Амниокар – пролиферативная среда для мезенхимальных клеток

В.В. Честков, В.Ю. Табаков, Ю.В. Щепкина

ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, Россия, 115478, Москва, ул. Москворечье, 1;
ООО НПП «ПанЭко», Россия, 115522, Москва, а/я 119

***Контакты:** Валерий Викторович Честков chestkov@med-gen.ru*

***Задачи.** Разработать питательную среду Амниокар, содержащую эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС) и коктейль факторов роста, для накопления биомассы фибробластов человека. Исследовать пролиферативную активность данной среды на культурах клеток мезенхимального происхождения HUVEC и мезенхимальных стромальных клетках, а также на культуре клеток амниотической жидкости человека.*
***Материалы и методы.** Определение скорости накопления клеточной массы и морфологии клеток при культивировании клеток разного гистогенеза в среде Амниокар и питательной среде, содержащей 10 % ЭТС.*
***Результаты.** Показано, что среда Амниокар превосходила стандартную среду DMEM с 10 % ЭТС в 2–5 раз при культивировании фибробластов кожи, HUVEC и мезенхимальных стволовых клеток. Среда Амниокар увеличивала количество клеток эндотелия, вступающих в митоз, и поддерживала культуру клеток HUVEC при длительном пассировании in vitro. Клональное культивирование клеток амниотической жидкости человека в среде Амниокар обеспечивало развитие колоний как фибробластоподобного, так и эпителиального типа.*
***Выводы.** Пролиферативная среда Амниокар эффективна для накопления биомассы различных клеток мезенхимального происхождения и может использоваться в диагностических целях в медицинской генетике, онкологии и др.*

***Ключевые слова:** питательная среда, эмбриональная телячья сыворотка, пролиферация, фибробласты, мезенхимальные стромальные клетки, амниотическая жидкость, амниокар, amniomax, HUVEC, in vitro*

Amniocar as a proliferative medium for mesenchymal cells

V.V. Chestkov, V.Yu. Tabakov, Yu.V. Shchepkina

Medical and Genetic Reseach Center, Russian Academy of Medical Sciences, Russia, 115478, Moscow, Zamoskvorechiye St., 1;
NPP "PanEco" LLC, Russa, 115522, Moscow, p/o box 119

***Objectives.** To develop the Amniocar nutrient medium that contains fetal calf serum (FCS) and growth factors cocktail for mass cultivation of human fibroblasts. To study proliferative activity of the medium on cultures of HUVEC cells of mesenchymal origin and mesenchymal stromal cells, as well as on cell culture of human amniotic fluid.*
***Materials and methods.** Determination of the rate of accumulation of the cellular mass and cell morphology in the course of cultivation of cells of various histogenesis in the Amniocar medium and nutrient medium that contains 10 % of FCS.*
***Results.** It has been demonstrated that the Amniocar medium is prevalent as compared to the standard DMEM medium with 10 % of FCS by 2 to 5 times for cultivation of skin fibroblasts, HUVEC, and mesenchymal stem cells. The Amniocar medium increased the quantity of endothelial cells that enter mitosis and maintained the culture of HUVEC cells with prolonged passaging in vitro. Clonal cultivation of human amniotic fluid cells in the Amniocar medium secured development of colonies of both fibroblast and epithelial type.*
***Conclusions.** Proliferative Amniocar medium is efficient for mass cultivation of various cells of mesenchymal origin and can be used for diagnostic purposes in medical genetics, oncology, etc.*

***Key words:** nutrient medium, fetal calf serum, proliferation, fibroblasts, mesenchymal stromal cells, amniotic fluid, Amniocar, amniomax, HUVEC, in vitro*

Введение

Расширение использования метода культуры ткани в различных областях диагностической медицины определяется не только нарастающей потребностью в диагностике заболеваний на молекулярно-генетическом и клеточном уровне, но также и разработками в области заместительной клеточной и тканевой терапии [1]. Поставленная задача требует культивирования клеточных элементов самых разных тканей организма, нуждающихся в определенных гуморальных регуляторных факторах микроокружения. Это предполагает, что культивирование различных клеток организма требует специальных условий для каждого типа клеток [2].

Метод культивирования клеток человека основан на использовании классических питательных сред с известным химическим составом и универсальной добавкой – сывороткой крупного рогатого скота, чаще всего это эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС) [3]. Этот подход позволяет создавать вариации питательной среды по составу минеральных солей, аминокислот и витаминов, но ограничен в изменении содержания факторов роста клеток. Их пропорция и содержание

определяются добавляемой в питательную среду ЭТС, разведение которой в 10 и более раз в составе среды делает концентрацию сывороточных компонентов заведомо ниже физиологической. Такой метод культивирования удобен благодаря его универсальности в отношении большинства клеточных линий и первичных клеточных культур, но оставляет широкое окно возможностей по оптимизации состава питательных сред для конкретных типов клеток [4].

Среди различных типов клеток, используемых для диагностики в современной медицине, фибробласты являются одним из наиболее востребованных [5]. Поэтому была предпринята попытка разработки питательной среды, эффективной для быстрого и массового культивирования этих клеток [6]. Поскольку разработанная среда оказалась востребованной, в первую очередь, при цитогенетической диагностике с использованием клеток амниотической жидкости, она получила название Амниокар [7]. В статье приводятся данные в пользу того, что эта питательная среда поддерживает высокий уровень пролиферации и других клеток организма и, следовательно, может быть использована для решения более широкого круга задач.

Материалы и методы

В работе использовался клеточный материал от пациентов и доноров, оставшийся невостребованным при проведении цитогенетической диагностики в МГНЦ РАМН. Культивирование клеток проводилось в атмосфере с 5 % CO_2.

Использованные в работе реактивы для культивирования клеток произведены НПП «ПанЭко». Среда Амниокар содержит питательную среду DMEM с модификациями, 10 % ЭТС, факторы роста клеток в оптимальной концентрации для каждой партии ЭТС, гормоны и др.

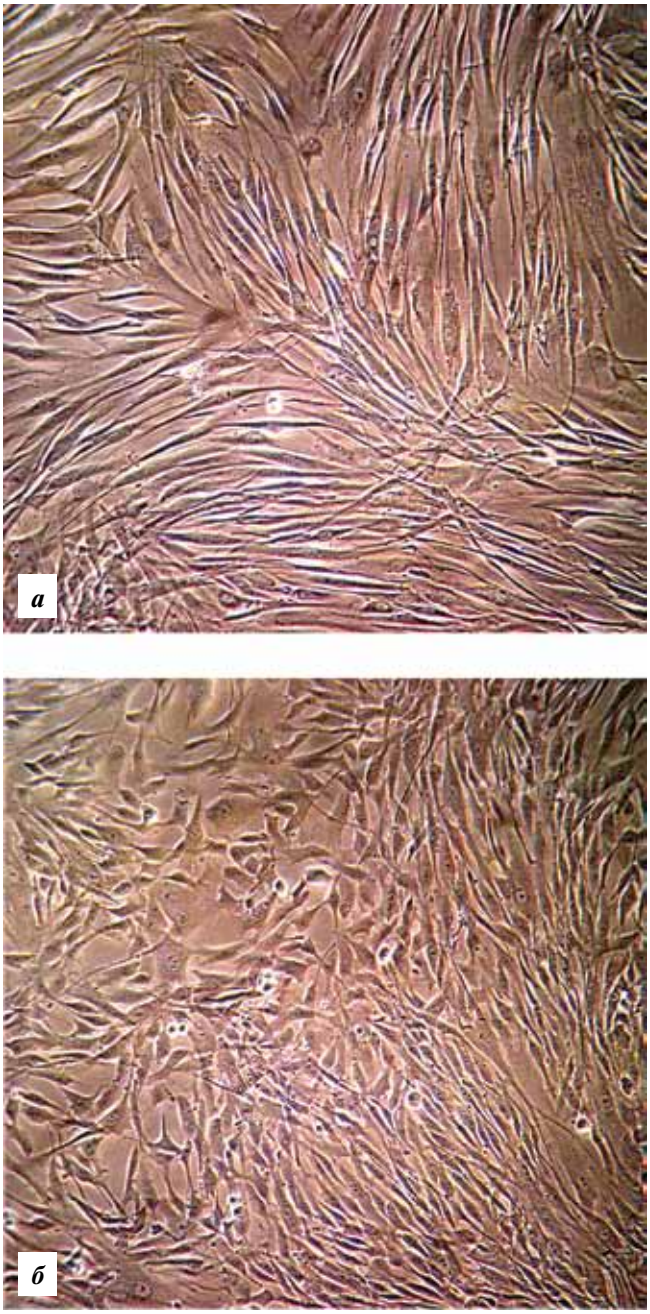
Оценка пролиферативных свойств среды Амниокар проводилась по результатам культивирования фибробластов кожи взрослого человека HSF-W58 на 17–19-м пассаже. В качестве контроля использовали питательную среду DMEM с 10 % ЭТС. Другим контролем являлась коммерчески доступная среда Amniomax-C100 (Invitrogen, Life Technologies, США).

Результаты

Результаты количественной оценки пролиферативных свойств фибробластов в испытуемых средах представлены в табл. 1. Показано, что по эффективности культивирования фибробластов разработанная среда Амниокар многократно превосходит среду DMEM с 10 % ЭТС (стандартные условия культивирования) и не уступает среде Amniomax. Морфология фибробластов в среде Амниокар не отличается от их морфологии в контрольной среде (рисунок). Необходимо отметить дополнительное преимущество среды Амниокар – она может храниться при –20 °С более 1 года.

Таблица 1. *Относительный показатель роста и время удвоения культуры фибробластов в различных средах*

Среда	Относительный показатель роста	Время удвоения, ч
Контроль (DMEM + 10 % ЭТС)	1	42
Amniomax-C100 (Invitrogen) [7]	3,0	27,2
Amniomax-II (Invitrogen) [7]	3,6	25,5
Амниокар (НПП «ПанЭко») [6]	6,4	21,8



Цитоморфология фибробластов кожи взрослого человека штамма HSF-W58 в различных условиях культивирования: а – в ростовой среде DMEM + 10 % ЭТС; б – в пролиферативной среде Амниокар. Фазовый контраст (× 150)

Перспективной моделью для исследования процессов ангиогенеза, патогенеза и лечения заболеваний сердца и сосудов являются псевдолинии диплоидных клеток эндотелия пупочной вены человека HUVEC [8, 9]. Вместе с тем отмечено, что рост этих клеток в культуре *in vitro* замедлен и сильно ограничен в пассажах при использовании классических сред [10]. Эти клетки, так же как и фибробласты, имеют мезенхимальное происхождение, что позволило оценить эффективность их культивирования в разработанной среде при длительном пассировании *in vitro*. Показано, что пролиферативная среда Амниокар стимулирует пролиферацию клеток эндотелия и препятствует их переходу в состояние терминальной дифференцировки. При этом количество удвоений клеток в культуре возрастает с 3–4 до 15–20 (табл. 2).

Таблица 2. *Сравнительная характеристика роста культуры клеток HUVEC в классической (DMEM/F12) и пролиферативной (Амниокар) средах*

Среда	Максимальное число пассажей в культуре	Время удвоения в пассажах, ч
Контроль (DMEM/F12 + 10 % ЭТС)	4	52
Амниокар (НПП «ПанЭко») [6]	20	20,3–38,6

В нашей лаборатории получены данные о том, что среда Амниокар может быть эффективна при культивировании мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из жировой ткани.

Питательная среда Амниокар нашла применение в медицинской генетике для культивирования клеток амниотической жидкости. В табл. 3 приведены данные 1115 независимых сравнительных исследований использования данной среды для цитогенетической диагностики в сопоставлении с результатами культивирования в среде Amniomax-C100 [11]. Клетки амниотической жидкости культивировали 8–12 сут, затем оценивали количество образовавшихся колоний и митотический индекс клеточной культуры. Необходимо отметить, что морфология клеток и колоний указывала на эффективный клональный рост как фибробластоподобных, так и эпителиальных клеток.

Обсуждение

Основной тенденцией в развитии современных питательных сред для клеток человека и животных является разработка бессывороточных сред. Однако для культивирования первичных клеточных культур их эффективность недостаточна, и стандартные методы культивирования с использованием классических питательных сред и сывороток животного происхождения остаются широко используемыми в диагностической работе. Для этих целей разрабатываются питательные среды, содержащие сыворотку животных и коктейль факторов роста, стимулирующий пролиферацию интересующих клеток. Такие среды можно обозначить как пролиферативные.

Таблица 3. *Сравнительная характеристика пролиферативных сред для культивирования клеток амниотической жидкости*

Среда	Среднее число колоний на флакон 25 $см^2$	Митотический индекс, % (на 5000 клеток)
Amniomax-C100 (Invitrogen)	9,9 ± 4,5	4,35 ± 0,65
Амниокар (НПП «ПанЭко»)	8,5 ± 3,6	3,94 ± 1,2

В данной работе представлены результаты разработки пролиферативной питательной среды Амниокар, оптимизированной для культивирования фибробластов и других клеток мезенхимального происхождения. Поскольку каждая партия ЭТС обладает своим пролиферативным потенциалом, оптимальная концентрация факторов роста должна подбираться с учетом качества используемой ЭТС. НПП «ПанЭко» уже в течение нескольких лет производит питательную среду Амниокар, не уступающую по ростовым свойствам мировым аналогам.

Вопрос об адекватности таких пролиферативных сред условиям, существующим вокруг клетки *in vivo*, еще долго не будет иметь однозначного ответа. Состав факторов роста в тканевой жидкости, окружающей клетку, в определенной степени динамичен и отличается от состава сыворотки крови. Кроме того, использование 10 % ЭТС заведомо обрекает культивируемые клетки на дефицит большинства сывороточных факторов роста клеток. С другой стороны, содержание факторов роста в пролиферативных средах существенно выше их концентрации в сыворотке животных. Поскольку в коктейль входит, как правило, лишь несколько факторов роста, возможен дисбаланс их содержания в питательной среде, что потенциально может менять направление дифференцировки клеток.

При условиях культивирования клеток, далеких от физиологических, чаще нарушается прохождение клетками нормального клеточного цикла и в культуре клеток наблюдается повышенная частота хромосомных аберраций [12–14]. Такие последствия крайне нежелательны для разрабатываемых пролиферативных сред, поскольку они используются, в том числе, и для цитогенетической диагностики. Необходимо отметить, что Амниокар уже несколько лет применяется в цитогенетической диагностике, и подобного рода проблем при его использовании не выявлено. По-видимому, это единственный, но достаточно надежный интегральный показатель соответствия разработанной среды физиологическим потребностям клеток.

Заключение

Разработанная пролиферативная среда Амниокар может эффективно применяться для культивирования клеток амниотической жидкости, а также для быстрого накопления биомассы клеток мезенхимального происхождения при культивировании *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Soto-Gutierrez A., Yagi H., Uygun B.E. et al. Cell delivery: from cell transplantation to organ engineering. Cell Transplant 2010;19(6):655–65.
2. Freshney R.I. Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique. 5th ed. Hoboken, NJ: John Wiley&Sons, 2005.
3. Boone C.W., Mantel N., Caruso T.D. Jr. et al. Quality control studies on fetal bovine serum used in tissue culture. In vitro 1971;7(3):174–89.
4. Табаков В.Ю., Щепкина Ю.В., Честков В.В. Современные принципы классификации и разработки питательных сред для культивирования клеток человека и животных. Клеточные технологии в биологии и медицине 2013;(1):47–57. [Tabakov V.Yu., Shchepkina Yu.V., Chestkov V.V. Modern principles of classification and development of nutrient media for cultivation of human and animal cells. Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine = Cell Technologies in Biology and Medicine 2013;(1):47–57. (In Russ.)]
5. Wong T., McGrath J. A., Navsaria H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. Br J Dermatol 2007;156(6):1149–55.
6. Chang H.C., Jones O.W., Masui H. Human amniotic fluid cells grown in a hormone-supplemented medium: suitability for prenatal diagnosis. Proc Natl Acad Sci USA 1982;79(15):4795–9.
7. Табаков В.Ю., Щепкина Ю.В., Честков В.В. Способ культивирования клеток амниотической жидкости и фибробластов человека в специализированной среде «Амниокар». Патент RU № 2415929, приоритет 10.06.2009. [Tabakov V.Yu., Shchepkina Yu.V., Chestkov V.V. Method of cultivation of human amniotic fluid cells and human fibroblasts in the Amniocar specialized medium. Patent RU No. 2415929, priority 10.06.2009. (In Russ.)]
8. Schaefermeier P.K., Cabeza N., Besser J.C. et al. Potential cell sources for tissue engineering of heart valves in comparison with human pulmonary valve cells. ASAIO J 2009;55(1):86–92.
9. Takakura N., Watanabe T., Suenobu S. et al. A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. Cell 2000;102(2):199–209.
10. Morgan D.M.L. Isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. In: Human Cell Culture Protocols. Gareth E. Jones (ed.). Totowa, NJ: HumanaPress, 1996. Pp. 104–9.
11. Kuligowski S., Csirke B., Biddle W. et al. AMNIOMAX™-II complete: a second-generation AMNIOMAX medium for primary amniocyte culture. FOCUS 1999;21(2):35–7.
12. Полянская Г.Г., Дьяконова М.Ю. Влияние условий культивирования на кариотипическую структуру клеточной сублинии почки кенгуровой крысы. Цитология 1988;30(11):1355–63. [Polyanskaya G.G., Diakonova M.Yu. Effect of culture conditions on karyotypic structure of cell subline of the kangaroo rat kidney. Tsitologiya = Cytology 1988;30(11):1355–63. (In Russ.)]
13. Pochampally R.R., Smith J.R., Ylostalo J., Prockop D.J. Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. Blood 2004;103(5):1647–52.
14. Tian J., Ishibashi K., Honda S. et al. The expression of native and cultured human retinal pigment epithelial cells grown in different culture conditions. Br J Ophthalmol 2005;89(11):1510–7.