



**Фадеев Федор Алексеевич**

Заведующий лабораторией клеточных культур ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий  
 Доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»  
 к.б.н., доцент  
 г. Екатеринбург

*Фадеев Ф.А.<sup>1,3</sup>, Сулимов А.В.<sup>2</sup>, Штукатуров А.В.<sup>2</sup>,  
 Улитко М.В.<sup>1</sup>, Луговец Д.В.<sup>1</sup>, Салистый П.В.<sup>2</sup>*

## РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

<sup>1</sup> Лаборатория клеточных культур ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург;

<sup>2</sup> МАУ «Детская городская клиническая больница № 9», Екатеринбург;

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», г. Екатеринбург, Российская Федерация

Использование культивируемых дермальных фибробластов для восстановления структурной и функциональной целостности поврежденных органов и тканей является перспективным направлением современной регенеративной медицины. Терапевтическое применение фибробластов включает в себя лечение ожоговых ран и длительно не заживающих язв различной этиологии, а также их использование в косметологии. Полученные *in vitro* фибробласты формируют структурную основу для эпителизации раны, продуцируя белки внеклеточного матрикса и широкий спектр факторов роста, стимулирующих пролиферацию собственных фибробластов и кератиноцитов пациента [1–3].

Одним из современных способов производства клеточных культур для терапевтического применения в соответствии с требованиями GMP, является применение технологий автоматизированного культивирования клеток. Основными преимуществами автоматизированного культивирования клеток являются возможность стандартизации производственного процесса и возможность работы с большими объемами клеточного материала [4].

В лаборатории клеточных культур Института медицинских клеточных технологий установлена и запущена в работу роботизированная станция по культивированию и пересеву клеток CompacT Select, которая позволят осущест-

влять эти операции в автоматическом режиме с минимальным вмешательством оператора (рис. 1). Возможности станции позволяют использовать ее для накопления биомассы различных клеточных линий с целью их терапевтического применения.

Методика ускорения заживления ран с помощью аллогенных фибробластов активно применялась в России в Институте хирургии им. А.В. Вишневского [5]. По соглашению с данным учреждением, в Екатеринбурге на базе ОДКБ №9 осуществляется внедрение этой методики с использованием дермального эквивалента, представляющего собой полимерную пленку «Карбосил-П» с адгезированными на ее поверхности фибробластами. В связи с законодательными ограничениями, в терапевтических целях используются лишь аутологичные фибробласты.



Рис. 1. Роботизированная станция CompaT Select для культивирования клеток.

Общее описание технологии получения первичной культуры фибробластов для терапевтического применения и создания на ее основе дермального эквивалента:

- 1) Взятие верхнего слоя кожи пациента 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 матрицу «Карбосил-П».
- 6) После завершения формирования монослоя, терапевтическое приме-

нение полученного эквивалента.

В терапевтической практике обычно используются фибробласты 5–11 пассажей, что позволяет накопить достаточный объем клеточного материала и, в то же время, исключает старение культуры. Однако, в связи с тем, что для лечения пациента использовали аутологичные клетки, срок от взятия биоптата до выдачи дермального эквивалента был ограничен 3–4 неделями, что вынуждало использовать фибробласты 4–5 пассажа.

Технические возможности станции CompacTSelect позволяли автоматизировать этап накопления биомассы культуры фибробластов. Нами разработана технология культивирования фибробластов с использованием CompacT Select и подготовлен протокол автоматического снятия монослоя фибробластов с пластика и рассева на новые культуральные флаконы [6]. Программное графическое изображение протокола представлено на рис. 2.

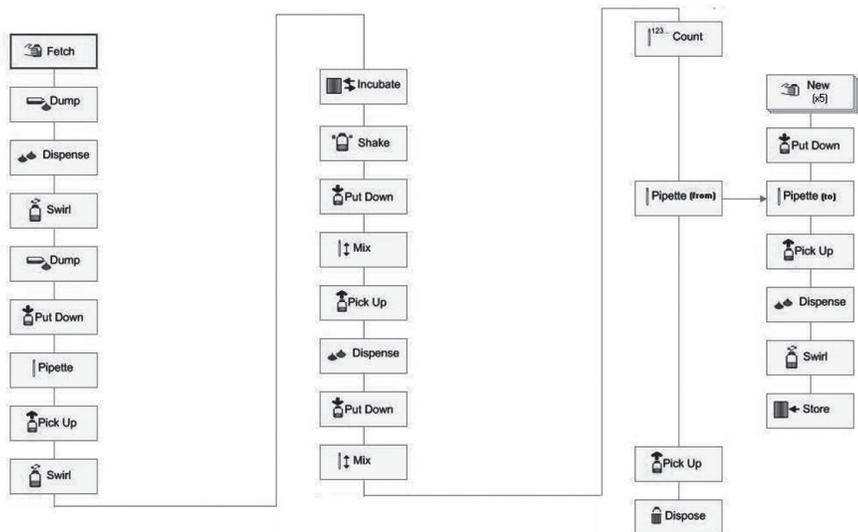


Рис. 2. Программное графическое изображение протокола пересева дермальных фибробластов на станции CompacTSelect.

Краткая последовательность выполняемых станцией операций, заданных в протоколе:

- 1) Взять флакон из CO<sub>2</sub>-инкубатора CompacTSelect и слить ростовую среду
- 2) Отмыть монослой 15 мл раствора Хенкса
- 3) Внести во флакон 5 мл раствора 0,25% трипсина с ЭДТА
- 4) Поместить флакон в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 8 минут
- 5) Встряхнуть флакон перемешать суспензию клеток пипеткой
- 6) Внести 15 мл ростовой среды
- 7) Повторно перемешать клеточную суспензию пипеткой
- 8) Подсчитать концентрацию клеток в суспензии с помощью встроенного счетчика ViCell

- 9) Взять новый флакон
  - 10) Перенести рассчитанный объем клеточной суспензии, содержащий  $1,05 \cdot 10^6$  клеток, в новый флакон.
  - 11) Внести новый флакон 25 мл среды
  - 12) Поместить новый флакон в  $\text{CO}_2$ -инкубатор.
- Операции 9–12 повторить 5 раз.
- 13) Выбросить старый флакон
- Конец протокола

Данный протокол был оптимизирован по параметрам посевной дозы клеток, составу ростовой среды, концентрации сыворотки, а также по типу используемого культурального флакона. Выявлена обратная зависимость скорости пролиферации фибробластов от величины посевной дозы. Оптимальная посевная доза фибробластов составляет 3000 клеток/см<sup>2</sup>. Данной посевной дозе соответствует высокая скорость пролиферации, при которой достижение клеточным монослоем необходимой для пересева клеток плотности происходит на 6–7-й день. Оптимальной средой для культивирования фибробластов является смесь  $\alpha$ MEM или Advanced DMEM с F-12 или RPMI-1640 при концентрации эмбриональной сыворотки 12%. Среди пригодных для использования на станции ComracT Select типов культуральных флаконов наиболее высокая скорость пролиферации клеток отмечена на флаконах T175 Nunc.

Манипуляции по выделению клеток из первичного материала (кожи) и по пересеву полученной на станции клеточной массы на полимерные матрицы для терапевтического применения не подлежат автоматизации и проводятся вручную.

Контроль биологической безопасности полученной культуры фибробластов осуществляется с клетками последнего пассажа перед посевом на полимерные матрицы. Материалом для исследования является ростовая среда после культивирования клеток. Контроль осуществляется следующими методами:

- 1) Бактериологический посев на стерильность.
- 2) ПЦР:
  - HBV
  - HCV
  - HIV
  - HSV-1, 2
  - HCMV
  - EBV
  - *Mycoplasma* spp.

В целом, использование аутологичных клеток практически исключает возможность инфицирования пациента.

Ниже даны 2 примера терапевтического применения полученных аутологичных дермальных фибробластов. Все операции проводились при наличии информированного согласия со стороны родителей пациентов.

Пациент 1, 11 месяцев, диагноз — термический ожог кипятком IIIA-B степени площадью 20% поверхности тела. В ходе лечения были сформированы раны на площади 5%, требующие оперативного закрытия.

Для получения культуры аутологичных фибробластов был взят лоскут кожи

пациента размером 1 см<sup>2</sup>, на 7-е сутки от момента поступления в стационар, во время перевязки под общим обезболиванием.

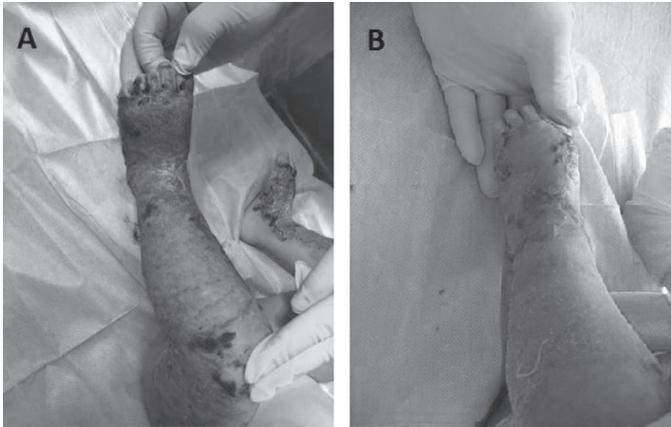


Рис. 3. Пациент 1 (термический ожог): А — до терапии аутологичными фибробластами, В — эпителизация раны после терапии.

На 22 сутки, наряду с выполнением операции аутодермопластики, на раневые поверхности помещалась полимерная матрица «Карбосил-П» с адгезированными на ее поверхности аутологичными фибробластами. Матрица удалялась на следующей перевязке.

На 4-е сутки после нанесения матрицы отмечено начало эпителизации, на 7-е сутки — ее окончание. На 7-е сутки остающиеся раны были обработаны суспензией аутологичных фибробластов методом орошения, после чего происходила их дальнейшая эпителизация, завершившаяся на 11-е сутки (рис. 3).

Пациент 2, 12 лет, диагноз — высоковольтная электротравма, электроожог IIIБ-IV степени площадью 10%.

Схема взятия биоптата для выделения фибробластов такая же, как в предыдущем случае.

На 30 сутки от момента травмы у пациента имелись раны площадью 5%. Пациенту была выполнена аутодермопластика с одномоментной аппликацией матрицы с аутологичными дермальными фибробластами. Как и в предыдущем случае, эпителизация отмечалась в интервале 4–7-е сут., после чего было применено орошение остающихся ран суспензией с аутологичными фибробластами с их полной эпителизацией на 11-е сутки (рис. 4).

В обоих случаях наблюдалось полное приживление использованных для аутодермопластики кожных лоскутов, на месте аппликации фибробластов не отмечено формирования грубых рубцовых деформаций; осложнений не отмечено.



Рис. 4. Пациент 2 (электротравма): А — до терапии фибробластами, результат некрэктомии с аутодермопластикой, В — аутодермопластика с аппликацией матрицы с аутологичными фибробластами, С — эпителизация раны.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Зорина А., Зорин В., Черкасов В. Аутологичные дермальные фибробласты в коррекции возрастных и рубцовых дефектов кожи. Эстетическая медицина 2011; X(2): 173-9.
2. Thangapazham R., Darling T., Meyerle J. Alteration of Skin Properties with Autologous Dermal Fibroblasts. Int. J. Mol. Sci. 2014; 15(5): 8407-27.
3. Yu F., Yin J., Xu K. et al. Growth factors and corneal epithelial wound healing. Brain. Res. Bull. 2010; 81(2-3): 229-35.
4. Thomas R., Chandra A., Liu Ya. Manufacture of a human mesenchymal stem cell population using an automated cell culture platform. Cytotechnology 2007; 55: 31-9.
5. Алексеев, А.А., Попов С.В. Современные методы трансплантации культивированных клеток кожи и ее эквивалентов при лечении ожогов. Комбустиология 1999; 1: 22-5.
6. Государственная регистрация программы для ЭВМ 2016614663 Российская Федерация / Авторы: Фадеев Ф.А., Улитко М.В., Луговец Д.В.; правообладатель ГАУЗ СО ИМКТ.— № заявки 2015661555 от 26.11.2015, опубл. 20.05.2016.