

## Современные подходы к трехмерному культивированию адгезивных клеток



**И. М. Волкова,**  
канд. техн. наук,  
руководитель отдела продаж оборудо-  
вания для биопроцессов,  
компания Sartorius, Россия

**М**onosлойная (2D) культура клеток лежит в основе современных научных знаний в области клеточной биологии, фармакологии, онкологии, молекулярной биологии, дифференцировки стволовых клеток (СК), морфогенеза тканей, динамического равновесия между функцией клеток и их взаимодействием с микроокружением. В то же время в традиционной 2D-культуре невозможно реконструировать то микроокружение клетки, которое существует *in vivo*, и, таким образом, поддерживать функции дифференцированных клеток. Методы культивирования клеток в трехмерном

пространстве (3D) способны устранить ограничения, свойственные 2D-культурам. 3D-системы включают в себя многочисленные, динамично взаимодействующие типы клеток и тканей, механические компоненты среды и биохимическое микроокружение. Каждый тип клеток *in vivo* находится в различном 3D-микроокружении. Ниша СК, по сути, тоже трехмерная, ее биохимия и топология в значительной мере влияют на процесс дифференцировки клеток.

В настоящее время методы клеточной биологии, а также 3D-культивирование клеток млекопитающих получили приоритетное развитие в клинической медицине, биотехнологии и биофармацевтике. С помощью этих методов стало возможно получать клетки со специализированными свойствами, которые могут быть использованы для улучшения или восстановления

функций тканей и органов, исследования нормальной физиологии и биохимии клеток, тестирования разнообразных химических соединений, лекарственных препаратов, пищевых добавок, синтеза ценных биологических веществ, токсикологического тестирования (в качестве заменителя тестирования на животных). Клеточные технологии наряду с успехами физико-химических наук стали основой для развития тканевой инженерии и клеточной биотехнологии. Появление новых материалов и их сочетание с уникальными свойствами выделенных или модифицированных *in vitro* клеток позволило достичь определенных успехов в области регенеративной медицины, трансплантологии, биотехнологии и биофармацевтики.

Одними из наиболее перспективных клеточных типов, которые используются для этих целей, явля-

ются мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК), первоначально обнаруженные в строме костного мозга (КМ) [1]. Затем они были найдены в других органах: плаценте, пуповине, печени и жировой ткани (ЖТ) [2, 3]. Международным обществом клеточной терапии (International Society for Cellular Therapy – ISCT) были установлены минимальные критерии, характеризующие ММСК [4]. Согласно определению, ММСК – это группа гетерогенных клеток, адгезивных к пластику, которые могут быть выделены из КМ, ЖТ, плаценты, пуповинной крови или из любых других тканей. ММСК не несут поверхностных маркеров, специфичных для гематопозитических линий клеток (CD19, CD34, CD45 и HLA-DR), эндотелиальных клеток (CD31, CD144 и VEGFR-2), и позитивны по CD73, CD90, CD105, CD166, CD146 и NG2 [4, 5]. ММСК способны при индукции формировать мезодермальные клеточные популяции, из которых в ходе эмбрионального развития образуются костно-хрящевая ткань, строма КМ, мышцы, ЖТ и сухожилия [3, 5]. Другим преимуществом данных СК, объясняющим их широкое применение в клеточной терапии, является очень низкая иммуногенность, что обеспечивает возможность пересадки клеток от любого неродственного донора любому реципиенту без проведения иммуносупрессивной терапии [6]. Кроме того, ММСК обладают иммуносупрессивными свойствами против Т-клеток [7], что делает эти клетки эффективными терапевтическими агентами при лечении больных с остро выраженной реакцией отторжения трансплантированной ткани вследствие тканевой несовместимости. Благодаря вышеперечисленным свойствам ММСК нашли применение в клеточной терапии широкого круга патологий, включая сердечно-сосудистые заболевания, инсульт, остеоартрит, несовершенный остеогенез, фиброз печени и др. ММСК, выделенные из КМ, способны секретиро-

вать как компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ) (фибронектин, коллагены I, II, III, IV, V, VI типов, протеогликаны, ламинин) [8, 9], так и комплекс цитокинов с противовоспалительным и антиапоптотическим действием, и хемокинов, участвующих в поддержании гомеостаза (ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-14, ИЛ-15, ИЛ-1 $\alpha$ ), факторы роста СК, гепатоцитов, макрофагов, гранулоцитарно-макрофагов [8]. Известен хоуминг-эффект ММСК КМ, реализующийся через выработку цитокина SDF-1 (Stromal cell-derived factor-1) [9]. Среди компонентов ВКМ, которые продуцируют ММСК, следует отметить фибронектин, ламинин, коллаген и протеогликаны, принимающие основное участие в организации межклеточного взаимодействия и формировании ВКМ в КМ и костной ткани. Доказано, что ММСК, выделенные из КМ, создают стромальное микроокружение, обеспечивающее индуктивными и регуляторными сигналами не только ММСК, но и гематопозитические предшественники и другие мезенхимные СК КМ [5].

ММСК являются адгезивной клеточной культурой. Кинетика роста таких клеточных культур зависит от многих факторов, в том числе от состава питательной среды, температуры, заряда, адгезивных свойств полимера и плотности посева клеток. В последние десятилетия для культивирования ММСК традиционно используют культуральные флаконы, чашки Петри и многоруночные культуральные планшеты. К недостаткам такого культивирования можно отнести ограниченную площадь поверхности культивирования, что приводит к быстрому заселению ее клетками и снижению их пролиферативной активности вследствие контактного торможения, а также истощение питательной среды. Эти причины обуславливают необходимость периодического рассеивания клеток с использованием новой культуральной посуды и новой питательной среды. Таким об-

разом, наращивание адгезивной клеточной культуры традиционным способом *in vitro* является длительной и дорогостоящей многоэтапной манипуляцией. Выход есть – 3D-культивирование ММСК на макропористых микроносителях в одноразовых биореакторах. ММСК способны прикрепляться, заселять матрицу-носитель, дифференцироваться в заданном направлении и формировать трехмерные структуры, которые позволяют моделировать ту или иную ткань *in vitro*.

Выбор матриц – первый ключевой этап для формирования подобного рода моделей. Основными критериями биологически совместимого матрикса для создания тканеинженерной конструкции должны быть: отсутствие цитотоксичности, поддержание адгезии, фиксации, дифференцировки или предотвращение дедифференцировки помещенных на ее поверхность клеток, отсутствие воспалительной реакции на материал и иммунного ответа, достаточная механическая прочность в соответствии с назначением, биорезорбируемость обычными метаболическими путями. В настоящее время существует большое количество различных матриц, отличающихся по материалу, из которого они изготовлены, форме, размеру, твердости, размеру пор и целевому назначению. Для создания матриц используют природные и искусственные материалы. От их химического, физического и геометрического эффекта на носители зависят область и возможность их использования.

Ученые во всем мире ведут работы по созданию, исследованию и изучению возможностей применения различных 3D-матриц-носителей, в том числе на основе природных материалов. Они могут быть классифицированы как белковые (коллаген, желатин, фибрин, матригель, эластин) и как полисахаридные (гиалуроновая кислота, хитозан, агар, декстран, альгинат) [10]. Такие матрицы-носители обеспечивают клеткам

необходимое микроокружение для создания межклеточных взаимодействий и регуляторных систем межклеточных сигналов, а также гораздо лучше стимулируют пролиферацию и функциональные характеристики, чем традиционные 2D-культуры тканей.

Пористые гели – это перспективный материал для создания матриц для 3D-культивирования клеток благодаря их способности воспроизводить основные свойства большинства мягких тканей. Ретикулярные структуры полимерных цепочек, соединенных поперечными связями, содержат большое количество воды, облегчают транспорт кислорода, питательных веществ и продуктов метаболизма, а также транспорт растворимых факторов. Многие гели формируются в мягких условиях, благоприятных для живых клеток, и могут быть легко модифицированы для придания нужной вязкоэластичности и скорости деградации. Гель также может быть отделен от поверхности культурального сосуда, образуя плавающую пластину для выращивания клеток. В такой конфигурации клетки получают питательные вещества из среды, контактирующей с базальной стороной пластины, и имеют доступ к кислороду на поверхности [11].

Большое внимание в решении данной проблемы уделяется белкам и углеводно-белковым комплексам, составляющим комплементарную структурную основу межклеточного белкового матрикса живых тканей и базальных мембран (коллагены разных типов, желатин, фибронектин, ламинин, нидоген, ряд гликопротеидов и протеогликанов и др.) и оказывающим, как известно, выраженное влияние на процессы пролиферации и дифференцировки клеток и формирование тканей. Использование природных гидрогелей (матригеля, фибриногеля и альгината) улучшает биосовместимость тканеинженерных матриц и усиливает их заселение клетками. Альги-

нат является продуктом растительного происхождения и получил широкое применение в биологии, медицине и фармакологии для микрокапсулирования различных веществ, в том числе клеток млекопитающих [12].

Таким образом, использование природных биополимеров в создании биоинженерных каркасов позволяет максимально имитировать строение и свойства тканей и органов, а также создавать микроокружение со структурой, близкой к строению природных клеточных ниш. Это позволяет достигать эффективного заселения таких искусственных ниш СК и способствовать их практически полной дифференцировке в нужные типы клеток.

Выбор биореактора – второй ключевой этап для успешного 3D-культивирования ММСК на матрицах-носителях. Оптимальным решением является использование волновых платформ (BIOSTAT® Cultibag RM, Sartorius) с одноразовыми пластиковыми мешками различного объема. Технология качания использует механическую энергию для обеспечения равномерного перемешивания с наименьшим механическим воздействием на клетки. Интенсивность перемешивания зависит от скорости качания CultiBag RM и угла наклона платформы, при которых создается интенсивное движение жидкости в одноразовом мешке. Таким образом, поверхность среды постоянно обновляется благодаря массообмену между свободным пространством и жидкостью. Одноразовые мешки снижают временные и финансовые затраты на валидацию технологического процесса. Благодаря проведенным исследованиям экстрагируемых и выщелачиваемых веществ, отсутствию необходимости очистки и стерилизации мешков обеспечивается более комфортный процесс культивирования, а главное – BIOSTAT® Cultibag RM идеально подходит для использования в соответствии с требованиями GMP [13]. ■

## Литература

1. **Волкова И.М., Викторова Е.В., Савченкова И.П.** и др. Характеристика мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и жировой ткани крупного рогатого скота // Сельскохозяйственная биология. – 2012. – № 2. – С. 32 – 8.
2. **Dominici M., le Blanc K., Mueller I.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8. – P. 315 – 7.
3. **Russell K.C., Tucker H.A., Bunnell B.A.** et al. Cell-surface expression of neuron-gial antigen 2 (NG2) and melanoma cell adhesion molecule (CD146) in heterogeneous cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells // Tissue Eng. – 2013. – Vol. 19 (№ 19 and 20). – P. 2253 – 66.
4. **Le Blanc K.** Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells // Cytotherapy. – 2003. – Vol. 5, № 6. – P. 485 – 9.
5. **Beyth S., Borovsky Z., Mevorach D.** Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness // Blood. – 2005. – Vol. 105, № 5. – P. 2214 – 9.
6. **Dazzi F., Ramasamy R., Glennie S.** et al. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis // Rev. Blood. – 2006. – Vol. 20. – P. 161 – 71.
7. **Siegel G., Shaffer R., Dazzi F.** The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells // Transpl. – 2009. – Vol. 87, № 9. – P. 45 – 9.
8. **Lee J., Cuddihy M.J., Kotov N.A.** Three-dimensional cell culture matrices: state of the art // Tissue Eng. Part B Rev. – 2008. – Vol. 14, № 1. – P. 61 – 86.
9. **Greiner A.M., Richter B., Bastmeyer M.** Micro-engineered 3D scaffolds for cell culture studies. Review // Macromol Biosci. – 2012. – Vol. 12, № 10. – P. 1301 – 14.
10. **Волкова И.М.** Трехмерные матрицы природного и синтетического происхождения для клеточной биотехнологии / И.М. Волкова, Д.Г. Коровина // Биотехнология. – 2015. – № 2. – С. 8 – 26.
11. **Yoheno K.** et al. Multidifferentiation potential of mesenchymal stem cells in 3-dimensional collagen gel cultures // J Biomed Res A. – 2005. – Vol. 75 (3). – P. 733 – 41.
12. **Elliott N.T., Yuan F.** Review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies // J Pharm Sci. – 2011. – Vol. 100. – P. 59 – 74.
13. Ссылка на сайт компании Sartorius: <https://www.sartorius.ru/sartoriusRU/ru/RUB/bioreactors-fermentors/process-development>



## Контактная информация:

**ООО «Сарториус Стедим РУС» |**  
**ООО «Сарториус РУС»**  
 Тел./факс: +7 (812) 327-53-27.  
[russia@sartorius.com](mailto:russia@sartorius.com), [www.sartorius.ru](http://www.sartorius.ru) ©