

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА РОСТОВОЙ СРЕДЫ И КОНЦЕНТРАЦИИ ФЕТАЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ФИБРОБЛАСТОВ ДЕРМЫ

Ф.А. Фадеев^{1,2}, Д.В. Луговец¹, М.В. Улитко¹, С.Л. Леонтьев¹, С.В. Сазонов^{1,2}

¹Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия

²Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

The dependence of proliferation rate of human dermal fibroblasts on growth medium composition and fetal bovine serum concentration

F.A. Fadeyev^{1,2}, D.V. Lugovets¹, M.V. Ulitko¹, S.L. Leontyev¹, S.V. Sazonov^{1,2}

¹Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russia

²Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia

Применение дермальных фибробластов для терапевтических целей предполагает работу с большими объемами клеточного материала. Автоматизация процесса культивирования с помощью роботизированной станции обеспечивает высокую стабильность условий производства клеток и позволяет в короткие сроки наращивать биомассу фибробластов в соответствии с требованиями GMP.

Для оценки влияния концентрации сыворотки на пролиферативную активность фибробласты культивировали в ростовой среде с различным содержанием данного компонента. Пролиферативную активность фибробластов оценивали по показателю среднего времени удвоения клеточной популяции. Для подбора оптимальной культуральной среды исследовали различные базовые и улучшенные среды производства Gibco и ПанЭко, а также их смеси.

Показано, что экспоненциальное снижение времени удвоения клеточной популяции наблюдается при увеличении концентрации сыворотки от 0 до 12%, и при дальнейшем повышении ее содержания в среде данный показатель уменьшается незначительно. Наиболее высокая пролиферативная активность дермальных фибробластов отмечается при использовании среды α MEM, смеси сред α MEM с F-12, а также на смесях сред Advanced DMEM с F-12 и Advanced DMEM с RPMI-1640 производства Gibco, США.

Ключевые слова: дермальные фибробласты, среднее время удвоения клеточной популяции, ростовая среда, пролиферативная активность.

Введение

В современной регенеративной медицине важное место занимает использование фибробластов дермы человека, выделенных из биоптата кожи, для восстановления целостности кожных покровов. Культивируемые фибробласты, как ауто-, так и аллогенные, находят применение в травматологии, комбустиологии, пластической хирургии и косметологии [1–4]. Преимуществом аутогенных фибробластов являются более продолжительный клинический и косметический эффекты, при этом также исключается риск передачи реципиенту инфекционных агентов от донора. Единственный недостаток аутогенных клеток — для их экспансии до необходимого количества требуется не менее трех недель.

Полученные *in vitro* фибробласты формируют структурную основу для эпителизации раневой поверхности, продуцируя белки внеклеточного матрикса и широкий спектр факторов роста, стимулирующих пролиферацию собственных фибробластов и кератиноцитов пациента [5].

Внедрение в лабораторную практику технологии автоматизированного культивирования клеток позволяет стандартизировать процесс производства

Application of dermal fibroblasts for therapy requires the use of large volume of cell material. The automatized cultivation provides stable conditions for GMP-grade cell production. To define the effect of serum concentration on proliferation rate, fibroblasts were cultured in growth media with different serum percentage. The proliferation rate was evaluated by the use of average period of cell population doubling. For choosing the optimal culture medium, different types of media together with their mixtures, produced by Gibco and PanEco, were explored.

It was shown that exponential decrease of the period of cell population doubling occurs when the serum concentration rises from zero to 12%, and further increment of serum percentage is followed only by minor reduction of this value. The highest proliferation rate of dermal fibroblasts is obtained when they are cultivated in α MEM medium or in the mixtures of α MEM with F-12, Advanced DMEM with F-12 and Advanced DMEM with RPMI-1640 media (Gibco, USA).

Keywords: dermal fibroblasts, period of cell population doubling, growth medium, proliferation rate.

клеточных культур и привести его в соответствие требованиям GMP [6]. При подготовке больших объемов клеточного материала для терапевтического применения необходима оптимизация технологии культивирования, в том числе подбора состава ростовой среды и концентрации сыворотки, обеспечивающих наиболее высокую пролиферативную активность фибробластов (принимая во внимание высокую стоимость этих компонентов). Кроме того, необходимость применения в терапии ожоговых ран аутогенных фибробластов исключает возможность заблаговременной подготовки клеточного материала и требует максимального сокращения срока его получения из взятого от пациента биоптата.

Эффективность колониеобразования и время удвоения популяции фибробластов при использовании низкосывороточных и бессывороточных сред ранее были определены в работе В. Зорина с соавт. (2014) [7]. Однако сравнительные данные по пролиферативной активности дермальных фибробластов на различных типах культуральных сывороточных сред, а также по зависимости данного показателя от концентрации сыворотки в среде, в доступных литературных источниках фрагментарны и разрозненны.

Цель исследования — оценить влияние состава культуральной среды и концентрации сыворотки на пролиферативную активность фибробластов дермы и подобрать оптимальные для технологии автоматизированного культивирования клеток тип питательной среды и концентрацию сыворотки.

Материал и методы

Выделение и культивирование фибробластов осуществляли по модифицированным протоколам A. Takashima (1999) [8]. Две линии фибробластов дермы были получены из образцов кожи здоровых доноров после подписания ими добровольного информированного согласия. Фибробласты были выделены из образцов методом диссоциации ткани с использованием коллагеназы I Clostridium histolyticum (Sigma-Aldrich, США). Экстрагированные клетки культивировали во флаконах T25 (Nunc, Дания) в среде DMEM/F-12 (1:1, Gibco, США) с добавлением 0,03% глутамина и 10% фетальной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США) до формирования участков клеточного монослоя, общая площадь которых составляла не менее 30% от площади флакона, после чего клетки пересеивали. Снятие клеток с пластика проводили 0,25% раствором трипсина с добавлением ЭДТА (Gibco, США). Последующие пересевы осуществляли после достижения 90% конфлюэнтности клеточного монослоя. Для экспериментов использовали клетки 7-8 пассажей.

Для оценки влияния концентрации сыворотки на пролиферативную активность фибробласты культивировали в средах с различным содержанием данного компонента (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 25, 30, 40 и 50%). В лунки 96-луночного планшета (Corning, США) вносили по 50 мкл суспензии фибробластов (плотность посева 1500 кл/см²) в среде DMEM/F-12 (без сыворотки), после чего в те же лунки вносили соответствующие количества фетальной телячьей сыворотки в зависимости от требуемой конечной концентрации и доводили средой DMEM/F-12 общий объем смеси в лунке до 100 мкл. Клетки в планшетах инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение 5 сут.

Пролиферативную активность фибробластов оценивали по показателю среднего времени удвоения клеточной популяции [9], который рассчитывали по формуле:

$$t = \frac{T}{\log_2 \frac{N}{N_0}},$$

где t — среднее время удвоения клеточной популяции; T — время культивирования клеток (ч.); N — плотность клеточного монослоя после окончания культивирования (кл/см²); N_0 — плотность посева (кл/см²); $\log_2(N/N_0)$ — количество удвоений клеточной популяции за время T . Для получения достоверного результата при использовании формулы показатель N должен как минимум в 2 раза превышать показатель N_0 .

Для подбора оптимальной ростовой среды для экспансии фибробластов с использованием технологии автоматизированного культивирования исследовали различающиеся по составу базовые и улучшенные среды производства Gibco (США) и ПанЭко (Россия), а также их смеси:

- 1) DMEM/Ham's F-12, 1:1 (DMEM/F-12, Gibco)
- 2) Advanced DMEM (Gibco)
- 3) Advanced DMEM+Ham's F-12, 1:1 (Gibco)
- 4) Advanced DMEM+RPMI-1640, 1:1 (Gibco)
- 5) α MEM (Gibco, США)
- 6) α MEM+Ham's F-12, 1:1 (Gibco)
- 7) α MEM+RPMI-1640, 1:1 (Gibco)
- 8) DMEM (ПанЭко)
- 9) DMEM+Ham's F-12, 1:1 (ПанЭко)
- 10) DMEM+RPMI-1640, 1:1 (ПанЭко)

Суспензию фибробластов в ростовой среде с добавлением 10% сыворотки (Sigma, США) вносили в лунки 96-луночного планшета с плотностью посева 1500 кл/см² и инкубировали в течение 5 сут. при 37°C в атмосфере с 5% CO₂.

Подсчет количества жизнеспособных фибробластов проводили с помощью их окраски трипановым синим после снятия клеток с пластика 0,25% раствором трипсина с ЭДТА.

Оценку пролиферативной активности фибробластов проводили в 6 повторениях для каждой концентрации сыворотки и для каждого типа среды с последующим расчетом среднего арифметического и стандартного отклонения. Для статистической обработки полученных данных применяли U-критерий Манна – Уитни при уровне значимости различий $p < 0,05$. Вычисления проводили с помощью программы Microsoft Excel 2007.

Результаты и обсуждение

По данным литературы, наиболее высокая пролиферативная активность клеток *in vitro* обычно отмечается при концентрации сыворотки 15–20% [10, 11], однако в протоколах культивирования фибробластов указывается диапазон рекомендуемой концентрации сыворотки от 10 до 20% [8, 12]. Для оценки зависимости пролиферативной активности от концентрации сыворотки фибробласты дермы двух популяций, полученных от разных доноров (линия 1, линия 2), культивировали в ростовой среде с различным содержанием фетальной телячьей сыворотки. Низкая посевная доза (1500 кл/см²) позволяла увеличить количество делений клеток в среде с заданной концентрацией сыворотки и тем самым свести к минимуму возможный побочный эффект, обусловленный культивированием клеток до начала эксперимента в среде иного состава. Результаты эксперимента с обеими линиями фибробластов представлены на рис. 1. При повышении концентрации сыворотки до 20% наблюдалось увеличение плотности сформированного клеточного монослоя. Дальнейшее повышение концентрации сопровождалось снижением пролиферативной активности фибробластов, очевидно, обусловленным цитотоксическим эффектом сыворотки (данные не представлены).

Использованные в эксперименте линии фибробластов имели разные значения среднего времени удвоения популяции, однако общая закономерность его зависимости от концентрации сыворотки была схожей. На рис. 1 представлены значения данного показателя при концентрации сыворотки от 4% и выше, так как при более низком содержании сыворотки плотность сформированного клеточного монослоя была недостаточна для подсчета. Экспоненциальное снижение времени удвоения наблюдалось в диапазоне от 0 до 12% сыворотки, после чего происходит относительная стабилизация данного показателя, и при дальнейшем повышении концентрации он уменьшается незна-

чительно. Для линии 1 при концентрации сыворотки 12% среднее время удвоения клеточной популяции составило $35,3 \pm 2,0$ ч., при концентрации 20% – $31,1 \pm 0,8$ ч.; для линии 2 – $28,3 \pm 0,6$ ч. и $23,7 \pm 0,7$ ч., соответственно (рис. 1).

При подборе оптимальной среды для культивирования фибробластов был использован набор различных сред и их смесей производства Gibco и ПанЭко. Результаты, полученные с использованием обеих линий клеток, представлены на рис. 2.

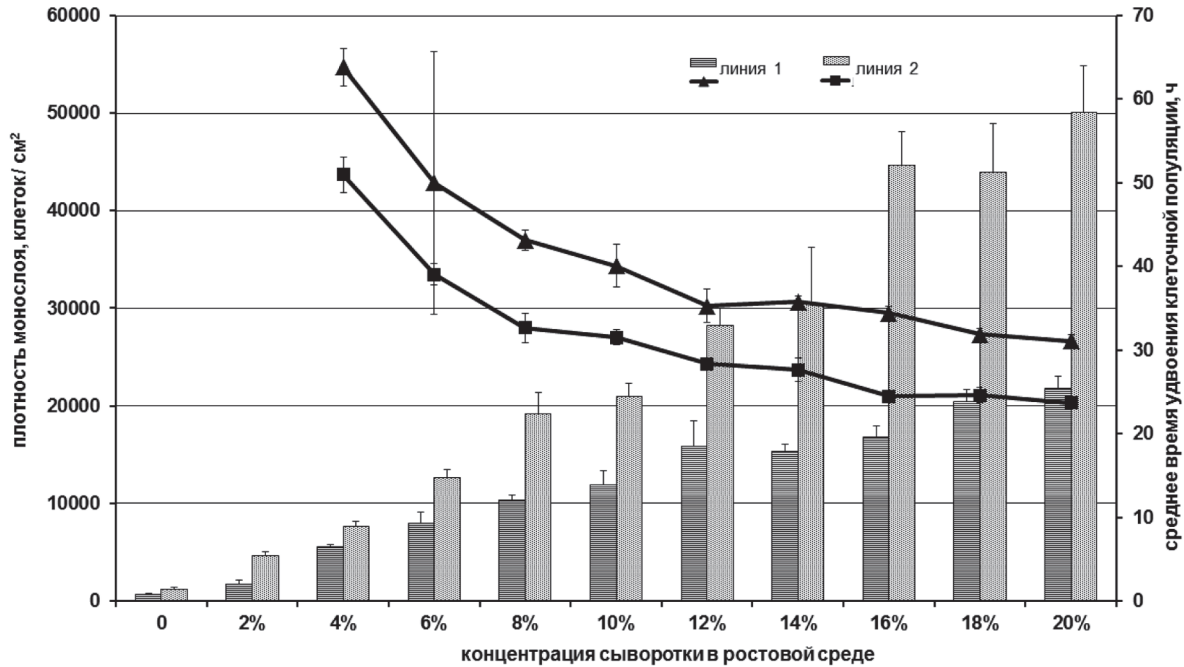


Рис. 1. Зависимость плотности монослоя (столбцы) и среднего времени удвоения популяции (линейный график) фибробластов дермы от концентрации сыворотки

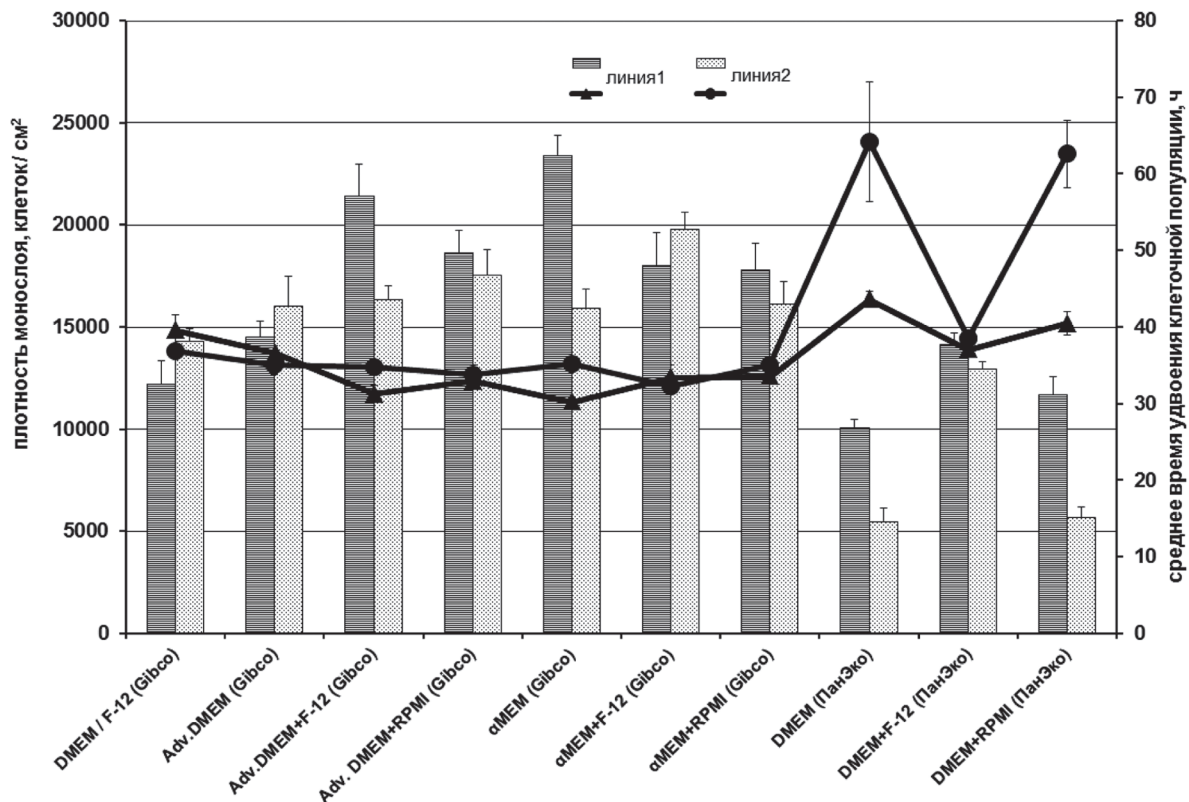


Рис. 2. Зависимость плотности монослоя (столбцы) и среднего времени удвоения популяции (линейный график) фибробластов дермы от типа культуральной среды

Наиболее высокая пролиферативная активность клеток линии 1 была отмечена при использовании сред α MEM и Advanced DMEM+F-12 производства Gibco: среднее время удвоения популяции составило $30,3 \pm 0,5$ ч. и $31,3 \pm 1,1$ ч., соответственно, но различия плотности сформированного монослоя не были статистически значимы. В эксперименте с линией 2 среднее время удвоения было наименьшим при использовании сред α MEM+F-12 ($32,2 \pm 0,5$ ч.) и Advanced DMEM+RPMI ($33,8 \pm 1,2$ ч.). Обнаруженные индивидуальные особенности обеих линий фибробластов, связанные с типом культуральной среды, при использовании которой клетки проявляют максимальную пролиферативную активность, вполне закономерны. В работе М. Ahearne с соавт. (2014) показано, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), также способные дифференцироваться в фибробластическом направлении, выделенные от разных доноров (или от одного донора, но разных пассажей), проявляли максимальную пролиферативную активность на разных культуральных средах [13].

Для получения усредненной оценки влияния состава ростовой среды на пролиферативную активность фибробластов был использован относительный показатель, характеризующий соотношение плотности сформированного клеточного монослоя при использовании различных ростовых сред. За 100% в этом случае условно принималась плотность клеточного монослоя при использовании среды DMEM/F-12 (Gibco). Использование относительного показателя плотности клеточного монослоя позволило нивелировать влияние различий в пролиферативной ак-

тивности между фибробластами из разных линий, не связанных с составом ростовой среды. Средние значения данного показателя по обеим линиям фибробластов представлены на рис. 3.

Наиболее часто используемыми для культивирования фибробластов питательными средами являются DMEM или DMEM/F-12 [8, 14, 15]. Однако при использовании обеих сред относительная пролиферативная активность фибробластов дермы обеих популяций была невысокой. Максимальное значение данного показателя было отмечено на среде α MEM, на смеси сред α MEM с F-12, а также на смесях среды Advanced DMEM с F-12 и RPMI-1640 (около 140% от аналогичного показателя на среде DMEM/F-12). Полученный результат согласуется с данными Р. Sotiropoulou с соавт. (2009), которые показали, что максимальная пролиферативная активность ММСК отмечалась на среде α MEM, тогда как на среде DMEM она была относительно невысокой [16]. При этом уровень пролиферации фибробластов при культивировании на базовой среде α MEM не уступал данному показателю при использовании улучшенных сред Advanced DMEM. Существенных различий в пролиферативной активности клеток при использовании F-12 и RPMI-1640 (Gibco) не было выявлено, несмотря на то, что среда RPMI-1640 предназначена для культивирования клеток лейкоцитарного происхождения и, в отличие от среды F-12, для фибробластов обычно не используется. Интересно также отметить отсутствие значимых различий пролиферативной активности при использовании среды DMEM/F-12 производства Gibco и смеси сред DMEM+F-12 производства ПанЭко.

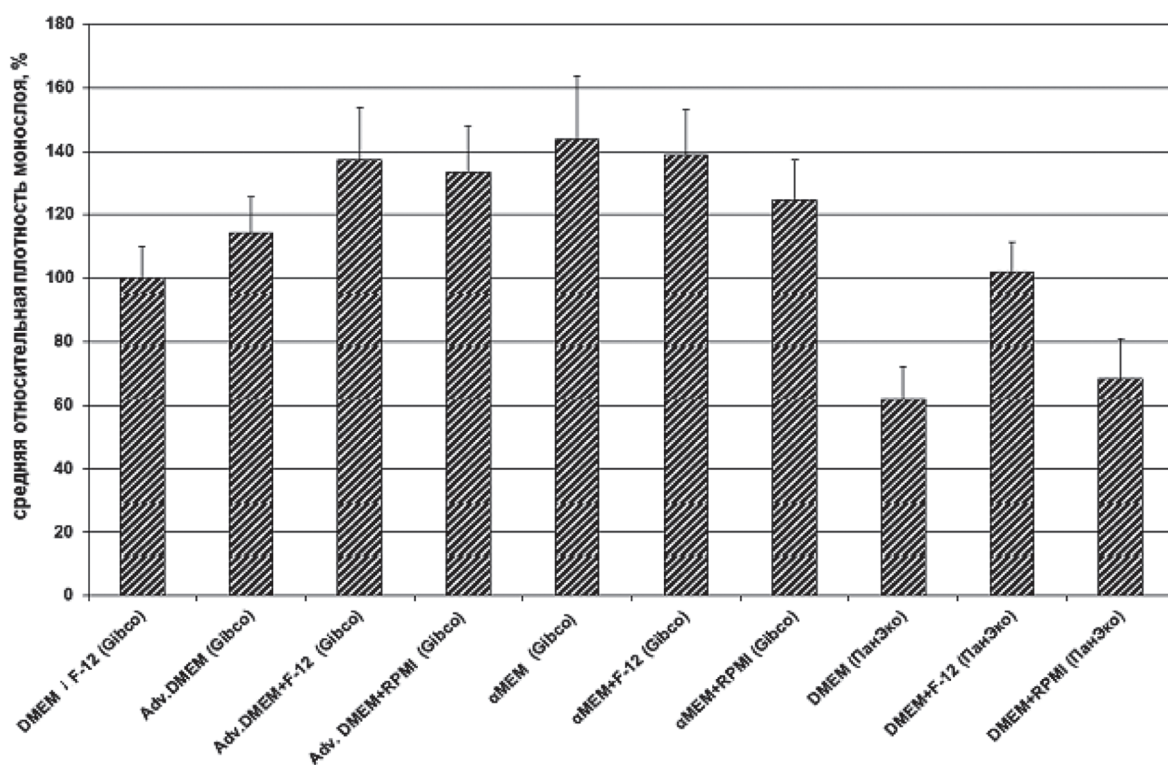


Рис. 3. Относительная пролиферативная активность фибробластов при использовании различных типов ростовой среды. Плотность клеточного монослоя при использовании среды DMEM/F-12 (Gibco) принята за 100%

Выводы

1. Увеличение пролиферативной активности фибробластов при повышении концентрации сыворотки в питательной среде от 0 до 20% носит неравномерный характер. Экспоненциальное снижение среднего времени удвоения клеточной популяции наблюдается в интервале 0–12%, дальнейшее увеличение содержания сыворотки сопровождается незначительным изменением данного показателя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев А.А., Попов С.В. Современные методы трансплантации культивированных клеток кожи и ее эквивалентов при лечении ожогов. *Комбустиология* 1999; 1: 22-5.
2. Зорина А.И., Зорин В.Л., Черкасов В.А. Аутологичные дермальные фибробласты в коррекции возрастных и рубцовых дефектов кожи. *Эстетическая медицина* 2011; X(2): 173-9.
3. Thangapazham R., Darling T., Meyerle J. Alteration of skin properties with autologous dermal fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15(5): 8407-27.
4. Фадеев Ф.А., Сергеев А.Г. Использование первичных клеточных культур для лечения ожогов кожи. *Вестник уральской медицинской академической науки* 2013; 46(4): 134-7.
5. Yu F., Yin J., Xu K. et al. Growth factors and corneal epithelial wound healing. *Brain Res. Bull.* 2010; 81(2-3): 229-35.
6. 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.
7. Зорин В.Л., Копнин П.Б., Зорина А.И. и др. Оптимизация условий получения и ведения культур фибробластов кожи и десны человека. *Гены и Клетки* 2014; IX(2): 53-60.
8. 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.
9. Freshney R.I. Basic principles of cell culture. In: Vunjak-Novakovic G., Freshney R.I., editors. *Culture of cells for tissue engineering.* Hoboken, N.J., USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2006. p. 4-22.

Оптимальной концентрацией сыворотки можно считать 12%.

2. Зависимость пролиферативной активности фибробластов от состава культуральной среды носит индивидуальный характер для конкретной клеточной линии. В целом, наиболее высокая скорость пролиферации наблюдается при использовании питательных сред α MEM и Advanced DMEM с добавлением F-12 или RPMI-1640 (Gibco).

10. EL-Ensaahy H., Abdeen A., Abdeen S. et al. Serum concentration effects on the kinetics and metabolism of heLa-S3 cell growth and cell adaptability for successful proliferation in serum free medium. *World Applied Sciences* 2009; 6(5): 608-15.
11. Liu M., Hu P., Ding K. The effect of serum concentration on the growth, proliferation and collagen secretion in mouse L929 fibroblasts. *Chinese J. Cell Mol. Immun.* 2011; 27(7): 36-9.
12. 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; V. 117: Fibrosis Research: Methods and Protocols.* Totowa, N.J: Humana Press Inc.; 2005. -p. 83-98.
13. Ahearne M., Lysaght J., Lynch A. Combined influence of basal media and fibroblast growth factor on the expansion and differentiation capabilities of adipose-derived stem cells. *Cell Regeneration* 2014; 3: 13.
14. 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.
15. Калмыкова Н.В., Спичкина О.Г., Эллингиди В.Н. и др. Биопластический материала на основе гиалуроновой кислоты как матрица для создания биомедицинских клеточных экспресс-продуктов для восстановления кожи. *Гены и Клетки* 2014; IX(2): 68-75.
16. Sotiropoulou P., Perez S., Salagianni M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24(2): 462-71.

Поступила: 18.07.2016