

МЕТОДЫ

УДК 576.08

ИССЛЕДОВАНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА В СУСПЕНЗИИО.С. Роговая^{1,2}, О.С. Петракова^{2,3,*}, И.Г. Гвазава^{1,2}, М.А. Борисов^{1,2}, А.В. Васильев^{1,3}

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН;
Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 26;

² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России;
Россия, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1;

³ кафедра эмбриологии, биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

* e-mail: petrakovaol@yandex.ru

Успех клеточной терапии напрямую связан с жизнеспособностью трансплантируемых клеток. В ряде случаев клетки вводят в суспензии. Однако на данный момент не подобраны оптимальные условия для сохранения жизнеспособности клеток при приготовлении суспензионного клеточного трансплантата и при его хранении. Цель работы заключалась в поиске оптимальных условий для хранения суспензии клеток поднижнечелюстной слюнной железы, дифференцированных клеток поднижнечелюстной слюнной железы и дермальных фибробластов человека в физиологически совместимых растворах. В работе использовали стандартные методы выделения и культивирования клеток. Подсчет количества клеток осуществляли на автоматическом счетчике клеток BioRad, жизнеспособность клеток оценивали окрашиванием 4%-ным трипановым синим. В качестве биологически совместимых растворов тестировали фосфатно-солевой буфер, физиологический раствор для инъекций и 2%-ный раствор альбумина человека в фосфатно-солевом буфере. В результате работы было выявлено, что тестируемые клетки человека сохраняют жизнеспособность в суспензии во всех исследуемых растворах при +4°C и +25°C, как минимум в течение 24 ч. Наибольшая жизнеспособность клеток слюнной железы (более 50%) наблюдается в фосфатно-солевом буфере при обоих исследованных температурных режимах. Однако при +4°C клетки слюнной железы лучше сохраняют адгезивные и пролиферативные свойства после 24 ч инкубации в данных условиях. При тестировании фибробластов показано, что в физиологическом растворе клетки сохраняются в виде равномерной одноклеточной суспензии и практически не теряют жизнеспособности в течение 30 ч при +4°C. Добавление 2% альбумина снижает жизнеспособность фибробластов. Таким образом, на основании проведенных исследований рекомендовано хранить и транспортировать суспензию клеток поднижнечелюстной слюнной железы человека в фосфатно-солевом буфере при +4°C; фибробласты человека — в физиологическом растворе при +4°C.

Ключевые слова: жизнеспособность, клетки поднижнечелюстной слюнной железы человека, суспензия, фибробласты человека, хранение суспензионных трансплантатов, культуры клеток человека.

Суспензия клеток представляет собой наиболее простой вариант трансплантата для клеточной терапии, однако выбор основы-растворителя, в котором будут находиться клетки, является неочевидным. Прежде всего, такая основа должна обеспечивать жизнеспособность клеток в течение времени, достаточного для их транспортировки в клинику и подготовки пациента к процедуре трансплантации [1, 2]. Кроме того, необходимо обеспечить приемлемое для инъекции качество суспензии: клетки должны сохранять высокий уровень жизнеспособности, суспензия не должна содержать крупных конгломератов, белковых сгустков и др. В качестве основы предпочтительнее брать солевые растворы с физиологическим составом [3], из них наиболее

доступные и часто употребляемые — физиологический раствор для медицинского применения и используемый в лабораторной практике фосфатно-солевой буфер. В ряде литературных источников указывается, что в качестве добавки можно использовать также человеческий альбумин [4]. Известно, что добавление альбумина к культуральным средам способствует стабильности клеточных мембран и связыванию следового количества токсических компонентов, которые могут присутствовать в растворе. Следовательно, введение альбумина в состав основы-растворителя может повысить жизнеспособность клеток в трансплантате и обеспечить более физиологичное введение [5]. Для выбора оптимальной основы-растворителя мы провели сравнитель-

ное испытание способности вышеперечисленных растворов и 2%-ного раствора альбумина в фосфатно-солевом буфере поддерживать жизнеспособность клеток в суспензии. В качестве тестируемых клеток нами были выбраны дермальные фибробласты (ДФБ) и клетки поднижнечелюстной слюнной железы (КСЖ) человека. ДФБ можно использовать для терапии ран различного генеза, трофических язв, ожогов, при мезотерапии [6, 7, 8]. Во всех этих случаях удобно применять суспензионный трансплантат. КСЖ, а также дифференцированные клетки поднижнечелюстной слюнной железы (КСЖ-дифф.) перспективны для использования как при восстановлении функций собственно слюнных желез [9], так и для терапии патологий печени и поджелудочной железы [10–14]. В ряде случаев целесообразно суспензионное введение КСЖ. Таким образом, определение оптимальных условий для подготовки КСЖ человека к трансплантации является важным условием их применения.

Целью данной работы был выбор оптимальных условий для хранения суспензии КСЖ, КСЖ-дифф. и ДФБ человека в физиологически совместимых растворах. Соответственно было необходимо выявить временной интервал, при котором возможно хранение суспензии исследуемых клеток в физиологически совместимых растворах при температурах +4°C и +25°C, путем подсчета доли живых клеток в суспензиях на разных сроках хранения. А также изучить пролиферативные и адгезивные свойства выживших клеток при посеве на культуральный пластик после хранения их в виде суспензии в исследуемых физиологически совместимых растворах.

Материалы и методы

Клеточные культуры. КСЖ и ДФБ человека были выделены из тканей, полученных в ходе плановых операций по удалению части поднижнечелюстной слюнной железы вследствие слюннокамменной болезни и из кожи после пластических операций, соответственно.

Методы. Клетки культивировали в стандартных условиях при 37°C и 5% CO₂. КСЖ культивировали на среде DMEM/F12 (Gibco, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 2 мМ глутамин (Gibco, США), 10 нг/мл hEGF (Gibco, США). Для получения КСЖ-дифф. клетки инкубировали в дифференцировочной среде в течение 14 сут. Состав дифференцировочной среды: DMEM/F12 (Gibco, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 2 мМ глутамин (Gibco, США), 10 нг/мл hEGF (Gibco, США), 10 нг/мл FGF10 (Gibco, США) и 2 мкМ ретиноевой кислоты (Sigma, США). ДФБ культивировали на среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США) и 2 мМ глутамин (Gibco, США).

Для изучения жизнеспособности клеток культуры КСЖ, КСЖ-дифф. и ДФБ дважды промывали раствором 0,02%-ного Версена (ПанЭко, Россия), снимали с поверхности культуральных флаконов раствором 0,25%-ного трипсина (Gibco, США) по стандартной методике. После этого для удаления остатков раствора трипсина клетки трижды промывали фосфатно-солевым буфером (ПанЭко, Россия). Для приготовления суспензионных проб отцентрифугированные КСЖ, КСЖ-дифф. и ДФБ помещали по 600 тыс. кл/мл в следующие растворы:

1) физиологический раствор для инъекций (Мосфарм, Россия);

2) фосфатно-солевой буфер в модификации Дульбекко (Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS, ПанЭко, Россия);

3) 2%-ный раствор альбумина человека (Baxter, Австрия) в DPBS (ПанЭко, Россия).

После этого каждую пробу разделяли пополам для инкубирования при +4°C и +25°C.

Аликвоту суспензии из каждой пробы отбирали через 2, 4, 6, 24 и 30 ч инкубации в тестируемых растворах и окрашивали 4%-ным раствором трипанового синего (BioRad, США), для чего смешивали их в соотношении 1:1, через 5 мин проводили подсчет общего количества клеток в суспензии и доли живых клеток в каждой пробе на автоматическом счетчике клеток (BioRad, США).

После завершения подсчетов клетки, оставшиеся в пробах, были высеваны в лунки 24-луночного культурального планшета (Corning, США) в среде культивирования для исследования их адгезивных и пролиферативных свойств (клетки на планшетах наблюдали в течение следующих 8 сут).

Статистический анализ данных. Все исследования проводили в трех технических повторах. Подсчитывали среднее значение и величину разброса от него в Excel (Microsoft, США). Оценку достоверности различий жизнеспособности клеток при разных условиях хранения проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Для изучения жизнеспособности клеток при хранении в трех вариантах солевых растворов, были подготовлены суспензии культур ДФБ, КСЖ и КСЖ-дифф. в концентрации 600 тыс.кл/мл. Перед началом хранения был подсчитан процент живых клеток в суспензиях всех культур, и было выявлено, что сразу после снятия с поверхности пластика трипсином и трехкратной отмывки буфером, часть клеток слюнной железы погибает и количество живых клеток в точке “0 часов” составляет 73% для КСЖ и 65% для КСЖ-дифф. соответственно. В то же время в суспензии ДФБ количество живых клеток остается на уровне 100%. Таким образом, значительная часть клеток КСЖ и КСЖ-дифф. погибает уже на стадии приготовления суспензии, что, вероятно, связано с высокой

чувствительностью данных клеток к воздействию трипсина.

В течение первых 4 ч наблюдений во всех изучаемых пробах как при +4°C, так и при +25°C доля живых клеток превышала 50% от первоначального значения (табл. 1). Однако при последующих измерениях было обнаружено, что в части исследуемых образцов стремительно падает тотальное количество клеток в суспензии. Так, концентрации КСЖ и КСЖ-дифф. уменьшились почти в 2 раза, и составляли уже 300 ± 30 тыс.кл./мл раствора через 4 ч инкубации.

Исследование образцов КСЖ и КСЖ-дифф. под микроскопом показало, что данные клетки формируют в суспензиях крупные и мелкие многоклеточные конгломераты. Это объясняет значительное изменение в количестве регистрируемых счетчиком клеток: мелкие конгломераты могут быть учтены как одна клетка, тогда как крупные просто не попадают в счетную камеру. По этой причине, для оценки жизнеспособности клеток в суспензии КСЖ и КСЖ-дифф. при хранении в течение 6, 24 и 30 ч клетки не подсчитывали в счетчике, а переносили на планшеты в культуральную среду.

В течение 2 ч после посева на планшеты, часть клеток КСЖ и КСЖ-дифф. адгезировала к пластику и начала расплываться. Прикреплялись преимущественно конгломераты клеток, тогда как одиночные клетки оставались плавать и, как правило, были нежизнеспособны (табл. 1). Через 8 сут КСЖ и КСЖ-дифф., которые были инкубированы в DPBS + 2% альбумина, как при 4°C, так и при 25°C образовали монослой, в то время как клетки, которые были инкубированы с физиологическим раствором, представляли собой культуру примерно с 30% конфлюентности.

ДФБ сохраняли жизнеспособность как при 4°C, так и при 25°C в течение первых 6 ч наблюдений во всех пробах. За этот период не обнаружено статистически достоверной разницы в жизнеспособности ДФБ при хранении в разных температурных режимах. Однако после 24 ч наблюдений в пробах, хранившихся при +25°C, происходила сильная агрегация клеток в конгломераты, что затрудняло подсчеты. Так как одно из требований к качеству суспензии ДФБ состоит в отсутствии крупных конгломератов [1, 2], то оптимальным температурным режимом для ее хранения можно считать +4°C. Таким образом, подсчеты жизнеспособности ДФБ мы проводили для проб, хранившихся при +4°C.

Доля живых ДФБ и их тотальное количество в пробах с физиологическим раствором и в DPBS в течение 6 ч наблюдения оставалась около 90–100% от первоначальной. Снижение концентрации ДФБ после 6 ч хранения обнаруживалось в пробах DPBS с 2% альбумина. Через 24 ч наблюдений, клетки в пробе DPBS с 2% альбумина счетчиком не обнаружены, а через 30 ч количество живых клеток во

Таблица 1

Доля живых клеток в культурах КСЖ и КСЖ-дифф. в суспензии¹

Проба Время хранения в суспензии	КСЖ в физиологическом растворе		КСЖ в DPBS с 2% альбумина		КСЖ-дифф. в физиологическом растворе		КСЖ-дифф. в DPBS с 2% альбумина	
	+4°C	+25°C	+4°C	+25°C	+4°C	+25°C	+4°C	+25°C
2 часа	78,0±3,8% (*)	58,0±2,2% (*)	67,0±2,1% (*)	68,5±4,3% (*)	94,0±5,9% (*)	79,5±0,5% (*)	91,0±1,2% (*)	83,0±1,8% (*)
4 часа	49,5±8,9%	53,5±6,4%	63,5±3,1% (*)	48,5±1,4% (*)	79,0±5,2% (*)	73,0±2,1% (*)	75,5±15,2%	80,5±5,3% (*)
6 часов	++	++	+++	++	++	+	+++	+++
24 часа	+	+	+	+	+	+	+	++

*+ — доля адгезировавших и расплывшихся на пластике клеток через 2 ч после посева менее 50%

“+” — доля адгезировавших и расплывшихся на пластике клеток через 2 ч после посева около 50%

“+++” — доля адгезировавших и расплывшихся на пластике клеток через 2 ч после посева более 50%

* Различия в жизнеспособности клеток для данной временной точки и температурного режима достоверны между разными растворами по U-критерию Манна—Уитни.
 1 В точке “0 часов” 73% живых КСЖ и 65% живых КСЖ-дифф.

всех тестируемых растворах, кроме физиологического раствора, упало ниже 50% (табл. 2).

Таблица 2

Доля живых клеток в культуре ДФБ в суспензии при +4°C¹

	Физиологический раствор	DPBS	DPBS с 2% альбумина
2 часа	100,0±0,0	99,9±0,1	99,8±0,2
4 часа	99,3±0,1 (*)	62,7±0,3 (*)	37,4±0,1 (*)
6 часов	99,7±0,2 (*)	24,3±0,2 (*)	2,0±0,1 (*)
24 часа	99,6±0,1 (*)	21,5±0,1 (*)	1,3±0,0
30 часов	99,7±0,2 (*)	15,7±0,2 (*)	1,4±0,1 (*)

* Различия в жизнеспособности клеток для данной временной точки достоверны между разными растворами по U-критерию Манна — Уитни.

¹ В точке "0 часов" 100% живых ДФБ.

Оставшиеся в пробах ДФБ были внесены в культуральные планшеты. При визуальном осмотре было выявлено, что часть клеток в пробах с DPBS и DPBS с 2% альбумина слиплась в конгломераты. По всей видимости, эти конгломераты не проходили в камеру для подсчета клеток из-за крупного размера, чем можно объяснить уменьшение концентрации клеток в суспензии при подсчете (табл. 2).

Через 2 ч после переноса на культуральный планшет, большая часть ДФБ (приблизительно 95%), хранившихся в физиологическом растворе и DPBS, прикрепилась к пластику и начала расплываться. Из суспензии ДФБ, хранившейся в DPBS с 2% альбумина, к поверхности планшета прикреплялись преимущественно конгломераты клеток, тогда как единичные клетки оставались плавать в толще среды, и в последующем, при плановой смене среды в планшете, элиминировались. ДФБ из суспензии, хранившейся в физиологическом растворе, образовали монослой через 2 сут культивирования. ДФБ из суспензии, хранившейся в DPBS, образовали

монослой через 3 сут культивирования, а ДФБ из суспензии, хранившейся в DPBS с 2% альбумина — через 5 сут культивирования.

В результате проведенных испытаний было выявлено, что КСЖ человека сохраняют жизнеспособность в суспензии во всех исследуемых растворах при +4°C и +25°C в течение 24 ч. При хранении в фосфатно-солевом буфере при +4 и +25°C в течение 4 ч в суспензиях КСЖ и КСЖ-дифф. остается более 50% живых клеток. При посеве на культуральный планшет, клетки слюнной железы из всех проб сохраняют адгезивные и пролиферативные свойства. Однако после хранения в DPBS КСЖ и КСЖ-дифф. раньше образуют монослой на планшете. Таким образом, можно сделать вывод, что КСЖ и КСЖ-дифф. в виде суспензии в DPBS при +4°C можно хранить в течение 6 ч без потери их жизнеспособности. В дальнейшем, данный режим можно рекомендовать для хранения и транспортировки данных клеток в клинику, в случае их практического использования в качестве трансплантата.

Дермальные фибробласты человека сохраняют жизнеспособность в суспензии во всех тестируемых растворах при +4°C и +25°C в течение 30 ч. При этом качество суспензии и жизнеспособность клеток зависит от состава раствора. При хранении физиологическом растворе в течение 30 ч при температуре +4°C клетки сохраняются в виде равномерной одноклеточной суспензии, не теряя жизнеспособности. Внесение альбумина снижает жизнеспособность клеток вероятно вследствие содержащихся в препарате добавок (например, консервантов или примесей). Таким образом, данные клетки можно хранить при +4°C в физиологическом растворе в течение 30 ч. Эти результаты дают основание рекомендовать физиологический раствор в качестве основы-растворителя при приготовлении препаратов клеточной суспензии ДФБ для медицинского использования.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. FDA. Guidance for FDA reviewers and sponsors: content and review of chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human somatic cell therapy investigation new drug applications (INDs) [электронный ресурс] // Rockville. 2009. URL: <http://www.fda.gov> (дата обращения: 22.06.2016).
2. FDA. Guidance for industry: cellular therapy for cardiac disease [электронный ресурс] // Rockville. 2009. URL: <http://www.fda.gov> (дата обращения: 22.06.2016).
3. Sohn H.S., Heo J.S., Kim H.S., Choi Y., Kim H.O. Duration of *in vitro* storage affects the key stem cell features of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for clinical transplantation // *Cytotherapy*. 2013. Vol. 15. N 4. P. 460–466.
4. Chen Y., Yu B., Xue G., Zhao J., Li R.K., Liu Z., Niu B. Effects of storage solutions on the viability of human umbilical cord mesenchymal stem cells for transplantation // *Cell Transplant*. 2013. Vol. 22. N 6. P. 1075–1086.

5. Lee E.J., Lee S.A., Kim J. The effect of human serum albumin on the extended storage of human oral keratinocyte viability under mild hypothermia // *Cryobiology*. 2005. Vol. 50. N 1. P. 103–111.
6. Ehrlich H.P. Understanding experimental biology of skin equivalent: from laboratory to clinical use in patients with burns and chronic wounds // *Am. J. Surg*. 2004. Vol. 187. N 5. P. 29S–33S.
7. Munavalli G.S., Smith S., Maslowski J.M., Weiss R.A. Successful treatment of depressed, distensible acne scars using autologous fibroblasts: a multi-site, prospective, double blind, placebo-controlled clinical trial // *Dermatol. Surg*. 2013. Vol. 39. N 8. P. 1226–1236.
8. Petrof G., Abdul-Wahab A., McGrath J.A. Cell therapy in dermatology // *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. 2014. Vol. 4. N. 6. a015156.
9. Jang S.I., Ong H.L., Gallo A., Liu X., Illei G., Alevizos I. Establishment of functional acinar-like cultures from human salivary glands // *J. Dent. Res*. 2015. Vol. 94. N 2. P. 304–311.

10. Шубникова Е.А., Погодина Л.С. Компенсаторная функция слюнных подчелюстных желез при диабете и возможность ее стимуляции изопротеренолом // Онтогенез. 2000. Т. 31. № 6. С. 476–480.

11. Hisatomi Y., Okumura K., Nakamura K., Matsumoto S., Satoh A., Nagano K., Yamamoto T., Endo F. Flow cytometric isolation of endodermal progenitors from mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages // *Hepatology*. 2004. Vol. 39. N 3. P. 667–675.

12. Baek H., Noh Y.H., Lee J.H., Yeon S.I., Jeong J., Kwon H. Autonomous isolation, long-term culture and differentiation potential of adult salivary gland-derived stem/progenitor cells // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2012. Vol. 8. N 9. P. 717–727.

13. Okumura K., Shinohara M., Endo F. Capability of tissue stem cells to organize into salivary rudiments // *Stem cells international*. 2012. DOI: 10.1155/2012/502136.

14. Petrakova O.S., Terskikh V.V., Chernioglo E.S., Ashapkin V.V., Bragin E.Y., Shtratnikova V.Y., Gvazava I.G., Sukhanov Y.V., Vasiliev A.V. Comparative analysis reveals similarities between cultured submandibular salivary gland cells and liver progenitor cells // *Springerplus*. 2014. Vol. 9. N 3. 183.

Поступила в редакцию 06.04.2016

Принята в печать 31.05.2016

METHODS

INVESTIGATION OF HUMAN CULTURED CELLS VIABILITY IN SUSPENSION

O.S. Rogovaya^{1,2}, O.S. Petrakova^{2,3,*}, I.G. Gvazava^{1,2}, M.A. Borisov^{1,2}, A.V. Vasiliev^{1,3}

¹ Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences;
Vavilova ul. 26, Moscow, 119334, Russia;

² Pirogov Russian National Research Medical University; Ostrovitianov ul., 1;
Moscow, 117997, Russia;

³ Department of Embryology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University;
Leninskiye Gory 1-12, Moscow, 119234, Russia

* e-mail: petrakovaol@yandex.ru

The success of cellular therapy is directly related to the viability of transplanted cells. In some cases the cells may be injected as suspension. However, the optimal conditions for maintain of the cell viability during graft preparation and cell suspension storage have not yet been established. Purpose of this study is to investigate the optimal conditions for storage of suspensions of human submandibular salivary gland cells, differentiated submandibular salivary gland cells and dermal fibroblasts in a physiologically compatible solutions. Standard methods for cell isolation and cultivation were used. Counting was performed on an automatic cell counter BioRad, cell viability was assessed by staining with 4% Trypan blue. As biocompatible solutions we tested phosphate-buffered saline, saline solution for injection and a 2% solution of human albumin in phosphate-buffered saline. It was found that the tested human cells retain viability in suspension in all solutions for at least 24 hours at +4°C and +25°C. Highest salivary gland cells viability (more 50%) was observed in phosphate buffered saline at both storage temperatures. However, the salivary gland cells better maintain adhesive and proliferative properties after 24 hours of incubation at +4°C. The study of fibroblasts shows that in saline solution these cells are preserved as a single cell suspension and hardly lose viability during 30 hours storage at +4°C. Addition of 2% albumin reduces the viability of fibroblasts. Based on our studies we recommend to store and transport the human submandibular salivary gland cells in phosphate buffered saline at +4°C; human fibroblasts — in saline solution at +4°C.

Keywords: cell viability, human submandibular salivary gland cells, suspension, human fibroblasts, suspension grafts storage, human cell cultures.

Сведения об авторах:

Роговая Ольга Сергеевна — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаборатории клеточной биологии ИБР РАН. Тел.: 8-499-135-40-81; e-mail: rogovaya26f@gmail.com

Петракова Ольга Сергеевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры эмбриологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-62; e-mail: petrakovaol@yandex.ru

Гвазава Инесса Гивиевна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории клеточной биологии ИБР РАН. Тел.: 8-499-135-40-81; e-mail: gvazava.inessa@yandex.ru

Борисов Михаил Александрович — аспирант лаборатории клеточной биологии ИБР РАН. Тел.: 8-499-135-40-81; e-mail: borisov.mikhail2011@yandex.ru

Васильев Андрей Валентинович — директор ИБР РАН. Тел.: 8-499-135-33-22; e-mail: 113162@bk.ru