



Лаборатория клеточных культур ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

Фадеев Федор Алексеевич
Заведующий лабораторией
доцент кафедры микробиологии Уральского государственного медицинского университета,
к.б.н., доцент

*Фадеев Ф.А., Луговец Д.В.,
Губаева О.В., Улитко М.В.*

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ДЛЯ СТАНЦИИ COMPACT SELECT

Институт медицинских клеточных технологий,
Екатеринбург, Российская Федерация

Использование культивируемых дермальных фибробластов для восстановления структурной и функциональной целостности кожных покровов является перспективным направлением современной регенеративной медицины. Терапевтическое применение фибробластов, включающее в себя лечение ожоговых ран и длительно незаживающих язв различной этиологии, а также их использование в косметологии, требует получения больших объемов клеточного материала [1, 2].

Одним из эффективных способов организации производства большого количества клеток является автоматизация данного процесса. Автоматизированное культивирование позволяет стандартизировать этот процесс и обеспечить его независимость от квалификации и индивидуальных особенностей работы исполнителя.

В лаборатории клеточных культур Института медицинских клеточных технологий установлена и запущена в работу роботизированная станция по культивированию и пересеву клеток Compact Select (TAP Biosystems, Великобритания). Возможности станции позволяют использовать ее для накопления биомассы дермальных фибробластов. Ранее нами была разработана технология культивирования фи-

бробластов с использованием ComracT Select и создан протокол снятия клеток с пластика и их пересева на новые культуральные флаконы. Однако для оптимизации процесса культивирования фибробластов в больших объемах необходимо определение наиболее подходящих посевной дозы, плотности монослоя для пересева и состава ростовой среды.

Цель — определение оптимальных параметров пересева дермальных фибробластов для стандартизации протокола автоматизированного культивирования с помощью станции ComracT Select.

Материалы и методы

Культура дермальных фибробластов была получена при проведении хирургической операции из фрагмента кожи здорового донора. Экстрагированные клетки культивировали в смеси сред DMEM и F-12 (Gibco) с добавлением 10–12% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma) и гентамицина.

Для оценки влияния посевной дозы фибробластов на их пролиферативную активность, взвесь клеток в ростовой среде вносили в лунки 96-луночных культуральных планшетов в объеме 100 мкл. Начальная плотность посева составляла 50, 100, 200, 400, 750, 1500, 3000, 6000 и 12000 клеток/см². Оценка плотности сформировавшегося клеточного монослоя осуществляли на 3-й, 5-й и 7-й день.

Влияние концентрации сыворотки на пролиферативную активность фибробластов оценивали при их культивировании в среде с различным содержанием данного компонента (от 0 до 50%). В лунки 96-луночного планшета вносили по 50 мкл суспензии фибробластов в смеси сред DMEM и F-12 без добавления сыворотки, после чего в те же лунки вносили соответствующие количества эмбриональной телячьей сыворотки и среды DMEM + F-12 в 6 повторностях для каждой концентрации, доводя суммарный объем смеси в лунке до 100 мкл.

Для подбора оптимальной культуральной среды исследовали различающиеся по составу среды производства Gibco и ПанЭко, а также их смеси. Суспензию фибробластов в ростовой среде, с добавлением 10% сыворотки (Sigma), вносили в лунки 96-луночного планшета в 6 повторах для каждого типа среды.

Плотность посева фибробластов при подборе оптимальной культуральной среды и при оценке зависимости пролиферативной концентрации клеток составляла 1500 клеток/см². Учет результатов осуществляли на 5-е сутки.

Для подсчета количества клеток в лунках культуральных планшетов монослой снимали с пластика 0,25% раствором трипсина с ЭДТА, жизнеспособность определяли смешиванием с раствором трипанового синего; при расчетах учитывали лишь жизнеспособные клетки.

Достоверность различий плотности клеточного монослоя оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, зависимость индекса пролиферации от плотности посева определяли с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

Одними из ключевых параметров в протоколе автоматизированного посева фибробластов являются посевная доза и плотность клеточного монослоя, при которой необходимо осуществлять посев культуры. В первой серии экспериментов нами была оценена зависимость скорости пролиферации клеток от посевной дозы и от плотности формирующегося монослоя.

Для выявления зависимости пролиферативной активности фибробластов от плотности посева (в интервале 50–12000 клеток/см²) определяли изменение плотности клеточного монослоя на 3, 5 и 7-е сутки культивирования для каждого варианта посевной дозы. Экспоненциальный рост количества клеток наблюдался до достижения монослоем плотности приблизительно в 35–45 тыс. клеток/см² поверхности, после чего скорость накопления клеток резко снижалась. В посевах с высокой изначальной плотностью (12 тыс. клеток/см²) на 7-е сутки наблюдалось отмирание клеток, сопровождавшееся снижением плотности монослоя, очевидно, обусловленное достижением монослоем максимальной плотности. Резкое снижение пролиферативной активности фибробластов после достижения клеточным монослоем плотности в 35 тыс. клеток/см² подтверждается оценкой зависимости среднесуточного количества делений клеток от начальной плотности монослоя.

Выявлена обратная зависимость между плотностью посева и индексом пролиферации клеток (отношение плотности сформированного монослоя к посевной дозе): данный показатель имел высокие значения при низкой плотности посева и наоборот (максимум при плотности посева 50 клеток/см², минимум при 12 тыс. клеток/см²). Полученный результат согласуется с данными Kenagy et al. (1983), о том, что скорость пролиферации фибробластов выше при посевах с низкой плотностью клеток [3].

По итогам проведенных экспериментов, наиболее подходящей для посева фибробластов можно считать плотность монослоя приблизительно 30–35 тыс. клеток/см², т.е. плотность на момент окончания экспоненциального роста численности клеточной популяции. Оптимальная посевная доза была определена в 3000 клеток/см². Дальнейшее уменьшение плотности посева могло повысить скорость пролиферации клеток, однако слишком сильно увеличивало время культивирования клеток и, кроме того, уменьшение посевной дозы может сопровождаться увеличением доли фибробластов, дифференцирующихся в миофибробласты [4]. При автоматизированном культивировании фибробластов на ComrasT Select данная посевная доза позволяет осуществлять рассев клеток в соотношении 1:10 (из 1 исходного флакона в 10 новых), что ко 2-му пассажу дает возможность целиком заполнить CO₂-инкубатор станции (90 флаконов) клеточным материалом.

В следующей серии экспериментов был проведен подбор оптимального состава ростовой среды и концентрации сыворотки для культивирования дермальных фибробластов. Наиболее часто используемой для культивирования фибробластов питательной средой является DMEM или смесь DMEM и F-12 [5,6], диапазон рекомендуемой концентрации сыворотки составляет 10–20% [5,7].

Для оценки зависимости пролиферативной активности от концентрации сыворотки, фибробласты культивировали в ростовой среде с различным содержанием эмбриональной телячьей сыворотки (от 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 25, 30, 40 50%). При повышении концентрации сыворотки от 0 до 20% наблюдалось увеличение плотности формирующегося монослоя, в интервале от 22 до 50% отмечено постепенное снижение данного показателя, обусловленное, очевидно, цитотоксическим эффектом сыворотки. Экспоненциальное снижение среднего времени удвоения клеточной популяции наблюдалось в диапазоне от 0 до 12% сыворотки, при дальнейшем повышении ее концентрации чего наступала стабилизация данного показателя, и далее он снижался незначительно. Содержание сыворотки в 12% было определено как оптимальное для ростовой среды.

Для подбора оптимального состава ростовой среды была оценена пролиферативная активность фибробластов на средах DMEM (Gibco и ПанЭко), Advanced DMEM (Gibco) и α MEM (Gibco), а также их смесях с F-12 (Gibco и ПанЭко) или с RPMI-1640 (Gibco и ПанЭко) в соотношении 1:1. Пролиферативная активность фибробластов

на традиционно используемых для выращивания фибробластов среде DMEM и смеси DMEM + F-12 была невысокой. Наибольшая плотность монослоя фибробластов наблюдалась при использовании среды α MEM (Gibco), а также смеси α MEM (Gibco) и Advanced DMEM (Gibco) с F-12 (Gibco) или с RPMI-1640 (Gibco). Существенных различий в пролиферативной активности клеток при использовании F-12 и RPMI-1640 (Gibco) не выявлено, несмотря на то, что среда RPMI-1640 предназначена для культивирования клеток лейкоцитарного происхождения и, в отличие от F-12, для фибробластов обычно не используется. Интересно также отметить отсутствие значимых различий пролиферативной активности при использовании смеси DMEM + F-12 импортного (Gibco) и отечественного (ПанЭко) производства.

По результатам проведенных исследований можно сделать вывод о существовании обратной зависимости между плотностью монослоя фибробластов и их скоростью пролиферации. Оптимальной для посева можно считать дозу в 3000 клеток/см², для пересева — 30–35 тыс. клеток / см². Наиболее высокая скорость пролиферации фибробластов наблюдается при использовании питательных сред α MEM и Advanced DMEM или их смесей с F-12 или RPMI-1640. Оптимальной концентрацией эмбриональной сыворотки в ростовой среде можно считать 12%, т.к. дальнейшее повышение ее содержания в среде приводит лишь к незначительному росту скорости деления клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев, А.А., Попов С.В. Современные методы трансплантации культивированных клеток кожи и ее эквивалентов при лечении ожогов. Комбустиология. 1999; 1: 22-25.
2. Зорин В.Л., Зорина А.И., Петракова О.С. и соавт. Дермальные фибробласты для лечения дефектов кожи. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2009; 4(4): 26-40.
3. Kenagy R., Bierman E., Schwartz S. Regulation of low-density lipoprotein metabolism by cell density and proliferative state. J. Cell Physiol. 1983; 116(3): 404-8.
4. Masur S., Dewal H., Dinh T. et al. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. PNAS USA 1996; 93: 4219-23.
5. Takashima A. Establishment of fibroblast cultures. In: Bonifacino J., Harford J., Lippincott-Schwartz J. et al., editors. Curr. Protoc. Cell Biol.; Chapter 2: Unit 2.1. Hoboken, N.J., USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2001. p. 2.1.1-12.

6. Alt E., Yan Ya., Gehmert S. et al. Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. *Biol. Cell.* 2011; 103: 197–208.

7. Rittié L., Fisher G. Fisher Isolation and Culture of Skin Fibroblasts. In: Varga J., Brenner D. A., Phan S. H., editors. *Methods in Molecular Medicine; Vol. 117: Fibrosis Research: Methods and Protocols.* Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2005. p. 83-98.