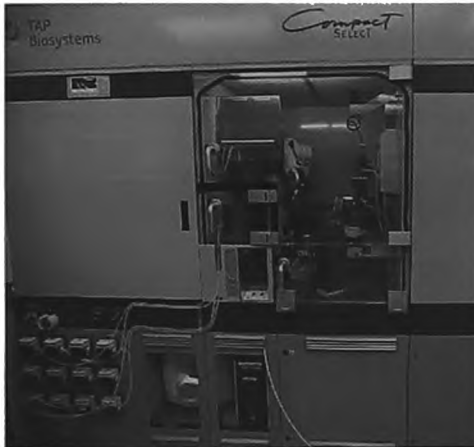


Рис. 1. Роботизированная станция по культивированию и расseyу клеточных линий CompactSelect CellBase.

разработана целая линейка роботизированных станций, предназначенных для культивирования и посева клеточных линий. В лаборатории клеточных культур ИМКТ установлена и запущена в работу роботизированная станция по культивированию и рассеvu клеточных линий ComраCTSelecT CellBase (рис. 1). Станция состоит из 2 основных частей: CO₂-инкубатора и ламинарного бокса. Основным функциональным узлом данной станции является робот, представляющий собой 6-сегментную руку-манипулятор с захватом на конце, имитирующую руку работающего с клетками человека. Станция способна выполнять основные манипуляции с флаконами и пипетками, пересевать клетки, менять питательную среду и подсчитывать количество клеток в суспензии с помощью встроенного счетчика клеток ViCell.

Нами была апробирована и отработана технология культивирования ряда перевиваемых клеточных линий, а также дермальных фибробластов и мезенхимальных стромальных клеток (МСК) человека с использованием станции ComраCTSelecT (рис. 2).

Фибробласты

Фибробласты широко используются для лечения ожогов кожи, а также длительно незаживающих язв различной этиологии. Пересаженные фибробласты продуцируют элементы внеклеточного матрикса: коллаген, ламинин, хондроитин-сульфат, фибронектин, непосредственно участвуя в формировании базальной мембраны кожи. Кроме того, фибробласты секретируют широкий набор факторов роста, стимулирующих эпителизацию раны: фактор роста кератиноцитов (KGF), эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста фибробластов (FGF-10), трансформирующий фактор роста (TGF) α и β), фактор роста нервов (NGF) и ряд других [5].

Методика ускорения заживления ран с помощью аллогенных фибробластов активно применялась в России в Институте хирургии им. А.В. Вишневского. По соглашению с Институтом им. А.В. Вишневского в Екатеринбурге осуществляется внедрение этой методики с использованием дермального эквивалента, представляющего собой полимерную пленку «Карбосил-П» с адгезированными на ее поверхности фибробластами, с перспективой создания новых полимерных матриц-носителей и разработки более сложных кожных эквивалентов. В настоящее время нами используются только аутологичные фибробласты.

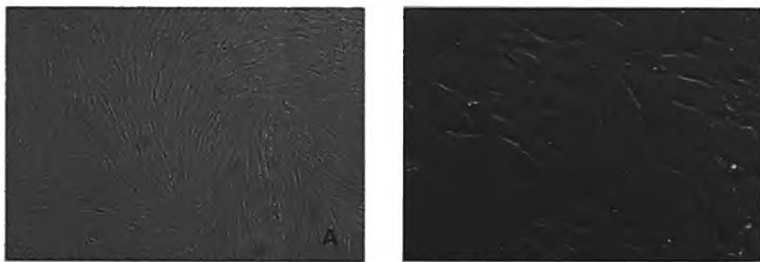


Рис. 2. Клеточные культуры, выращенные на роботизированной станции ComраCTSelecT. А. Дермальные фибробласты, увеличение ×40. Б. Костномозговые мезенхимальные стромальные клетки человека, увеличение ×100.

Технология получения дермального эквивалента следующая:

- 1) Взятие верхнего слоя кожи с частью дермы.
- 2) Разделение биоптата кожи на эпидермис и дерму.
- 3) Выделение из фрагмента дермы первичной культуры фибробластов методом диссоциации тканей с использованием коллагеназы I.
- 4) Накопление биомассы полученной культуры.
- 5) Посев полученной культуры фибробластов на полимерную пленку «Карбосил-П».
- 6) После завершения формирования монослоя терапевтическое применение полученного эквивалента.

Возможности станции ComracTSelect по культивированию и пересеву клеток позволили использовать ее для накопления биомассы полученной культуры фибробластов. Ранее применяемый стандартный протокол «ручного» пересева фибробластов включает в себя нейтрализацию трипсина, использованного для снятия клеток с пластика, и его удаление с помощью центрифугирования. Однако применение данного протокола на станции оказалось невозможным вследствие отсутствия в ее конструкции центрифуги, что вынудило производить нейтрализацию трипсина путем его разбавления ростовой средой. Дополнительной сложностью явилась невозможность визуального контроля

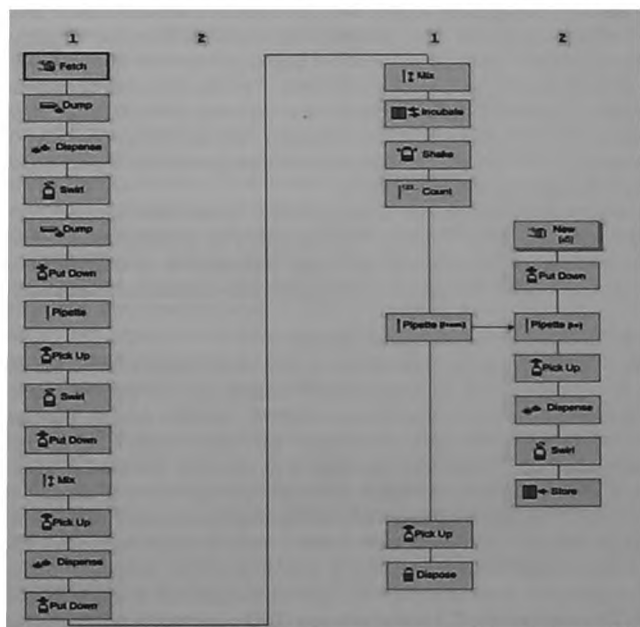


Рис. 3. Стандартный протокол пересева дермальных фибробластов человека, для программного обеспечения роботизированной станции ComracTSelect, в графическом отображении.

отделения клеток от пластика при инкубации монослоя с раствором трипсина, что привело к увеличению продолжительности данной процедуры. Однако длительная инкубация клеток в трипсине вызывала их спонтанную агрегацию, что, в свою очередь, потребовало создания усложненных схем смешивания клеточной суспензии с ростовой средой.

По результатам многочисленных апробаций нами был разработан стандартный протокол пересева фибробластов, обеспечивающий гомогенность рассеиваемой клеточной суспензии и сохранение клетками жизнеспособности. Графическое отображение стандартного протокола в программном обеспечении ComracTSelect представлено на рис. 3. В протоколе, при необходимости, можно изменять посевную дозу. Экспериментально определенная оптимальная посевная доза составляет 6 тыс. клеток/см² флакона при достижении оптимальной плотности монослоя (около 40 тыс. клеток/см²) на 5–6 сутки.

Функционально станция ComracTSelect предназначена для обеспечения продолжительного автоматизированного культивирования клеток и периодических пересевов клеточного материала. Эта возможность обеспечивается программной функцией цепочек протоколов ("protocol chains"), задающей выполнение определенных операций с клетками в заданное время. Однако вариативность скорости репликации у разных линий фибробластов, а также изменения данного показателя в ряду пассажей делают невозможным длительное культивирование клеток при автоматизированном пересеве «вслепую». Для осуществления контроля за плотностью формирующегося монослоя предусмотрена установка модуля визуализации Incusyte, что позволяет станции в автоматическом режиме принимать решение о пересеве клеток по достижении необходимой концентрации. В данный момент этот модуль отсутствует, поэтому длительность полностью автоматизированного культивирования пока не превышает 7–8 дней, включая 2 пересева.

Технические возможности ComracTSelect позволяют осуществлять накопление биомассы фибробластов. Манипуляции по выделению клеток из первичного материала (кожи) и по пересеву полученной на станции клеточной массы на полимерные матрицы не подлежат автоматизации и проводятся вручную.

Мезенхимальные стромальные клетки

МСК способны к дифференцировке в различные типы клеток, что делает их одним из инструментов регенеративной медицины. Эти клетки относят к категории «иммунопrivилегированных» клеток, так как они не вызывают иммунного ответа при аллотрансплантации, благодаря низкой концентрации на их мембранах рецепторов, участвующих в активации клеточного звена иммунитета. Кроме того, МСК обладают иммуномодулирующей (в первую очередь, иммуносупрессивной) активностью. Иммуносупрессивный эффект МСК обусловлен их непосредственным контактом с иммунокомпетентными клетками, а также продукцией ими цитокинов и факторов роста, таких как трансформирующий ростовой фактор β (TGF- β); простагландин E2; интерлейкины 6 и 10 (IL-6 и -10); индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO); индуцибельная синтаза оксида азота (iNOS); секретируемая форма антигена HLA-G (HLA-G5) [1, 3, 4].

Иммуносупрессивный эффект МСК используется при трансплантации ГСК/костного мозга, в том числе для предотвращения развития реакции «транс-

плантат против хозяина» (GvHD). Также были проведены клинические исследования по применению МСК для лечения болезни Крона, рассеянного склероза и системной красной волчанки [2].

Процедура выделения МСК из костного мозга включает следующие этапы:

- 1) Посев костного мозга в культуральные флаконы. Получение первичной культуры МСК.
- 2) Двукратный пересев выделенной культуры.
- 3) Получение суспензии полученной клеточной культуры для терапевтического применения.

Как и в случае с фибробластами, нами была проведена разработка протокола автоматизированного посева МСК, позволившая осуществлять культивирование этих клеток с помощью станции CompacTSelect. МСК и фибробласты имеют высокую степень сходства в морфологии и в характере роста в культуральных флаконах. Разработка протокола для посева МСК столкнулась с теми же проблемами, что и для фибробластов, и решение возникших проблем было проведено по той же схеме. Дополнительную сложность вызвала процедура автоматизированного подсчета клеток при выполнении протокола, потребовавшая изменения настроек встроенного в станцию счетчика, в частности, установки минимального размера клетки в 10 мкм.

Станция позволяет также частично автоматизировать процесс получения МСК из первичного материала (костного мозга), в частности, процедуры посева первичного материала во флаконы, отмывки от неадгезировавшихся клеточных элементов и культивирования клеток с периодической сменой среды. В то же время, получение первичной культуры МСК требует непрерывного визуального контроля формирующихся клеточных микроколоний, что предполагает извлечение культуральных флаконов из станции и, следовательно, нарушение закрытости системы. Получение готовой для применения клеточной суспензии не представляется возможным, так как клетки необходимо отмыть от остатков ростовой среды и трипсина, что предполагает использование центрифуги и, следовательно, может производиться лишь вручную.

Таким образом, станция CompacTSelect принципиально может быть использована для культивирования и накопления биомассы клеток (фибробластов и МСК) для терапевтического применения, несмотря на то, что эксплуатируемые в настоящее время в мире станции обычно используются для других целей (поддержание эталонных клеточных линий, культивирование гибридных линий и т.д.). Культивирование на станции позволяет поддерживать стерильность культуры и избегать ее контаминации микроорганизмами, что подтверждается нашим опытом успешного выращивания клеток в питательных средах без добавления антибиотиков. Помимо уже отработанных протоколов культивирования, в перспективе предполагается использовать станцию для выращивания других типов клеток, в частности, кератиноцитов, а также для проведения в автоматизированном режиме дифференцировки моноцитов периферической крови в дендритные клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Djouad F. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism / F. Djouad, L. Charbonnier, C.

Bouffi, P. Louis-Plence, C. Bony, F. Apparailly, C. Cantos, C. Jorgensen, D. Noël // Stem Cells.– 2007.– V. 25(8).– P. 2025-32.

2. Kim N. Clinical applications of mesenchymal stem cells / N. Kim, S.-G. Cho // Korean J. Intern. Med.– 2013.– V. 28(4).– P. 387–402.

3. Sato K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells / K. Sato, K. Ozaki, I. Oh, A. Meguro, K. Hatanaka, T. Nagai, K. Muroi, K. Ozawa // Blood.– 2007.– V. 109(1).– P. 228-34.

4. Selmani Z. HLA-G is a crucial immunosuppressive molecule secreted by adult human mesenchymal stem cells / Z. Selmani, A. Naji, E. Gaiffe, I. Zidi, B. Favier, E. Gaiffe, L. Obert, C. Borg, P. Saas, P. Tiberghien, N. Rouas-Freiss, E. Carosella, F. Deschaseaux // Stem Cells.– 2008.– V. 26(1).– P. 212-22.

5. Yu F-SX. Growth factors and corneal epithelial wound healing / F-SX. Yu, J. Yin, K. Xu, J. Huang // Brain. Res. Bull.– 2010.– V. 81(2-3).– P. 229–235.