

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ С ПОМОЩЬЮ РОБОТИЗИРОВАННОЙ СТАНЦИИ

Ф.А. Фадеев, М.В. Улитко, Д.В. Луговец, С.Л. Леонтьев, С.В. Сазонов

Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия

Optimization of dermal fibroblasts cultivation procedure for therapeutic purposes using automated culture system

F.A. Fadeyev, M.V. Ulitko, D.V. Lugovets, S.L. Leontyev, S.V. Sazonov

Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russia

Возможности роботизированной станции по культивированию и пересеву клеточных линий Compact Select (TAP Biosystems, Великобритания) позволяют использовать ее для экспансии дермальных фибробластов, показанных для клинического применения. Автоматизация культивирования клеток требует оптимизации этого процесса, в том числе подбора наиболее подходящей исходной дозы фибробластов и определения времени достижения клеточным монослоем оптимальной плотности для пересева.

Цель работы – определение оптимальных параметров пассирования дермальных фибробластов для стандартизации протокола их автоматизированного культивирования с помощью роботизированной станции Compact Select.

Дермальные фибробласты человека были получены из фрагментов кожи доноров методом ферментативной диссоциации. В качестве показателя пролиферативной активности использовали индекс пролиферации. Изменение скорости пролиферации в зависимости от плотности клеточного монослоя определяли по среднесуточному количеству делений на одну клетку. Влияние посевной дозы (от 50 до $1,2 \times 10^4$ кл/см²) на пролиферативную активность фибробластов оценивали в разные сроки эксперимента (3, 5, 7 и 9 сут. культивирования).

Была установлена обратная зависимость пролиферативной активности фибробластов от величины посевной дозы и показано резкое снижение скорости пролиферации фибробластов после достижения клеточным монослоем плотности $3,5\text{--}4,5 \times 10^4$ кл/см².

В результате проведенного исследования было обнаружено, что оптимальная исходная доза фибробластов составляет 3×10^3 кл/см², а наиболее подходящая для проведения дальнейшего пересева плотность монослоя – $3,5 \times 10^4$ кл/см².

В посевах с высокой исходной плотностью ($1,2 \times 10^4$ кл/см²) при достижении клеточным монослоем критической плотности на 7 сут. наблюдалась гибель части клеток, что сопровождалось возобновлением роста клеточной популяции на 9 сут. культивирования. Данный феномен может объясняться селекцией клеток, способных существовать в условиях повышенной плотности монослоя.

Ключевые слова: дермальные фибробласты, автоматизированное культивирование клеток, посевная доза, скорость пролиферации.

Введение

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 [1–3].

The potential of the automated cell culture system Compact Select (TAP Biosystems, UK) allows using it for the large scale production of dermal fibroblasts for cell therapy. Automated maintenance and expansion of fibroblasts requires evaluation of the proper seeding density and defining the time for the achievement of the optimal confluency of cell monolayer for further passaging.

Objective – to determine the optimal parameters of dermal fibroblasts passaging for development of standardized protocol for automated cell cultivation using Compact Select system.

Human dermal fibroblasts were isolated from donor skin samples by enzyme dissociation. Cells proliferation rate was evaluated by the calculation of proliferation index. The dependence of proliferation rate from cell monolayer density was determined using the value of average number of divisions of single cell per day. The dependence of fibroblasts proliferation rate from seeding density (from 50 to $1,2 \times 10^4$ cells/cm²) in various periods of cultivation (3rd, 5th, 7th and 9th day) was investigated.

The inverse correlation between proliferation rate and seeding density, together with dramatic decrease of proliferation rate at fibroblasts monolayer confluency of $(3,5\text{--}4,5) \times 10^4$ cells/cm², was demonstrated.

The optimal seeding density was evaluated as 3×10^3 cells/cm², the most suitable density of cell monolayer for further passaging was evaluated as $3,5 \times 10^4$ cells/cm².

In case of high seeding density ($1,2 \times 10^4$ cells/cm²), on day 7, when the cell monolayer density reached the critical value, the cell extinction occurred, followed by renewal of cell growth. This phenomenon may be explained by the selection of cells capable of replication under conditions of high density of monolayer.

Keywords: dermal fibroblasts, automated cell cultivation, seeding density, proliferation rate.

В терапевтической практике обычно используются фибробласты 3–10 пассажей, что позволяет накопить достаточное количество клеток и, в то же время, исключает старение культуры [2, 4–6]. Одним из способов организации масштабного производства клеточных культур и приведения этого процесса в соответствие требованиям GMP является применение технологий автоматизированного культивирования. Основные преимущества автоматизированного культивирования клеток – это высокая стабильность, воспроизводимость параметров операций, осуществляемых

с клетками, и, как следствие, возможность стандартизации производственного процесса и работы с большими объемами клеточного материала [7].

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 с целью их дальнейшего терапевтического применения. Для автоматизированного культивирования клеток с помощью станции CompacT Select необходимо создание стандартизованного программного протокола, определяющего все этапы процесса. Ранее нами была разработана технология культивирования фибробластов с использованием CompacT Select и создан протокол снятия клеток с пластика и их пересева на новые культуральные флаконы [8]. Однако для оптимизации процесса культивирования фибробластов в больших объемах необходим подбор наиболее подходящей посевной дозы и определение оптимальной плотности монослоя для пересева.

Цель исследования – определение оптимальных параметров пересева дермальных фибробластов для стандартизации протокола их автоматизированного культивирования с помощью роботизированной станции CompacT Select.

Материал и методы

Линии дермальных фибробластов были получены при проведении хирургической операции из фрагментов кожи 2 здоровых доноров, от которых перед операцией было получено добровольное информированное согласие. Манипуляции с фибробластами проводили по модифицированным протоколам А. Takashima (1999) [9]. Клетки из кожи выделяли методом диссоциации тканей с использованием коллагеназы I Clostridium histolyticum (Sigma-Aldrich, США). Культивирование клеток осуществляли в смеси сред DMEM и F-12 (Gibco, США) в соотношении 1:1 с добавлением 0,03% глутамина, 12% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США) и гентамицина (40 мкг/мл среды). Для снятия клеток с пластика использовали 0,25% раствор трипсина с ЭДТА (Gibco, США).

Для оценки влияния посевной дозы фибробластов на их пролиферативную активность суспензию клеток с различной концентрацией в ростовой среде вносили в лунки 96-луночных планшетов (Corning, США) в объеме 100 мкл (24 повтора для каждого разведения). Начальная плотность посева составляла 50, 100, 200, 400, 750, 1500, 3000, 6000 и 12 000 кл/см². Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ и через определенные интервалы времени производили оценку плотности клеточного монослоя. Клеточный монослой в планшетах отмывали раствором Хенкса, после чего в лунки вносили по 50 мкл 0,25% раствора трипсина с ЭДТА (Gibco, США) для отделения клеток от пластика. Подсчет количества жизнеспособных клеток производили в камере Горяева после окрашивания клеточной суспензии 0,4% раствором трипанового синего. Плотность клеточного монослоя рассчитывали по количеству клеток на см² площади поверхности.

В качестве показателя пролиферативной активности использовали индекс пролиферации: отношение плотности клеточного монослоя на момент подсчета к исходной плотности посева. Оценка количества клеток в формирующемся монослое и расчет индекса пролиферации производили на 3, 5, 7 и 9 сут. культивирования в 6 повторах для каждого временного интервала. Достоверность различий плотности клеточного монослоя оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна – Уитни, зависимость индекса пролиферации от плотности посева определяли с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Изменение скорости пролиферации в зависимости от плотности формирующегося клеточного монослоя оценивали по среднесуточному количеству делений на одну клетку. Расчет данного показателя осуществляли по формуле:

$$\text{Среднесуточное кол-во делений} = \frac{\log_2(N_2/N_1)}{n},$$

где N_1 – плотность клеточного монослоя в начальный момент времени; N_2 – плотность клеточного монослоя через n суток.

Соотношение N_2/N_1 отражает кратность увеличения количества клеток, логарифм этого соотношения по основанию 2 соответствует среднему количеству делений одной клетки за данный период. Среднесуточное количество делений рассчитывали путем сравнения плотности клеточного монослоя для следующих временных интервалов: 3/1сут.; 5/3сут.; 7/5сут.; 9/7 сут. (за плотность монослоя на 1 сут. принимали плотность посева). Оценка индекса пролиферации и среднесуточного количества делений производили в тех случаях, когда плотность сформированного монослоя была не ниже 2×10^3 кл/см² вследствие статистической недостоверности результатов, получаемых при более низкой плотности клеток.

Эксперимент был продублирован с 2 линиями фибробластов, полученными от разных доноров. Так как результаты эксперимента с обеими линиями были схожими, в статье представлены данные лишь по одной из них.

Результаты

Для выявления зависимости пролиферативной активности фибробластов от плотности посева (в интервале 50–12 000 кл/см²) определяли изменение плотности клеточного монослоя на 3, 5, 7 и 9 сут. культивирования для каждого варианта посевной дозы (рис. 1).

Анализ динамики накопления фибробластов при различных плотностях посева свидетельствует о том, что экспоненциальный рост количества клеток происходил до достижения монослоем плотности приблизительно в $3,5\text{--}4,5 \times 10^4$ кл/см², после чего скорость накопления клеток резко снижалась. Кроме того, в посевах с начальной высокой плотностью (12×10^3 кл/см²) на 7 сут. наблюдалось некоторое снижение плотности монослоя и появление в популяции большого количества погибших клеток, что, очевидно, обусловлено достижением клеточным монослоем максимальной плотности и началом его деградации. Однако гибель клеток на 7 сут. сопровождалась повторным увеличением их количества на 9 сут. (рис. 1).

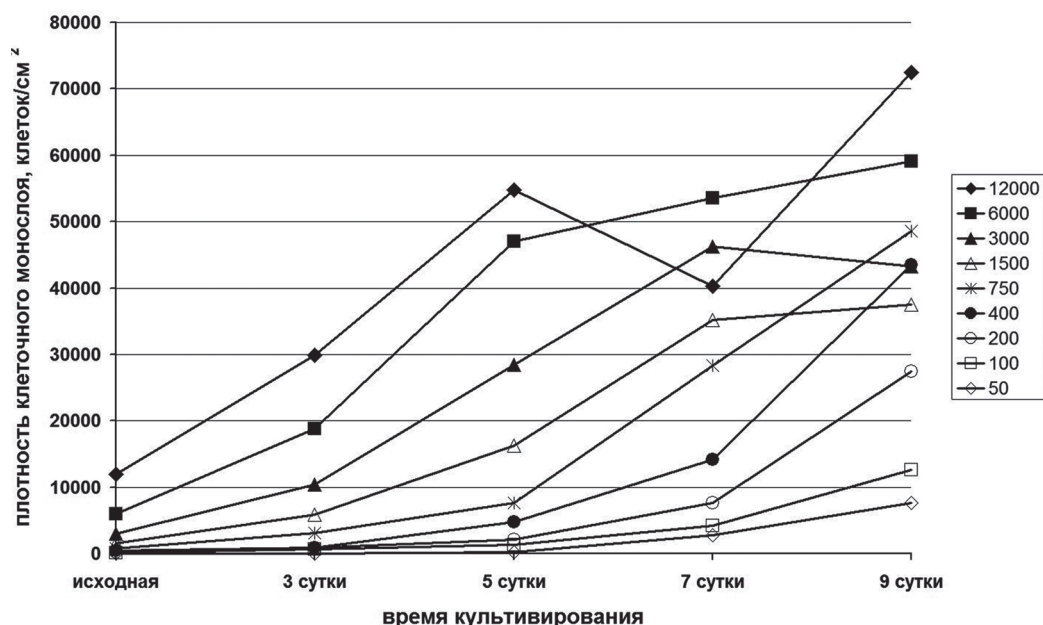


Рис. 1. Динамика изменения плотности монослоя дермальных фибробластов на 3, 5, 7 и 9 сут. культивирования при плотности посева от 50 до 12 000 кл/см²

В качестве показателя репликативной активности фибробластов использовали индекс пролиферации. Значения данного индекса при различной плотности посева на 3, 5, 7 и 9 сут. представлены в табл. Данные по посевам с низкой концентрацией клеток на ранних сроках культивирования отсутствуют по причине недостаточной для подсчета индекса пролиферации плотности сформировавшегося монослоя.

Сравнение полученных данных позволило выявить зависимость между начальной плотностью посева и значением индекса пролиферации: во все дни, когда производился подсчет количества клеток, показатель имел максимальные значения при низких плотностях посева и минимальные при высоких

плотностях. Обратная зависимость индекса пролиферации от начальной плотности посева подтверждена с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (табл.).

Резкое снижение пролиферативной активности фибробластов после достижения клеточным монослоем плотности в $3,5 \times 10^4$ кл/см² подтвердилось оценкой зависимости среднесуточного количества делений клеток от начальной плотности монослоя. Расчет данного показателя осуществляли путем сравнения плотности клеточного монослоя между 1 и 3; 3 и 5; 5 и 7; 7 и 9 сутками культивирования.

Зависимость среднесуточного количества делений клеток от начальной плотности клеточного монослоя представлена на рис. 2.

Таблица. Индекс пролиферации фибробластов при различной плотности посева на 3, 5, 7 и 9 сут. культивирования

Плотность посева, кл/см ²	Индекс пролиферации ± S			
	3 сут.	5 сут.	7 сут.	9 сут.
12000	2,49±0,18	4,57±0,22	3,36±0,61	6,04±0,38
6000	3,13±0,18	7,84±0,36	8,93±1,70	9,86±0,40
3000	3,47±0,17	9,47±0,91	15,42±0,98	14,43±0,87
1500	3,94±0,46	10,81±0,53	23,47±1,43	24,98±1,41
750	4,07±0,42	10,14±0,79	37,82±3,50	64,77±8,39
400		12,59±1,66	37,69±4,23	115,83±16,71
200		11,14±0,50	40,66±3,40	146,87±11,64
100			44,70±6,90	133,72±25,09
50			59,10±10,65	162,53±24,11
Коэффициент Спирмена, достоверность корреляции	-0,639 p<0,01	-0,67 p<0,01	-0,873 p<0,01	-0,925 p<0,01

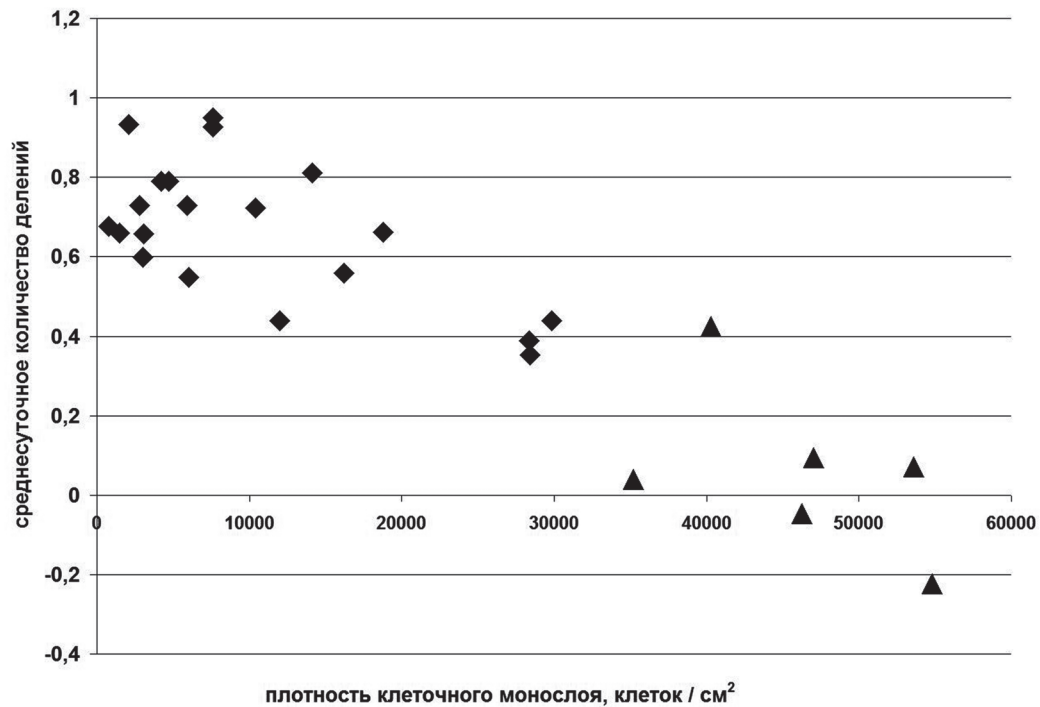


Рис. 2. Зависимость среднесуточного количества делений клеток от начальной плотности клеточного монослоя: ◆ — плотность клеточного монослоя менее $3,5 \times 10^4$ кл/см²; ▲ — плотность клеточного монослоя более $3,5 \times 10^4$ кл/см²

На графике точки образуют 2 группы: с показателем среднесуточного количества делений от 0,35 до 0,95 и от -0,22 до 0,09, соответственно (отрицательное значение показателя означает уменьшение количества клеток). Эти группы практически полностью соответствуют дифференцировке точек по начальной плотности клеточного монослоя: менее $3,5 \times 10^4$ кл/см² и более $3,5 \times 10^4$ кл/см². Единственным исключением является точка с показателем среднесуточного количества делений, равным 0,42 при начальной плотности клеточного монослоя равной приблизительно $4,0 \times 10^4$ кл/см². Однако эта точка отражает вторичный прирост клеточной популяции после гибели части клеток.

Обсуждение

Обязательным условием, обеспечивающим возможность применения автоматизированного культивирования для получения фибробластов, используемых в терапевтических целях, является стандартизация данного процесса для последующей разработки на его основе программного протокола для роботизированной станции. Стандартизация культивирования клеток включает в себя определение наиболее подходящей посевной дозы клеток, а также времени достижения клеточным монослоем оптимальной плотности для последующего пересева. Указанные параметры являются элементами программного протокола для Compact Select.

В настоящее время разработано достаточно большое количество протоколов «ручного» культивирования дермальных фибробластов, однако даже при указании посевной дозы в них, как правило, нет экспериментального обоснования ее выбора. Анализ литературных данных дает не вполне однозначные сведения о связи между посевной дозой фибробластов и их пролиферативной активностью. По данным R. Kenagy с соавт. (1983), скорость пролиферации

фибробластов выше при посевах с низкой плотностью клеток [10]. Высокая плотность фибробластов приводит к ингибированию пролиферации, что связано с повышенным уровнем экспрессии протеинкиназы Сδ, обусловленным формированием межклеточных контактов [11]. В других источниках встречается информация о том, что в условиях низкой плотности наблюдается увеличение гетерогенности популяции иммортализованных фибробластов по их пролиферативной активности, и около половины из них перестают делиться [12].

Для оценки влияния посевной дозы на пролиферативную активность фибробластов в нашей работе были использованы посевные дозы от 50 до 12 000 кл/см², а подсчет количества клеток производился на 3, 5, 7 и 9 сут. культивирования. В результате проведенного исследования установлена обратная зависимость скорости пролиферации фибробластов от величины посевной дозы. Экспоненциальный рост количества фибробластов наблюдался до достижения клеточным монослоем плотности приблизительно $3,5 \times 10^4$ кл/см², после чего происходило резкое снижение скорости роста и гибель клеток. В связи с этим, данную плотность можно считать наиболее подходящей для проведения дальнейшего пересева культивируемых фибробластов.

Оптимальной посевной дозой фибробластов, по результатам экспериментов, можно считать 3000 кл/см². Данной посевной дозе соответствует достаточно высокий индекс пролиферации, при этом достижение клеточным монослоем требуемой для дальнейшего пересева плотности ($3,5 \times 10^4$ кл/см²) происходит приблизительно на 6–7 сут. Дальнейшее уменьшение посевной дозы с целью повышения индекса пролиферации клеток приведет к чрезмерному увеличению сроков культивирования. Кроме того, по данным S. Masur с соавт. (1996), уменьшение посевной дозы сопровождается увеличением доли фибробластов, дифференцирующихся в миофибробласты [13].

Несомненный интерес представляет возобновление роста популяции фибробластов, которое наблюдалось в интервале с 7 по 9 сут. после торможения пролиферации и гибели части клеток при посевной дозе 12000 кл/см^2 (рис. 1). Подобная гибель клеток на 7 сут. с последующим увеличением их численности на 9 сут. имела место при независимом повторе эксперимента с другой линией фибробластов при той же плотности посева. Это подтверждает случайный характер данного феномена. Можно предположить, что при достижении монослоем критической плотности происходит селекция клеток, сопровождаемая гибелью части популяции, которая приводит к формированию пула клеток, способных существовать в условиях повышенной плотности монослоя. При этом нельзя исключить, что изменение ростовых свойств культивируемых фибробластов, позволяющее им пролиферировать в неблагоприятных условиях, связано с необратимой трансформацией генетического материала клеток. Сложность молекулярных механизмов, лежащих в основе трансформации, неучтенные отдаленные последствия такого воздействия для клеток требуют проведения дальнейших исследований.

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. Зорин В.Л., Зорина А.И., Петракова О.С. и др. Дermalные фибробласты для лечения дефектов кожи. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2009; IV (4): 26-40.
3. Фадеев Ф.А., Сергеев А.Г. Использование первичных клеточных культур для лечения ожогов кожи. *Вестник уральской медицинской академической науки* 2013; 46(4): 134-7.
4. Mehrabani D., Manafi N. Role of cultured skin fibroblasts in aesthetic and plastic surgery. *World J. Plast. Surg.* 2013; 2(1): 2-5.
5. Moravvej H., Rad M., Toossi P. et al. Development of an allogeneic cultured dermal substitute using a standard human fibroblast bank. *Iranian J. Dermatology* 2009; 12(4): 111-6.
6. Келлер Г., Себастиан Дж., Лакомбе Ю. и др. Сохранность инъекцируемых аутологичных человеческих фибробластов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2000; 130(8): 203-6.
7. Thomas R., Chandra A., Liu Ya. et al. Manufacture of a human mesenchymal stem cell population using an automated cell culture platform. *Cytotechnology* 2007; 55: 31-9.

Выводы

Наиболее подходящей для пересева культивируемых фибробластов является плотность монослоя, соответствующая $3,5 \times 10^4 \text{ кл/см}^2$. Дальнейшее увеличение плотности приводит к резкому снижению скорости роста и гибели клеток.

Существует обратная зависимость скорости пролиферации фибробластов от величины посевной дозы. Оптимальная исходная доза фибробластов составляет 3000 кл/см^2 . Данной посевной дозе соответствует высокая скорость пролиферации, при которой достижение клеточным монослоем плотности, необходимой для пересева, происходит на 6–7 сут.

В посевах с высокой плотностью ($1,2 \times 10^4 \text{ кл/см}^2$) после торможения пролиферации и гибели части клеток, обусловленной достижением монослоем критической плотности, наблюдается возобновление роста популяции фибробластов. Вероятно, это объясняется изменением ростовых свойств культивируемых фибробластов и формированием пула клеток, способных существовать в условиях повышенной плотности монослоя.

8. Фадеев Ф.А., Луговец Д.В., Улитко М.В. Возможности использования технологии автоматизированного культивирования при получении клеточных линий для терапевтического применения. В: С.Л. Леонтьев, редактор. *Материалы IV межрегиональной научно-практической конференции «Клеточные технологии практическому здравоохранению»*; 2015 21-23 октября; Екатеринбург, Россия. Екатеринбург: Изд-во Вестник Уральской медицинской академической науки; 2015. с. 57-62.

9. Takashima A. Establishment of fibroblast cultures. In: Bonifacio 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.

10. 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.

11. Heit I., Wieser R., Herget T. et al. Involvement of protein kinase C δ in contact-dependent inhibition of growth in human and murine fibroblasts. *Oncogene* 2001; 20: 5143-54.

12. Moldaver M., Yegorov Y.E. Sparse plating increases the heterogeneity of proliferative potential of fibroblasts. *Mechanisms of Ageing and Development* 2009; 130: 337-42.

13. Masur S., Dewal H., Dinh T. et al. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *PNAS USA* 1996; 93: 4219-23.

Поступила: 18.03.2016